

Tesis Doctoral

# Biología del comportamiento en abejas recolectoras de néctar: un estudio comparado entre abejas meliponas y melíferas

Mc Cabe, Sofía I.

2010

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mc Cabe, Sofía I.. (2010). Biología del comportamiento en abejas recolectoras de néctar: un estudio comparado entre abejas meliponas y melíferas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mc Cabe, Sofía I.. "Biología del comportamiento en abejas recolectoras de néctar: un estudio comparado entre abejas meliponas y melíferas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**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

# **Biología del comportamiento en abejas recolectoras de néctar: un estudio comparado entre abejas meliponas y melíferas.**

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

Sofía I. Mc Cabe

Director de tesis: Dr. Walter M. Farina

Consejero de Estudios: Dr. Walter M. Farina

Grupo de Estudio de Insectos Sociales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2010.

## Biología del comportamiento en abejas recolectoras de néctar: un estudio comparado entre abejas meliponas y melíferas.

### RESUMEN

Dentro de la familia Apidae, la tribu meliponini engloba a más de 350 especies de abejas sin aguijón. Estas abejas presentan un amplio repertorio de comportamientos de recolección y comunicación. A pesar de estar cercanamente relacionadas con la abeja melífera, que es uno de los modelos de estudio en invertebrados por excelencia en aspectos cognitivos, hasta la fecha existen muy pocas descripciones de las habilidades de aprendizaje de las abejas sin aguijón. El objetivo central de esta tesis fue desarrollar estudios comparados de dichas habilidades cognitivas y correlacionarlas con sus estrategias de recolección y comunicación. Para ello utilizamos por primera vez en abejas sin aguijón el protocolo de condicionamiento clásico REP (Respuesta de Extensión de Probóscide) que permite evaluar el aprendizaje olfativo en condiciones controladas de laboratorio. Las especies de abejas con las que trabajamos mostraron diferencias en su capacidad para resolver una tarea de condicionamiento diferencial olfativo. A partir de su desempeño en este protocolo, discutimos la relevancia de la información olfativa durante la recolección para cada especie.

Particularmente con las abejas de la especie *Melipona quadrfasciata*, estudiamos la transmisión de información olfativa en el contexto social de la colmena. Observamos que esta especie de abejas tiene la capacidad de efectuar un aprendizaje mediado por una congénere (aprendizaje social). También determinamos que la información que adquieren en la colmena en términos olfativos puede ser evocada en un paradigma artificial de aprendizaje, demostrando que son capaces de efectuar una transferencia de información entre contextos.

La producción de vibraciones al retornar de recolectar alimento forma parte de las estrategias para obtener recursos de muchas especies de abejas sin aguijón. Evaluamos las vibraciones ocurridas durante la transferencia de alimento entre compañeras en *Melipona quadrfasciata*. Estas vibraciones parecieran afectar el establecimiento del vínculo olor-recompensa.

La incorporación de las abejas sin aguijón como modelos de estudio abre un promisorio campo de investigación comparativa en aprendizaje olfativo en insectos sociales.

Palabras Clave: Abejas sin aguijón – *Melipona* – Aprendizaje asociativo – Aprendizaje social-Comunicación

## Biology of behavior of nectar foraging bees: a comparative study between stingless and honey bees.

### ABSTRACT

Within the Apidae family, the meliponini tribe includes more than 350 stingless bee species. These bees present a wide repertoire of foraging and communication behaviour. Even though they are closely related to the honeybee, which is the best studied invertebrate study model regarding cognition, so far there are little descriptions of stingless bees' learning abilities. The main goal of this thesis was to develop comparative studies of those abilities and correlate them with their foraging and communication strategies. To achieve that we used for the first time in stingless bees the classical PER (Proboscis Extension Response) conditioning protocol that allows the evaluation of olfactory learning in controlled laboratory conditions. The bee species we worked with showed differences in their ability to solve a differential conditioning olfactory task. Based on their performance in this protocol we discuss the relevance of olfactory information during foraging for each bee species.

Particularly with *Melipona quadrifasciata* bees we studied the transmission of olfactory information in the social context inside the hive. We observed that this bee species is able to learn from a nestmate (social learning). We also determined that the olfactory information acquired inside the hive can be evoked later on in an artificial learning paradigm, showing that they are able to transfer information between different contexts.

The production of vibrations when returning from a successful foraging trip is part of many stingless bees' foraging strategies. We assessed the vibrations that occurred during food transfer between nestmates in *Melipona quadrifasciata*. These vibrations appear to affect the establishment of the odor-reward association.

The incorporation of stingless bees as study models opens a promising field of comparative research of olfactory learning in social insects.

Key words: Stingless bees – Melipona – Associative learning – Social Learning - Communication

Yo también te quiero pá

## Agradecimientos

Después de tantos años y tanto trabajo compartido se hace difícil en una carilla agradecer todo lo que haría falta a tanta gente.

Mi más profundo agradecimiento es para Walter, a quien va dedicada esta tesis. Más que un director ha sido un guía en toda esta odisea. Gracias por el apoyo y la contención en tiempos difíciles. Gracias por tener la paciencia de sentarse conmigo a ver “a donde estamos yendo” cada vez que me sentí perdida. Gracias por emocionarse con cada resultado que yo creí espantoso y contagiarme esa emoción por la vida de las abejas. Gracias por dejarme siempre las puertas abiertas en su laboratorio (aunque sea para hacer un post-post-postdoc!).

Gracias a Roxy quien me inició en el camino de los insectos sociales.

Gracias a Andrés (Apisman) por estar siempre ahí para discutir resultados, experimentos y planes. Por estar siempre dispuesto a un mate con tortilla de grasa.

Gracias a Vane, que hubiera sido de esta tesis sin su amor por las estadísticas! Gracias por las salidas, los Gin & Tonic y el acompañamiento terapéutico siempre que fue necesario.

Gracias a Gaby, por el cariño incondicional y los abrazos cotidianos.

Gracias a Pau por su estilo estético y sus habilidades con el Corel que salvo más de un poster de ser un espanto!

Gracias a Sol y Gonza por ser compañeros en el altillo. Nunca un teléfono tuvo tanta onda como nuestro bati-teléfono! (tenemos pendiente la campana sanguchera!)

Gracias a Agus por estar siempre ahí, atenta a como andaban las cosas. Gracias por acompañarme al taller de neurociencias en el que... vos me entendés.

Gracias a Fran: de Pancho en adelante todo fue cuesta arriba!

Gracias al suizoman Chris, por enseñarme que los suizos tienen un irónico sentido del humor!

Gracias a mi madre y hermanas (Clar y Ailun) por ser el sostén de mi vida, en las buenas y en las que no lo son tanto. Todo esto no hubiera sido posible sin ustedes!

Gracias a Mariano, que se bancó compartir la vida conmigo durante la “escritura de tesis”, con TODO lo que ello implica.

Gracias a Klaus Hartfelter que me recibió en su laboratorio en Brasil para hacer gran parte de los experimentos de esta tesis.

Gracias a Michel Hrcir por dejarme trabajar con sus abejas sin aguijón y por compartir cafés, cigarrillos, y teorías inventadas a fuerza de horas en el alimentador.

Y con tanto viaje a Brasil, gracias a todos aquellos que ayudaron a sobrellevar la estadía lejos de casa, siempre dispuestos a una cerveza o un Churrasco (Juan Manuel, Omar y toda la comunidad Colombiana en Ribeirao, Dirk, Cristiano, José, la gente del departamento de Genética de la USP, y las chicas de la facultad de Filosofía de la USP).

## Índice

Listado de abreviaturas .....	9
<b>Introducción</b> .....	10
Aprendizaje .....	10
La respuesta de extensión de probóscide (REP) .....	11
Aprendizaje no asociativo.....	11
<i>Sensibilidad Gustativa: Umbrales de Respuesta al azúcar (URA)</i> .....	12
Aprendizaje asociativo .....	13
<i>Estudios de condicionamiento en abejas</i> .....	14
<i>Condicionamiento clásico REP</i> .....	15
Neuromodulación de los URA y del aprendizaje: las aminas biogénicas .....	15
Las abejas nativas sin aguijón .....	17
<i>Distribución geográfica de las abejas nativas y su convivencia con la abeja africanizada</i> .....	18
<i>La recolección de recursos</i> .....	20
<i>Estrategias de recolección</i> .....	21
<i>Comunicación en las abejas sin aguijón</i> .....	21
<b>Objetivos e hipótesis</b> .....	24
<b>Metodologías Generales</b> .....	26
Animales .....	26
Sensibilidad gustativa al azúcar: Umbrales de Respuesta al Azúcar (URA) .....	26
Análisis de los datos y estadística .....	30
Aprendizaje olfativo: Condicionamiento diferencial REP .....	31
Condicionamiento clásico absoluto vs. diferencial .....	31
Condicionamiento diferencial del tipo olfativo .....	31
Análisis de los datos y estadística .....	33

## PARTE I: Condicionamiento olfativo en abejas nativas

<b>Capítulo I: Estudio comparado sobre el aprendizaje olfativo en abejas nativas sin aguijón y la invasora abeja melífera africanizada.....</b>	<b>36</b>
Materiales y métodos.....	38
Resultados.....	41
<i>Sensibilidad gustativa al azúcar .....</i>	41
<i>Condicionamiento diferencial REP.....</i>	43
<i>Comparación entre especies.....</i>	44
<i>Duración del estímulo Olfativo.....</i>	47
Discusión .....	51
<b>Capítulo II: Aprendizaje olfativo y el efecto de las experiencias olfativas previas en la abeja <i>Tetragonisca angustula</i>.....</b>	<b>56</b>
Materiales y métodos .....	57
Resultados .....	63
<i>Influencia de las experiencias olfativas apetitivas en la elección de alimento ....</i>	63
<i>Condicionamiento clásico REP.....</i>	65
Discusión .....	67
<b>Capítulo III: Efecto de la Octopamina en el aprendizaje olfativo de la abejas <i>Melipona scutellaris</i> .....</b>	<b>73</b>
Materiales y métodos .....	75
Resultados .....	77
<i>Efecto de la ingestión de OA en la gustativa.....</i>	77
<i>Efecto de la OA en el aprendizaje asociativo .....</i>	78
Discusión .....	80

## PARTE II: Interacciones sociales e el contexto de recolección de recursos y reclutamiento en abejas nativas

<b>Capítulo IV: Transferencia de información olfativa en la abeja <i>Melipona quadrifasciata</i> .....</b>	<b>86</b>
Materiales y métodos .....	88
Resultados .....	92



<i>Serie experimental I: ofrecimiento de alimento aromatizado dentro de la colmena</i> .....	92
<i>Serie experimental II: transferencia de alimento aromatizado durante la recolección de recursos</i> .....	95
<i>Serie experimental III: Condicionamiento clásico 24 horas después de recolectar solución aromatizada</i> .....	97
Discusión .....	98
<b>Capítulo V: Las vibraciones recibidas durante la trofalaxia modulan la formación del vínculo olor-recompensa</b> .....	102
Materiales y métodos .....	105
Resultados .....	110
<i>Vibraciones durante la trofalaxia</i> .....	110
<i>Sensibilización gustativa</i> .....	113
<i>Condicionamiento diferencial olfativo</i> .....	114
<i>Correlación entre las vibraciones y el aprendizaje olfativo durante la trofalaxia</i> .....	116
Discusión .....	122
<b>Conclusiones Generales</b> .....	127
<b>Referencias</b> .....	133

## Listado de abreviaturas

**EC:** Estímulo Condicionado

**EC+:** Estimulo condicionado recompensado

**EC-:** Estímulo condicionado no recompensado

**EI:** Estímulo Incondicionado

**FEN:** Fenilacetaldehído. Es un olor puro floral

**FEN+:** Condicionamiento diferencial en el que el olor recompensado era FEN

**LIO:** Linalol. Es un olor puro floral

**LIO+:** Condicionamiento diferencial en el que el olor recompensado era LIO

**NON:** Nonanal. Es un olor puro floral

**OA:** Octopamina. Es una amina biogénica

**OCT:** 2-Octanol. Es un olor puro floral

**RE:** Respuesta Espontánea a los olores del condicionamiento

**REP:** Respuesta de Extensión de la Probóscide

**RI:** Respuesta Incondicionada

**URA:** Umbral de Respuesta al Azúcar

## Introducción

Entre los insectos existen algunas especies como las termitas, las hormigas, y algunas abejas y avispa, que son consideradas eusociales, es decir que se organizan en colonias donde existe una división reproductiva del trabajo, un cuidado cooperativo de la cría y una superposición de generaciones (Michener, 1969; Wilson, 1971). Estos insectos presentan una alta complejidad en la organización de la colonia y en las actividades que desarrolla cada individuo (Wilson, 1971). Los insectos en general han resultado ser importantes modelos de estudio en cuestiones de aprendizaje y memoria tanto a nivel comportamental como neurofisiológico (Menzel, 1999; Carew, 2000). Los insectos sociales en particular permiten también el estudio de cuestiones relacionadas con la comunicación, el aprendizaje social y la transferencia de información. El modelo por excelencia para estos estudios ha sido siempre la abeja *Apis mellifera* (Menzel, 1999; Giurfa, 2007). Sin embargo existen otras abejas que presentan un alto o avanzado comportamiento social: las abejas nativas sin aguijón que forman la tribu Meliponini. Estas abejas presentan una alta diversidad en el número de especies y en su repertorio comportamental lo que presenta una buena oportunidad para el desarrollo de estudios comparados. En las palabras de Randolph Menzel: *“We learn from similarities and differences when we compare species, and we only recognize general mechanisms when we discover them all over again”*.

## Aprendizaje

El aprendizaje se define como un cambio en el comportamiento como consecuencia de la experiencia (Carew, 2000). Esta plasticidad en el comportamiento resulta esencial en la vida de las abejas. Al salir en búsqueda de alimento las abejas recolectoras deben recordar la ubicación de su colmena y de las diferentes fuentes de alimento disponibles en ese momento. Al llegar a una flor deben reconocerla y aprender las claves y estímulos de diferentes modalidades sensoriales que le permitan retornar a la misma para asegurar una recolección eficiente y sostenida en el tiempo.

Se definen dos grandes categorías en lo que respecta al aprendizaje: por un lado, el aprendizaje no asociativo en el que el individuo aprende acerca de las características de un único estímulo que, como consecuencia de sucesivos encuentros con el mismo, puede generar cambios en la conducta del animal (Squirre y Kandel, 1999). Por otro lado, el aprendizaje asociativo el cual surge al establecer la asociación entre dos estímulos contingentes. Este tipo

de asociaciones permite establecer relaciones predictivas entre eventos que coexisten en el medio ambiente y de este modo reducir la incertidumbre del animal (Mackintosh, 1994).

Ambos tipos de aprendizaje han sido estudiados extensamente utilizando como modelo a la abeja melífera (Menzel, 1999; Giurfa, 2007). Si bien son muchos los diferentes protocolos y medidas utilizadas en el estudio del aprendizaje de las abejas, la respuesta de extensión de probóscide (REP) ha sido incluida en muchísimos protocolos con los que se estudia un amplio rango de cuestiones relacionadas con el aprendizaje.

### **La respuesta de extensión de probóscide (REP)**

Cuando una abeja contacta sus antenas o tarsos con una solución azucarada responde de forma refleja extendiendo su probóscide. En condiciones naturales este reflejo es parte del comportamiento de recolección y le permite a las abejas obtener el néctar en las flores. En 1944 Frings adaptó la REP para el trabajo de bioensayos en condiciones de laboratorio. Para ello inmovilizaba a las abejas y contactaba sus antenas con solución azucarada, con lo que lograba evocar la REP. Desde entonces este bioensayo ha sido utilizado frecuentemente y ha resultado una herramienta clave para el estudio de muchas áreas del comportamiento de las abejas. Por ejemplo la REP permite evaluar la sensibilidad al azúcar de los individuos (Page *et al.*, 1998; Pankiw y Page, 2000) que está relacionada con la propensión a responder a muchos otros estímulos sensoriales (Scheiner, 2004; Erber *et al.*, 2006) y es interpretada como una medida del estado interno del individuo (Hammer y Menzel, 1995; Menzel, 1999). También se ha utilizado para estudiar cuestiones relacionadas con el aprendizaje olfativo (Kuwabara, 1957; Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983; Smith, 1991; Sandoz *et al.*, 1995). Este protocolo de aprendizaje olfativo de REP ha resultado ser extremadamente poderoso dando acceso a un trabajo controlado en el laboratorio y ha permitido ahondar incluso en aspectos relacionados con la genética del aprendizaje (Brandes *et al.*, 1988), así como en las bases neuronales del aprendizaje (Menzel, 1999) y de la memoria (Erber *et al.*, 1980; Menzel, 1984).

### **Aprendizaje no asociativo**

Como mencionamos anteriormente durante los procesos de aprendizaje no asociativo, el individuo aprende acerca de las características de un único estímulo que, luego de ser presentado sucesivas veces, genera cambios en la conducta del animal (Squire 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). Un ejemplo de este tipo de aprendizaje es el “priming”

sensorial que produce una respuesta en menor tiempo o sesgada hacia un estímulo particular producto de su exposición previa al mismo (Schacter y Buckner, 1998; Giurfa, 2003; Bouton y Moody, 2004). En este proceso no se establecen relaciones específicas de aprendizaje, sino que los individuos almacenan las propiedades físicas del estímulo en una memoria implícita de corto término que posteriormente sesga sus respuestas a ese estímulo (Giurfa, 2003). Otro ejemplo típico de aprendizaje no asociativo es la sensibilización que consiste en 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) aunque la exposición repetida o un aumento en la fuerza del estímulo pueden conducir a una sensibilización de largo término (Pinsker *et al.*, 1973; Walters, 1987). En oposición al “priming” sensorial que es específico para el estímulo previamente encontrado, la sensibilización afecta a un rango amplio de respuestas. Es decir, luego de la sensibilización con un estímulo específico se produce un aumento en la propensión a responder a muchos otros estímulos (Carew, 2000). En las abejas melíferas una forma de evaluar su grado de sensibilización es midiendo su sensibilidad gustativa al azúcar.

### ***Sensibilidad gustativa: Umbrales de respuesta al azúcar (URA)***

Varios aspectos del comportamiento de recolección de alimento (Page *et al.*, 1998) y del aprendizaje asociativo (Scheiner *et al.*, 2001) se correlacionan con la respuesta de los individuos al estímulo de azúcar. El valor URA es aquella mínima concentración de solución azucarada capaz de evocar en las abejas la REP (Page *et al.*, 1998). Existen individuos que extienden la probóscide al contactar las antenas con agua y otros que sólo lo hacen a mayores concentraciones de solución azucarada. La forma de medir estos umbrales de respuesta es presentando concentraciones crecientes de solución azucarada y registrando la mínima concentración a partir de cual una abeja comienza a responder extendiendo su probóscide (Page *et al.*, 1998).

El análisis del nivel de respuesta al azúcar ha resultado una herramienta sumamente útil. Se ha visto que los URA están basados en componentes genéticos y pueden sesgar el tipo de alimento a recolectar: los individuos que tienen bajo URA son recolectores de polen mientras que aquellos con un alto URA son recolectores de néctar (Pankiw y Page, 2000; Pankiw *et al.*, 2004). No solo existen componentes genéticos que determinan el URA de un individuo, sino

que también se ha visto que pueden modularse dependiendo de la concentración de azúcar de la solución azucarada que ingirieron las abejas previamente: abejas alimentadas con altas concentraciones de solución azucarada presentan mayores URA que aquellas alimentadas con bajas concentraciones de azúcar (Pankiw *et al.*, 2001, 2004).

A nivel neurofisiológico, la respuesta al azúcar parece estar controlada por un grupo de interneuronas VUM (“ventral unpaired median interneuron”) cuyos somas se ubican en el ganglio subesofágico (Kreissl *et al.*, 1994; Schroeter *et al.*, 2006). Particularmente se ha focalizado en el estudio de la neurona VUMmx1 (“ventral unpaired median interneuron of maxillary neuromere 1”). Esta neurona responde con una larga ráfaga de potenciales de acción al contactar la probóscide o las antenas con solución azucarada (Hammer, 1993, 1997). Además inerva los neuropilos del cerebro involucrados en el procesamiento de olores como son el lóbulo antenal, el protocerebro lateral y los cuerpos pedunculados (Hammer, 1993). La misma, junto con las otras neuronas VUM son la mayor fuente del neurotransmisor octopamina en el cerebro de la abeja (Hammer, 1997; Schroeter *et al.*, 2006). Es por esto que numerosos estudios farmacológicas han evaluado el rol modulador de la octopamina tanto en la sensibilidad al azúcar como en el aprendizaje asociativo (Mercer y Menzel, 1982; Menzel, 1992; Hammer, 1997; Scheiner *et al.*, 2002; Scheiner *et al.*, 2006)

Por todo lo expuesto anteriormente resulta claro que la sensibilidad gustativa al azúcar esta fuertemente relacionada tanto con el aprendizaje no asociativo como con el asociativo que utiliza la respuesta REP al azúcar (Scheiner, 2002). Se ha visto que abejas con altos niveles de respuesta al azúcar llegan a mayores niveles de adquisición y muestran menor extinción que los individuos con baja respuesta al azúcar (Page y Erber, 2002). Estas correlaciones hacen que el nivel de respuesta al azúcar permita predecir los diferentes comportamientos de la abeja.

### **Aprendizaje asociativo**

Dada la complejidad de los ambientes naturales, los animales requieren la integración de información de sus entorno, las cuales se presentan en diferentes modalidades sensoriales, para formar memorias que les permitan predecir eventos relevantes (Mackintosh, 1994). Esta integración es posible gracias al aprendizaje asociativo, que consiste en el establecimiento de relaciones predictivas entre eventos que coexisten en el medio ambiente y permiten al animal reducir su nivel de incertidumbre (Menzel, 1993). El ejemplo más simple de este tipo de asociaciones es el condicionamiento simple. Durante este proceso 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 es capaz por sí mismo de generar una respuesta refleja en el individuo. Al establecer un vínculo entre ambos estímulos durante el condicionamiento, el animal puede anticipar su respuesta refleja con la sola presentación del EC. El condicionamiento simple es un tipo de aprendizaje asociativo en el que se reconocen dos formas: (1) el condicionamiento clásico o pavloviano (Pavlov, 1927), en donde los animales aprenden a asociar un EC (por ejemplo: un olor) con el 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, volar hacia una fuente y obtener alimento). Ambos tipos de aprendizaje en su versión más simple se basan en el establecimiento de vínculos que conectan dos eventos específicos y no ambiguos en la vida del animal, es por esto que se los cataloga como aprendizajes elementales (Hall y Halliday, 1998). La fuerza del vínculo establecido entre ambos estímulos varía mucho 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 (Bitterman *et al.*, 1983; Rescorla, 1988; Bhagavan y Smith, 1997).

#### *Estudios de condicionamiento en abejas*

Las abejas melíferas han resultado ser un buen modelo para desarrollar estudios de ambas formas de condicionamiento. En los estudios de condicionamiento operante en general se permite el libre vuelo de los individuos y la elección entre estímulos (Lindauer, 1963; von Frisch, 1967; Menzel *et al.*, 1974; Bitterman *et al.*, 1988; Menzel, 1990; Greggers y Menzel, 1993). Este enfoque permite un manejo más natural de los sujetos experimentales, con una escasa manipulación de los individuos pero también con poco control de la situación experimental (duración de los estímulos, tiempo entre estímulos, etc.) (Mauelshagen y Greggers, 1993). Otros protocolos que permiten estudiar el proceso de condicionamiento operante en abejas son el laberinto en Y (Giurfa, 1996) y el odómetro (Sandoz *et al.*, 2000). Incluso en su trabajo con abejas sin aguijón Isaías Pessotti y sus colaboradores lograron que las abejas manejaran una palanca para poder obtener alimento (Pessotti, 1981; Pessotti y Senechal, 1981; Pessotti y Carli Gomes, 1981).

En lo que respecta al condicionamiento clásico, el protocolo que mayor uso ha tenido es el condicionamiento que utiliza la REP como EI. Este protocolo ha permitido realizar condicionamientos con estímulos visuales (Kuwabara, 1957), táctiles (Scheiner *et al.*, 2001) y olfativos (Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983). El hecho de encepar a las abejas para realizar

este condicionamiento permite un control preciso de los diferentes parámetros del protocolo (Mauelshagen y Greggers, 1993).

#### *Condicionamiento clásico REP*

En lo que se refiere al aprendizaje olfativo ha quedado demostrado que es posible utilizar la REP para llevar a cabo ensayos de condicionamiento clásico (Kuwabara, 1957; Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983). La metodología básica consiste en amarrar las abejas para limitar los movimientos pero permitir la movilidad de las antenas y piezas bucales (Frings, 1944)(Figura I.1). En estas condiciones es posible presentar de forma ordenada los diferentes estímulos. Se comienza con la presentación de un olor que funciona como estímulo neutro que inicialmente no genera REP. Este olor se presenta de modo contingente con el contacto de solución azucarada en las antenas que sí genera REP por lo que se lo denomina EI. A partir de la repetida presentación pareada de ambos estímulos, seguida de la ingesta de la solución azucarada que funciona como recompensa, el estímulo neutro es asociado con dicha recompensa. Este estímulo ahora está condicionado (EC) y es capaz por sí mismo de evocar una respuesta REP que es ahora una respuesta condicionada (RC).

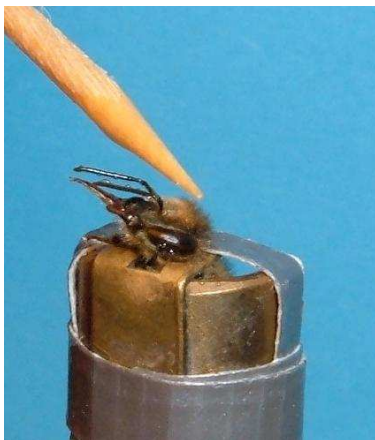


Figura I.1: Abeja melífera encepada. Esta preparación permite tener un control fino de la estimulación que reciben los individuos. Se puede ver la respuesta REP luego de haber contactado las antenas con solución azucarada.

#### **Neuromodulación de los URA y del aprendizaje: las aminas biogénicas**

Dado que durante el condicionamiento REP un estímulo neutro puede ser condicionado por la presentación contingente de una recompensa de azúcar, resulta fundamental la percepción que tiene la abeja de la solución azucarada. Como mencionamos anteriormente esta percepción del azúcar esta mediada por las neuronas de la familia VUM (Hammer *et al.*, 1993, 1997; Schroeter *et al.*, 2006). Estas neuronas disparan fuertes ráfagas de potenciales de acción como respuesta al contacto de las antenas o tarsos con azúcar y utilizan como



neurotransmisor la amina biogénica Octopamina (OA) (Hammer *et al.*, 1993, 1997). Las aminas biogénicas son compuestos orgánicos derivados del amonio sintetizadas por animales y plantas y frecuentemente están involucradas en procesos de señalización (Purves *et al.*, 2004). Tanto en vertebrados como en invertebrados regulan múltiples funciones en el sistema nervioso central y periférico y participan en la modulación y el control de comportamientos complejos (Purves *et al.*, 2004; Scheiner *et al.*, 2006). En la abeja melífera las aminas biogénicas actúan como importantes neuro-moduladores, neurohormonas y neurotransmisores (Scheiner *et al.*, 2002). El efecto de las aminas se puede ver en un amplio espectro de comportamientos que incluye: respuestas reflejas, sensibilidad sensorial, diferentes tipos de aprendizaje asociativo y la formación de memorias (Scheiner *et al.*, 2002). Tanto los URA como el nivel de aprendizaje en el paradigma REP son susceptibles de ser modulados por las aminas biogénicas (Scheiner *et al.*, 2002).

Existen aminas como la dopamina, serotonina e histamina que están presentes tanto en vertebrados como en invertebrados. Existen otras, como la fenolamina tiramina y la OA, que solo se encuentran en invertebrados y cumplirían las funciones que en vertebrados se les asignan a la norepinefrina y epinefrina (Scheiner *et al.*, 2002). Si bien en el cerebro de la abeja melífera la OA está presente solo en bajas dosis, modula varios tipos de comportamientos. Está involucrada por ejemplo, en la iniciación del comportamiento de recolección y en la división de tareas dentro de la colonia a través de la modulación de la sensibilidad a modalidades de estímulos específicos (Barron *et al.*, 2002; Schultz y Robinson, 2001). Además la OA controla el aprendizaje y la formación de memorias ya que aumenta tanto la adquisición como la evocación de las memorias asociativas (Hammer y Menzel, 1998; Farooqui *et al.*, 2003). Scheiner y colaboradores (2002) han planteado que el aumento en el aprendizaje REP se puede deber a que la OA modula el nivel de respuesta al azúcar que en este tipo de condicionamiento funciona como la recompensa.

La gran mayoría de éstos estudios farmacológicos hechos en abejas se han realizado con la especie *Apis mellifera* y unos pocos han sido realizados con abejorros (Cnaani *et al.*, 2003). Hasta la fecha no existen trabajos que estudien el rol de la octopamina en las abejas sociales sin aguijón.

## Las abejas nativas sin aguijón

Dentro de la familia *Apidae* las únicas abejas que son consideradas verdaderamente sociales son las que conforman la tribu *Apini*, a la que pertenece la abeja melífera y está conformada por 11 especies agrupadas en un único género, y la tribu *Meliponini* que incluye a las abejas sin aguijón y está conformada por más de 350 especies distribuidas en 36 géneros (Michener, 2000). Las abejas sin aguijón habitan en aéreas tropicales y subtropicales de todo el mundo (Camargo y Pedro, 1992). El tamaño de los individuos adultos de la casta obrera de los melipónidos varía desde los 2 mm de largo del cuerpo en el género *Trigona*, hasta 2 cm en *Melipona*, una longitud similar a la de *Apis mellifera*. En nuestro estudio trabajamos con tres géneros de abejas sin aguijón: *Melipona* (*Melipona quadrifasciata* y *Melipona scutellaris*), *Scaptotrigona* (*Scaptotrigona aff. depilis*) y *Tetragonisca* (*Tetragonisca angustula*)(Figura 1.2)

Figura 1.2: Fotos de las especies de abejas estudiadas en esta tesis. a) *Melipona scutellaris*: a la izquierda un ejemplar de una colección entomológica y a la derecha una vista al interior de la colmena; b) *Melipona quadrifasciata*: a la izquierda un individuo y a la derecha una vista interior de la colmena; c) *Tetragonisca angustula*: a la izquierda un individuo en una flor y a la derecha una vista de la entrada de la colmena; d) *Scaptotrigona aff. depilis*: a la izquierda individuos en una flor y a la derecha una vista de la entrada de la colmena;

a- *Melipona Scutellaris*



b- *Melipona quadrifasciata*



c- *Tetragonisca angustula*d- *Scaptotrigona aff. depilis*

#### *Distribución Geográfica de las abejas nativas y su convivencia con la abeja africanizada*

En el continente americano existe una gran diversidad de abejas sin aguijón que se despliegan desde México hasta el centro-norte de Argentina (Michener, 2000) (Figura 1.3). Esta distribución la comparte también la abeja africanizada (*Apis mellifera*) (Figura 1.4). La línea de abejas africanizadas surgieron como un híbrido entre las abejas melíferas europeas que fueron introducidas en el continente americano en sucesivas oleadas desde el siglo XVI (Sheppard, 1989; Schneider *et al.*, 2004) y abejas melíferas de origen africano (*Apis mellifera scutellata*) que fueron introducidas en Brasil en 1956 (Schneider *et al.*, 2004). A través de dicha

hibridación la abeja africanizada ha ido colonizando las áreas neotropicales del continente americano (Harrison *et al.*, 2006; Whitfield *et al.*, 2006). En la actualidad presentan una distribución que va desde el norte de Argentina hasta el sur de Estados Unidos. Como consecuencia de esta expansión ahora comparten la distribución de las abejas nativas y compiten por los recursos existentes (Roubik, 1992; Biesmeijer y Slaa, 2004; Slaa *et al.*, 2006). Este hecho permite realizar estudios comparados entre especies de abejas que están emparentadas evolutivamente y además presentan diferentes estrategias de obtención de recursos en un ambiente común a ambas.

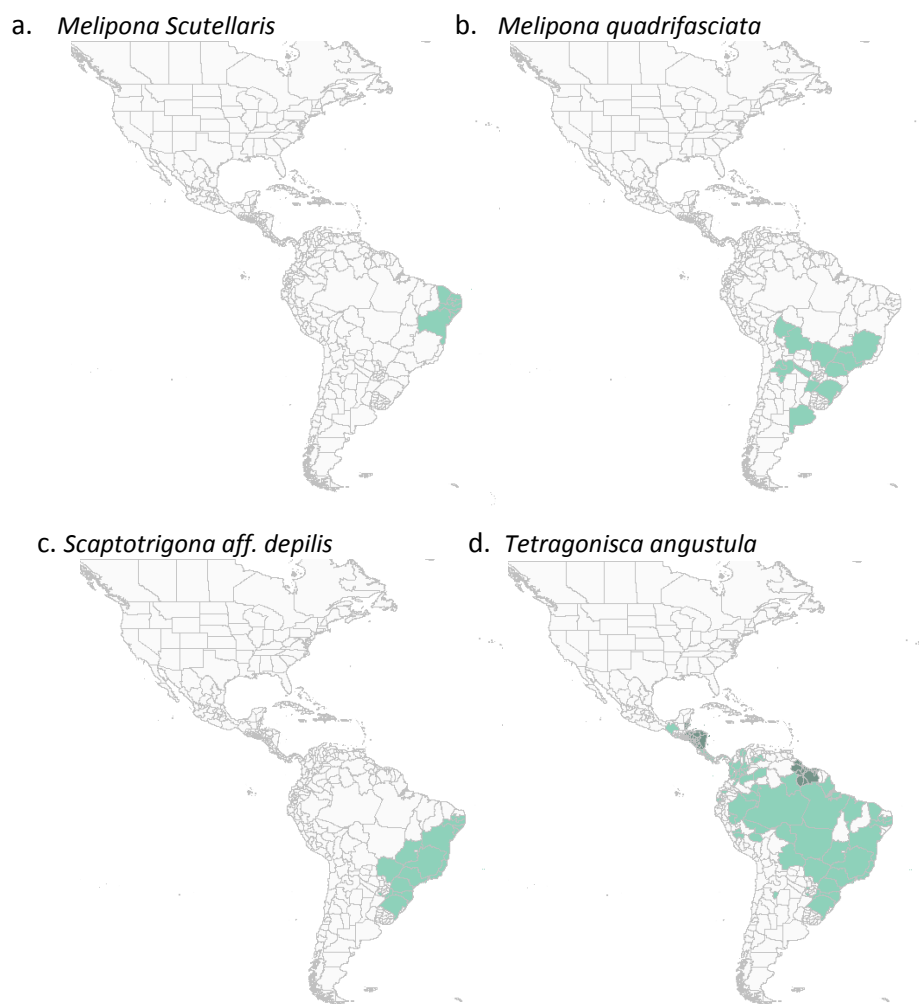


Figura I.3: Mapas de distribución de diferentes especies de abejas sin aguijón en el continente americano. a. Mapa de distribución de la abeja *Melipona scutellaris*; b. Mapa de distribución de la abeja *Melipona quadrifasciata*; c. Mapa de distribución de la abeja *Scaptotrigona aff. depilis*; d. Mapa de distribución de las abejas del género *Tetragonisca*. Fuente: Catálogo de abelhas Moure (<http://moure.cria.org.br/index>)



Figura 1.4: Abeja *Apis mellifera* recolectando néctar de una misma flor que una abeja sin aguijón (*Trigona spinipes*)

### *La recolección de recursos*

Los recursos que las abejas utilizan como fuente de energía son el néctar y el polen que obtienen de las flores (Michener, 2000). Las abejas sociales, tanto las melíferas como las abejas sin aguijón, son generalistas; es decir que pueden recolectar néctar y polen de diferentes especies de plantas (Wilms *et al.*, 1996; Wilms y Wiechers, 1997; Biesmeijer y Slaa, 2006). Sin embargo existe un fenómeno conocido como constancia floral que describe la existencia de “preferencias” dentro del espectro de plantas disponibles (von Frisch, 1967; Chittka *et al.*, 1999; Slaa *et al.*, 2003a). De este modo las especies de abejas que visitan un tipo de flor pueden ser diferentes de las que visitan otro. Si bien son muchos los factores que determinan la constancia floral, este es un proceso plástico en el que existe una fuerte influencia del aprendizaje y la memoria de cada individuo (von Frisch, 1967; Chittka *et al.*, 1999; Slaa *et al.*, 2003a). Cuando una abeja realiza un viaje de recolección exitoso adquiere información de las características de la flor que resultó productiva lo que le permite retornar a la misma (información interna) (Menzel y Greggers, 1992; Biesmeijer *et al.*, 1998). Además, al ser individuos sociales, existe también información provista por las compañeras de la colonia (información externa) (Biesmeijer *et al.*, 1998). Como consecuencia cada abeja que realiza un viaje de recolección integra la información interna con la información externa de modo de tomar decisiones individuales sobre cuándo y a qué flor ir a buscar alimento (Biesmeijer *et al.*, 1998; Biesmeijer y Emmers, 1999; Biesmeijer y Slaa, 2004). Los patrones de recolección son el resultado de las actividades acumuladas de cientos de individuos y si bien no existe un control central, la colonia funciona de forma coherente como un todo adaptando sus actividades de

forma flexible en respuesta a los cambios ambientales (Biesmeijer *et al.*, 1998; Biesmeijer y Slaa, 2004).

#### *Estrategias de recolección*

Las abejas sin aguijón al ser un grupo que incluye numerosas especies presenta también un amplio repertorio en las estrategias de recolección que utilizan. En un extremo existen especies como las abejas *Tetragonisca angustula* con estrategias de recolección solitaria (Johnson, 1983) que utilizan exclusivamente información interna o claves provistas inadvertidamente por las compañeras (olor en el cuerpo, presencia-ausencia de una compañera en una fuente de alimento) pero no cuentan con sistemas específicos de comunicación o reclutamiento (Aguilar *et al.*, 2005; Slaa *et al.*, 2003b). Otros ejemplos de abejas sin aguijón que presentan estrategias solitarias de recolección son las abejas *Frieseomellita varia* y *F. silvestri* (Lindauer y Kerr, 1958; Jarau *et al.*, 2003). En el otro extremo están las especies en las que la recolección de recursos se realiza a nivel grupal por medio de la actividad coordinada de las compañeras de la colmena, como por ejemplo aquellas pertenecientes a los géneros *Melipona* o *Scaptotrigona* (Lindauer y Kerr, 1958; Johnson, 1983; Jarau *et al.*, 2003; Barth *et al.*, 2008). La coordinación en las abejas sin aguijón se consigue por medio de complejas vías de comunicación de diferentes modalidades sensoriales (Nieh, 2004; Barth *et al.*, 2008).

#### *Comunicación en las abejas sin aguijón*

Las abejas sin aguijón, al igual que cualquier otro animal, a la hora de obtener alimento deben tomar decisiones sobre los recursos disponibles en el ambiente en ese momento. Para poder tomar dichas decisiones resulta crucial obtener información sobre las diferentes alternativas que le permitirán un mejor ajuste a la situación (Danchin *et al.*, 2004; Dall *et al.*, 2005). Existen dos grandes fuentes de información: la interacción directa del individuo con el ambiente (información personal o interna) o el monitoreo de las interacciones de otros individuos con el ambiente (información social o externa) (Dall *et al.*, 2005; Danchin *et al.*, 2004; Biesmeijer y Slaa, 2004). La adquisición de la información social puede estar mediada por claves, que son provistas de forma inadvertida por los individuos durante sus actividades, o por señales que son caracteres específicamente modelados por la selección para transmitir información (Danchin *et al.*, 2004; Dall *et al.*, 2005). La mayoría de las especies de abejas de la tribu Meliponini presentan actividades colectivas de recolección de recursos. La obtención de

información para lograr dicha actividad coordinada depende tanto de claves como de señales (Barth *et al.*, 2008).

Entre las claves más comúnmente utilizadas por las abejas sin aguijón se encuentran las marcas químicas depositadas al caminar sobre una fuente de alimento (Vila y Weiss, 1990; Schmidt *et al.*, 2003, 2005; Nieh *et al.*, 2004) o la presencia/ausencia de otra abeja (de la misma especie o no) en una fuente de alimento (Slaa *et al.*, 2003b; Vila y Weiss, 1990).

En las abejas sociales, además de claves, existen variados y sofisticados mecanismos de comunicación (Wilson 1971). Estos mecanismos han sido la base de numerosos estudios. El ejemplo más espectacular en lo que respecta a la comunicación animal corresponde a los descubrimientos de Karl von Frisch (1967) quien demostró la existencia de un lenguaje abstracto codificado en la danza de reclutamiento de las abejas melíferas. Hasta la fecha no existe información concluyente de que exista este tipo de lenguaje en las abejas sin aguijón, aunque existen debates al respecto (Nieh, 2004; Hrnčir *et al.*, 2006b).

En 1958 M. Lindauer y W. Kerr publicaron un trabajo en el que demostraban la gran capacidad de coordinación y comunicación de las abejas de la tribu Meliponini incluyendo variadas modalidades sensoriales (para un resumen ver Nieh, 2004). La utilización de la información olfativa de la fuente de alimento, por ejemplo, es común tanto a las abejas melíponas como las abejas melíferas. Tanto el olor del alimento en el cuerpo de la abeja recolectora, como la transferencia de alimento aromatizado dentro de la colmena permiten obtener ese tipo de información (Lindauer y Kerr, 1958; Kerr, 1960; Farina *et al.*, 2005). Además al retornar de un viaje de recolección exitoso muchas abejas sin aguijón realizan corridas agitadas en zig-zag dentro del nido (Jostling) que parecieran alertar a las compañeras a salir en búsqueda de alimento (Lindauer, 1956; Lindauer y Kerr, 1958; Kerr, 1960; Hrnčir *et al.*, 2000). Muchas veces estas corridas dentro del nido van acompañadas por producción de vibraciones que se transmiten tanto por el sustrato sobre el que están paradas las abejas como por el aire (sonidos) (Esch *et al.*, 1965; Esch, 1967a; Hrnčir *et al.*, 2006a). La comunicación en las abejas sin aguijón sin embargo no solo ocurre dentro de la colonia. Existen descripciones de guía directa a una fuente por una compañera (piloting) (Esch *et al.*, 1965; Esch, 1967b; Johnson, 1987). Además en muchas especies aparecen marcas de feromonas que van desde marcas que sólo quedan en la fuente de alimento hasta rastros completos desde la colmena a la fuente (Lindauer y Kerr, 1958; Wille, 1983; Kerr, 1994; Schmidt *et al.*, 2005; Schorkopf *et al.*, 2007).

Un uso tan variado de diferentes estrategias de comunicación durante la búsqueda de recursos, hace que las abejas sin aguijón resulten un grupo sumamente interesante para el desarrollo de estudios comparados.



## Objetivos e Hipótesis

El objetivo general de esta tesis es analizar las habilidades cognitivas vinculadas a la modalidad olfativa que tienen lugar durante la recolección individual y colectiva de recursos en abejas sociales nativas (melíponas) e introducidas (melíferas). Los aspectos a estudiar serán el aprendizaje asociativo del tipo olfativo así como el aprendizaje social mediado por las interacciones entre los individuos de una misma colonia.

### Nuestros objetivos particulares e hipótesis son:

- 1) **Analizar la capacidad de las distintas especies de abejas melíponas para ser condicionadas olfativamente dentro del paradigma de REP (Bitterman *et al.*, 1983).** Estos potenciales resultados permitirían un mejor entendimiento de las capacidades de aprendizaje olfativo dentro del género *Melipona* a través de un estudio comparativo entre especies.
- 2) **Correlacionar las habilidades de aprendizaje olfativo con las estrategias de recolección y reclutamiento de las abejas sin aguijón.** Nuestra *hipótesis* es que dependiendo de las diferentes estrategias de recolección de recursos y de reclutamiento de cada una, el aprendizaje del olor del alimento tendrá una relevancia diferente y deberíamos observar diferencias en sus habilidades de aprendizaje olfativo.
- 3) **Evaluar el rol de la Octopamina en el aprendizaje de las abejas sin aguijón *Melipona quadriasciata*.** El aprendizaje asociativo puede ser modulado por el estado interno de los individuos. En las abejas melíferas es conocido el rol de la Octopamina en la adquisición y retención de información (Schneider *et al.*, 2006; Farooqui *et al.*, 2003). Nuestra *hipótesis* es que debido a la cercanía filogenética entre las abejas melíponas y melíferas, los sustratos neurológicos del aprendizaje deberían ser similares, por lo que la Octopamina podría cumplir funciones similares a las que cumple en las abejas melíferas modulando el aprendizaje olfativo de las abejas melíponas.
- 4) **Evaluar si existe aprendizaje social en las abejas sin aguijón *Melipona quadriasciata*.** Durante el reclutamiento en las abejas melíferas la transferencia de alimento aromatizado permite a los individuos aprender el olor de la fuente que está siendo explotada por sus compañeras (Farina *et al.*, 2005). Este aprendizaje puede ser posteriormente evocado en un contexto artificial de aprendizaje como es el paradigma REP. En vistas de que las abejas *Melipona quadriasciata* también tienen contactos boca a boca en los cuales existe

transferencia de alimento nuestra *hipótesis* es que estas abejas deberían ser capaces de aprender el olor del alimento transferido y esperaríamos que fueran capaces de transferir esa asociación al contexto REP.

- 5) **Estudiar en las abejas *Melipona quadrifasciata* el efecto en el establecimiento del vínculo olor-recompensa, de las vibraciones recibidas durante la trofalaxia.** Durante los contactos trofalácticos realizados en el contexto de reclutamiento las abejas *Melipona* que transfieren el alimento líquido producen vibraciones con sus músculos torácicos (Lindauer y Kerr, 1958; Hrncir *et al.*, 2000, 2006b). Estas vibraciones correlacionan con la concentración de azúcar del alimento que está siendo recolectado (Hrncir *et al.*, 2004b). Nuestra *hipótesis* es que las vibraciones podrían estar funcionando sinérgicamente con el estímulo excitatorio durante la trofalaxia y esto podría modular la fuerza del vínculo entre el olor del alimento (estímulo condicionado) y la recompensa azucarada (estímulo incondicionado). De este modo, mayor cantidad de vibraciones mejorarían la adquisición de la información olfativa del alimento y esperaríamos poder evidenciarlo en el paradigma REP.

## Metodologías Generales

En esta sección se describen los procedimientos experimentales de una manera general. Luego se explica en cada capítulo como fueron aplicados estos métodos en cada experimento particular.

Los experimentos de esta tesis se llevaron a cabo en Argentina (AR) y en Brasil (BR). En Argentina trabajamos en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y en Brasil en el campus de Ribeirão Preto de la Universidade de São Paulo.

### Animales

Las especies de abejas estudiadas pertenecen todas al orden Hymenoptera y a la familia Apidae. Dentro de dicha familia estudiamos especies de dos tribus diferentes: por un lado trabajamos con abejas melíferas de la línea Africanizada de *Apis mellifera* (BR) que pertenece a la tribu Apini y por otro lado, de la tribu Meliponini que engloba a las abejas sin aguijón, trabajamos con las especies *Melipona quadrifasciata* (BR), *Scaptotrigona aff. depilis* (BR), *Melipona scutellaris* (BR) y *Tetragonisca angustula* (AR).

### Sensibilidad gustativa al azúcar: Umbrales de Respuesta al Azúcar (URA)

La sensibilidad al azúcar de las abejas está relacionada a una disposición general del sujeto a responder a estímulos de diferentes modalidades sensoriales (Scheiner, 2004; Erber *et al.*, 2006). Esta propensión a responder estaría asociada a un estado de activación general (arousal) (Hammer y Menzel, 1995; Menzel, 1999). Es por esto que la medida de la sensibilidad gustativa al azúcar resulta de gran utilidad como un indicador del estado interno de los individuos. En las abejas melíferas la estimación de dicha sensibilidad se hace utilizando la respuesta de extensión de la probóscide (REP). Al contactar las antenas o tarsos de los individuos con una pequeña gota de líquido, éstos presentan la respuesta refleja de extender la probóscide (REP) (Frings, 1944; Takeda, 1961). Dependiendo del estado interno del individuo esta respuesta se puede obtener estimulando con agua pura o con soluciones azucaradas de diferentes concentraciones. Aquella mínima concentración capaz de evocar esta respuesta refleja es considerada como el umbral de respuesta al azúcar (URA) del individuo (Page *et al.*, 1998; Pankiw y Page, 1999). El modo de encontrar aquella mínima concentración consiste en presentarle a cada individuo sucesivas soluciones azucaradas de concentración creciente y registrar a partir de cuál de ellas se obtiene una clara respuesta REP (Page *et al.*, 1998). Hasta

el presente trabajo esta metodología para evaluar los URA no había sido aplicada en abejas sin aguijón.

Para hacer las presentaciones ordenadas de las soluciones azucaradas se requiere restringir el movimiento de las abejas. Para ello cada individuo a ser evaluado era colocado en un tubo plástico. Dicho tubo se colocaba en un recipiente con hielo picado de modo de disminuir la temperatura de las abejas y de este modo disminuir su movilidad. Acto seguido eran colocadas en punteras plásticas de micro pipeta a las que se les había cortado la punta y se las aseguraba con finas tiras de cinta adhesiva por detrás del cuello y sobre el tórax. De este modo quedaba restringido el movimiento del cuerpo, pero mantenían la libre movilidad de las antenas y las piezas bucales (Frings, 1944) (Figura M.1). Al terminar de encephar a las abejas se las colocaba en fila en una plancha de telgopor para facilitar la posterior estimulación (Figura M.1). Una vez ubicadas en esta grilla se iba tocando secuencialmente las antenas de cada una con un palillo embebido en agua y a aquellas que extendían la probóscide se les acercaba el palillo a la boca y se les permitía beber a saciedad. De este modo esperamos poder estandarizar el nivel de sed que pudieran tener los individuos y que las respuestas posteriores a las soluciones azucaradas se deban solamente al azúcar y no a una necesidad de agua (Page *et al.*, 1998). A continuación se las colocaba en una incubadora (28° C, 60% de humedad relativa, oscuridad) durante una hora a fin de que en el momento de la evaluación de los URA fuera mínimo el nivel de stress producido por la manipulación durante el encepharado.

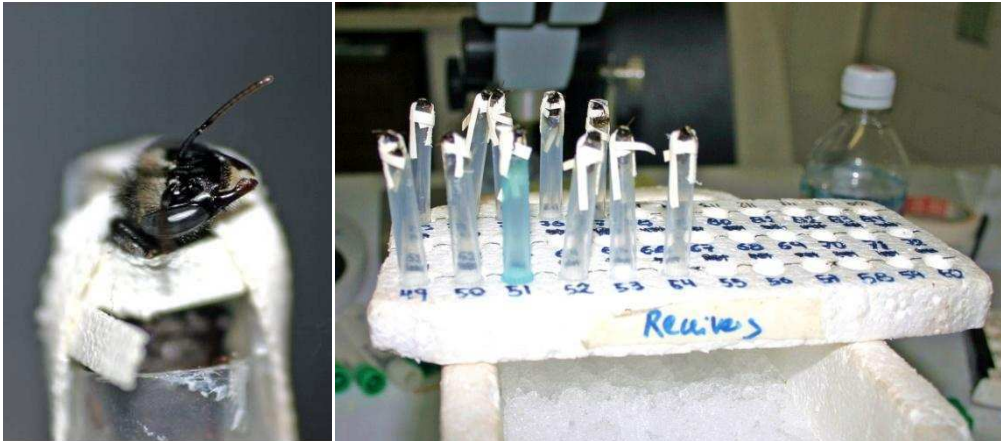
a- *Melipona quadrifasciata*b- *Scaptotrigona aff. depilis*c- *Scaptotrigona aff. depilis*

Figura M.1: Abejas sin aguijón encepadas para el trabajo en el laboratorio. a) Abejas *Melipona quadrifasciata*: foto de un individuo encepado y de un grupo alineados en un aplancha de telgopor para evaluar sus URA; b) Abejas *Scaptotrigona aff. depilis*: foto de un individuo encepado y de un grupo alineados en un aplancha de telgopor para evaluar sus URA; c) Con un palillo embebido en solución azucarada se contactan las antenas de las abejas encepadas de forma secuencial y se registra cuáles de ellas muestran respuesta REP (derecha).

Antes de comenzar con la evaluación de cada individuo se les volvió a ofrecer agua para beber con el fin de evitar respuestas motivadas por la sed a lo largo de todo el procedimiento.

Siguiendo el protocolo ya establecido por Page y colaboradores (1998) para las abejas melíferas se les ofrecieron a las abejas soluciones de sacarosa de concentración creciente: 0,1; 0,3; 1; 3; 10 y 30/ peso/peso (p/p). Al final de esta serie agregamos una solución más de 50% p/p a fin de extender el intervalo de medición y poder así incluir en el muestreo a aquellos individuos que tuvieran umbrales de respuesta muy elevados. Cada solución azucarada fue evaluada tocando las antenas de las abejas con un palillo embebido en la solución y registrando si esta estimulación evocaba la REP. Solamente se consideró como respuesta positiva aquellos casos en que las abejas abrían las mandíbulas y extendían plenamente la probóscide (Figura M.2). Para controlar el potencial efecto de sensibilización o habituación por la estimulación repetitiva con azúcar intercalamos el ofrecimiento de agua entre cada una de las soluciones azucaradas (Page *et al.*, 1998). Si alguna abeja respondía al ofrecimiento de agua se le permitía beber a saciedad. La solución azucarada de menor concentración capaz de evocar la REP fue considerada como el umbral de respuesta al azúcar (URA).

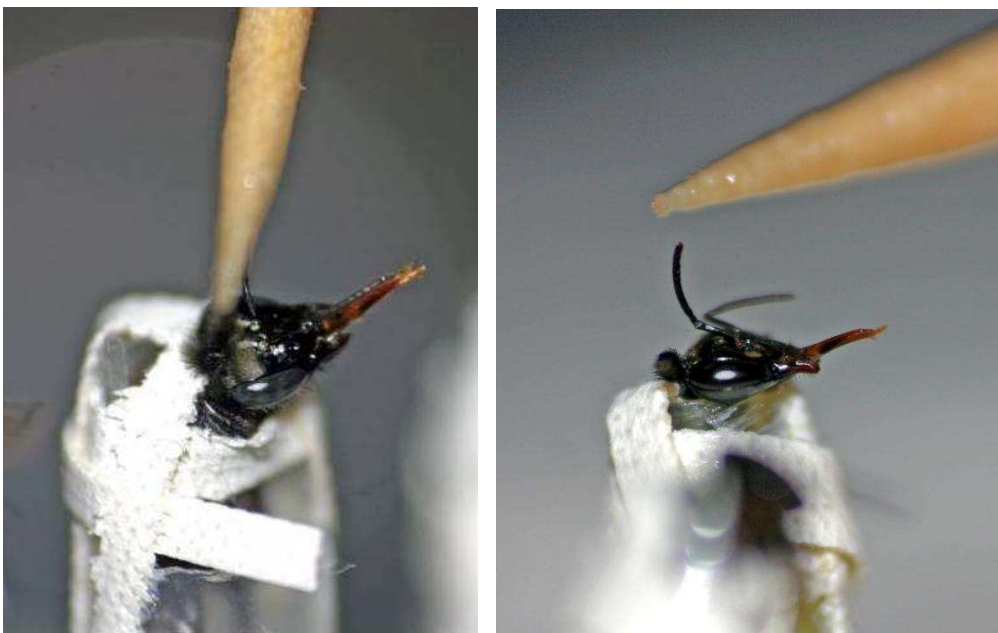


Figura M.2: Abejas sin aguijón mostrando la REP al contactar sus antenas con un palillo embebido en solución azucarada. A la izquierda una abeja de la especie *Melipona quadrifasciata* y a la derecha una abeja de la especie *Scaptotrigona aff. depilis*.

### *Análisis de los datos y estadística*

A fin de comparar los umbrales entre individuos de diferentes especies o con diferentes tratamientos decidimos cuantificar los URA a través de un **Puntaje URA**. Para el cálculo de dicho puntaje solo se tuvieron en cuenta aquellos individuos que habían respondido por lo menos a la solución más concentrada de 50% p/p de sacarosa. Aquellos individuos que no presentaron ninguna REP en todo el protocolo fueron excluidos del análisis. De este modo todos los individuos estudiados tenían la capacidad de respuesta a la estimulación con azúcar en las antenas y las diferencias solo se debían a sus umbrales de respuesta. Para el cálculo de puntaje URA registramos para cada individuo el número de concentraciones consecutivas de la serie a las cuales respondió. Esta medida se correlaciona con la concentración umbral ya que los individuos generalmente responden a todas aquellas concentraciones de solución azucarada por encima de la concentración umbral (Pankiw *et al.*, 2004). De este modo si una abeja respondía a la primera solución de la serie (0.1/ p/p) y a las siguientes 6 soluciones se le asignaba un puntaje URA de 7. En el otro extremo si la abeja solo respondía a la solución más concentrada (50/ p/p) entonces su puntaje URA era 1. Si bien los individuos una vez que responden a una determinada concentración de solución azucarada suelen responder a todas las siguientes de mayor concentración esto no es siempre así. Establecimos un criterio de tolerancia que permitía un salto de no-respuesta a una única concentración de la serie: es decir que una vez que la abeja comenzaba a responder si se “salteaba” una única solución teníamos en cuenta como umbral aquella primera concentración a la que había comenzado a responder; en cambio si el salto era de dos concentraciones entonces solo se calculaba el puntaje URA contabilizando las respuestas después del salto y se ignoraba aquella primera respuesta antes del salto. Como mencionamos anteriormente si una abeja no respondía a ninguna de las soluciones azucaradas (puntuación igual a cero) no era considerada en el análisis.

En vistas a que cada individuo tenía asignado un valor de puntaje URA que variaba entre 1 y 7 en el momento de comparar estadísticamente los resultados llevamos análisis de comparación de medianas de Kruskal-Wallis debido a que en la mayoría de los casos no se cumplían los supuestos necesarios como para realizar un análisis estadístico paramétrico (Sokal y Rohlf, 1995; Zar, 1999).

## **Aprendizaje olfativo: Condicionamiento diferencial REP**

En condiciones naturales, la respuesta refleja REP es parte del comportamiento de recolección de las abejas y les permite a los individuos obtener el néctar en las flores. En 1944 Frings utilizó esta respuesta en abejas encepadas para estudiar la ubicación de los órganos olfativos. Desde entonces este reflejo ha sido utilizado como respuesta incondicionada (RI) para diversos tipos de ensayos de condicionamiento clásico (Kuwabara, 1957; Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983).

### *Condicionamiento clásico absoluto vs. diferencial*

A lo largo de esta tesis utilizamos un protocolo de condicionamiento clásico del tipo apetitivo para evaluar las habilidades cognitivas de las abejas, su memoria, la circulación de información dentro de la colmena, etc. Un condicionamiento clásico absoluto consiste en la presentación sucesiva de un único estímulo a ser condicionado (EC) junto con la recompensa azucarada (EI). Durante un condicionamiento diferencial en cambio se presentan dos estímulos condicionados: uno de ellos asociado a una recompensa (estímulo condicionado recompensado, EC+) y el otro no (estímulo condicionado no recompensado, EC-) (Giurfa, 2003). Este protocolo diferencial demanda más esfuerzo del individuo, ya que debe aprender a discriminar entre los dos estímulos y a asociar sólo uno de ellos a la recompensa (Giurfa, 2003). Además, el hecho de requerir una respuesta a uno de los estímulos y una no-respuesta al otro, permite descartar la presencia de fenómenos de aprendizaje no asociativo, como la sensibilización que generarían un aumento indiscriminado en la respuesta a ambos estímulos (Hammer y Menzel, 1995). Es por todo esto que elegimos utilizar un protocolo diferencial y no uno absoluto a lo largo de la tesis.

### *Condicionamiento diferencial del tipo olfativo*

En nuestros experimentos trabajamos con olores florales puros como estímulos a ser condicionados (EC) y con solución azucarada como EI. Los olores utilizados eran todos componentes naturales de los aromas florales (Knudsen *et al.*, 1993) y fueron comprados a la empresa Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania.

El condicionamiento diferencial consistió en la presentación repetida de dos olores (EC+ y EC-). Para poder llevar a cabo este protocolo de condicionamiento encepamos a las abejas del mismo modo descrito anteriormente (en punteras plásticas que restringían el movimiento del cuerpo pero permitían el libre movimiento de las antenas y piezas bucales, Frings, 1944). Una



vez encephadas, dependiendo del experimento puntual, las dejábamos entre 1 y 2 horas en oscuridad antes de comenzar con el condicionamiento a fin de disminuir el nivel de stress generado durante el encephado. Antes de comenzar con el condicionamiento evaluábamos que las abejas tuvieran la RI de extender la probóscide al contactar las antenas con una solución azucarada 50% p/p. Sólo trabajamos con aquellos individuos que presentaran una clara REP durante todo el protocolo.

Para hacer la presentación de los olores se tomaba a una abeja y se la colocaba frente a un dispositivo que producía un flujo continuo de aire limpio de entre 30 y 50 ml/seg. Si alguna abeja respondía extendiendo la probóscide a la estimulación mecánica del flujo de aire limpio era descartada del protocolo. Por detrás de la abeja se colocaba un extractor de aire de modo que el aire a su alrededor estuviera siempre limpio. Para hacer la presentación de los olores el flujo de aire era re-dirigido, por medio de una electro válvula, para que pasara por una jeringa plástica que contenía un papel embebido en el olor floral a utilizar (4  $\mu$ l) antes de llegar a la abeja. De este modo para el individuo el flujo de aire limpio que recibía en la zona de la cabeza pasaba a estar aromatizado. Un ensayo estándar duraba 46 segundos durante los cuales el individuo recibía 20 segundos de flujo de aire limpio, 6 segundos de flujo con olor (EC) y 20 segundos nuevamente de aire limpio. En los ensayos recompensados (EC+), durante los últimos 3 segundos del EC se contactaba las antenas de la abeja con un palillo embebido en solución azucarada 50% p/p para que extendiera la probóscide y se le dejaba ingerir una gota de dicha solución (Bitterman *et al.*, 1983). En los ensayos no recompensados (EC-) solamente se presentaba el olor durante los 6 segundos. La presentación de los olores se hizo de forma ordenada de modo que todas las abejas recibían la primera estimulación con un olor, luego todas recibían la segunda estimulación, etc. Cada par de olores era presentado en 5 sucesivos ensayos de condicionamiento en los que se alternaba de modo pseudo-aleatorio el orden en que se presentaban los olores (La serie final quedaba como EC-,EC+, EC+, EC-, EC-, EC+, EC-, EC+, EC+, EC-). El intervalo entre dos presentaciones consecutivas era de 10-15 minutos dependiendo del número de abejas testada cada vez. Al final del condicionamiento se realizaba una evaluación de lo aprendido: quince minutos mas tarde de terminado el condicionamiento se les presentaban a las abejas ambos olores (EC+ y EC-) sin recompensarlos. Tanto durante el condicionamiento como en la evaluación sólo consideramos que las abejas presentaban una RC positiva cuando respondían exponiendo completamente la probóscide durante los primeros 3 segundos de la estimulación con olor sin necesidad de contactar sus antenas con la solución azucarada.

Si al comenzar con el condicionamiento y presentar por primera vez los olores alguna abeja respondía extendiendo la probóscide sin necesidad de contactar las antenas con la solución azucarada, se considera dicha respuesta como una respuesta espontánea (RE). Este tipo de respuestas suelen estar asociadas a experiencias apetitivas previas del individuo con dicho olor y muchas veces en las abejas melíferas se han tomado como medida para comprar el efecto de los tratamientos recibidos previamente (Gerber *et al.*, 1996; Sandoz *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2005; Grüter *et al.*, 2006; Arenas y Farina, 2008). En nuestro trabajo con las abejas sin aguijón la proporción de individuos que presentaban estas RE fue siempre muy baja. Por eso para poder evidenciar alguna posible asociación establecida por los tratamientos recibidos no nos quedamos con las RE, sino que realizamos todo el protocolo de condicionamiento completo, esperando de este modo evidenciar diferencias en la dinámica de adquisición dependientes de la historia previa del individuo (Chandra *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2009). Para poder comparar dichas dinámicas de adquisición desechamos aquellas pocas abejas que presentaban RE a fin de que todas comenzaran con la misma línea de base.

#### *Análisis de los datos y estadística*

En vistas de que el objetivo del condicionamiento diferencial era evaluar la capacidad de las abejas para aprender a responder diferencialmente sólo al EC+ y discriminarlo del EC- definimos un **Índice de Discriminación (ID)**. En cada uno de los cinco ensayos del condicionamiento se presentaban una vez el EC+ y el EC- en un orden variable. Si en el ensayo la abeja respondía solamente al EC+ le asignábamos un ID de valor +1, si sólo respondía al EC- le asignábamos un valor -1 y considerábamos que no existía discriminación (ID=0) cuando no respondía a ninguno de los olores o cuando respondía a ambos.

Al tener definido el ID para cada individuo en cada uno de los ensayos de condicionamiento pudimos analizar dos cosas: por un lado estudiar si a medida que se sucedían los ensayos de condicionamiento existía un aumento en la discriminación de los individuos; y por el otro lado nos permitió comparar el desempeño en el protocolo entre diferentes grupos de individuos. Para ello el análisis estadístico elegido fue la prueba de ANOVA de medidas repetidas de dos factores: un factor fueron los sucesivos ensayos de condicionamiento (factor ENSAYO: medidas repetidas con 5 niveles) y el otro factor era el grupo al que pertenecían los individuos (dependiendo de cada experimento el grupo podía ser la especie, la duración del estímulo, el tratamiento previo, entre otros). Los estudios de Monte Carlo han demostrado que es factible realizar un análisis de ANOVA con cuando los datos son dicotómicos bajo ciertas condiciones

(Lunney, 1970) que son cumplidas en nuestros análisis (por lo menos 40 grados de libertad en el término del error).

Las proporciones de respuestas al EC+ durante la evaluación en los diferentes grupos de individuos fueron comparadas por medio de una prueba exacta de Fisher (Sokal y Rohlf, 1995; Zar, 1999).

## **PARTE I: Condicionamiento olfativo en abejas nativas**

## **Capítulo 1: Estudio comparado sobre el aprendizaje olfativo en abejas nativas sin aguijón y la invasora abeja melífera africanizada.**

Los insectos en general, pero puntualmente la abeja melífera, han resultado modelos de estudio muy poderosos para analizar y esclarecer los principios que gobiernan el aprendizaje asociativo y la memoria a nivel comportamental, celular e incluso molecular (Hammer y Menzel, 1995; Menzel, 1999; Giurfa, 2007). Su importancia radica en que son capaces de aprender y establecer memorias de largo término en protocolos sencillos y robustos que permiten un manejo estandarizado dentro del laboratorio. Además presentan sistemas nerviosos relativamente simples que hacen posible ubicar los fenómenos asociativos en pequeñas redes neuronales, e incluso a neuronas únicas, permitiendo rastrear el procesamiento de la información desde los órganos sensoriales periféricos, hasta los procesos a nivel central (Hammer y Menzel, 1995; Menzel y Muller, 1996; Giurfa, 2006; Giurfa, 2007). Entre los protocolos de estudio utilizados, el condicionamiento clásico REP (Frings, 1944; Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983) ha sido uno de los más exitosos, ya que permite el estudio del condicionamiento simple bajo condiciones extremadamente controladas y además provee el acceso a los mecanismos fisiológicos subyacentes (Menzel, 1999).

Las abejas melíferas de líneas europeas fueron introducidas en América del norte y del sur en reiteradas oleadas desde el siglo dieciséis en adelante (Sheppard, 1989; Scheiner *et al.*, 2004). En la búsqueda de una línea de abejas mejor adaptadas a las condiciones tropicales en 1956 se introdujeron en el sur de Brasil reinas de abejas melíferas de origen africano (*Apis mellifera scutellata*). Estas abejas siguieron un proceso de hibridación con las de origen europeo (Scheiner *et al.*, 2004) hasta ocupar como línea híbrida la mayoría de las áreas Neotropicales así como algunas regiones templadas de Sud y Norteamérica (Harrison *et al.*, 2006; Whitfield *et al.*, 2006). En este proceso de colonización pasaron a compartir el hábitat con las abejas nativas sin aguijón de la tribu Meliponini que son habitantes endémicos del continente americano (Roubik, 1992).

Si bien las abejas sin aguijón están cercanamente emparentadas con las abejas melíferas, comparten el mismo hábitat, presentan una gran variedad de especies y un repertorio comportamental extremadamente amplio, son pocos los estudios de aprendizaje que se han llevado a cabo en condiciones controladas con estas especies. Uno particularmente interesante es el de Pessoti y Sénéchal (1981) quienes demostraron que abejas sin aguijón de

los géneros *Melipona* y *Scaptotrigona* eran capaces de asociar un color con comida en un protocolo de condicionamiento visual operante. En lo que respecta al aprendizaje olfativo el único registro previo de un condicionamiento olfativo clásico (absoluto) utilizando el protocolo REP con la abeja *Melipona scutellaris*, reportó que aun después de 12 ensayos éstas abejas no mostraban ninguna RC al olor que estaba siendo recompensado (Abramson *et al.*, 1999).

Nuestros objetivos en este capítulo fueron: (1) evaluar si las abejas sin aguijón eran capaces de aprender olores en un protocolo asociativo de condicionamiento en una situación controlada de laboratorio; y (2) en caso de que así fuera comparar su desempeño con el de la abeja melífera africanizada con quien comparte el mismo ambiente pero no las estrategias sociales de recolección de alimento.

Gracias a la gran diversidad de comportamientos de recolección que tienen las abejas nativas, pudimos elegir para comparar con la abeja africanizada especies en las cuales suponíamos que la influencia del aprendizaje olfativo podía tener diferente relevancia debido a sus estrategias recolectoras. Las abejas melíferas son extremadamente eficientes en la recolección de recursos. Esta eficiencia se debe en parte a su complejo sistema de comunicación basado en la danza de reclutamiento para activar compañeras inactivas (von Frisch, 1967) y además a su gran capacidad de aprender sumamente rápido las claves ambientales incidentales asociadas con la correspondiente recompensa (para resumen ver Menzel y Muller, 1996). En este contexto el aprendizaje olfativo es de suma importancia en la búsqueda de una fuente de alimento informada por sus compañeras durante la danza y/o para retornar a una fuente que resultó productiva en un viaje de recolección previo. Las abejas sin aguijón del género *Scaptotrigona* si bien también son sumamente eficientes en el proceso de reclutamiento, logran esto utilizando una estrategia completamente diferente. Estas abejas tienen un comportamiento de reclutamiento basado principalmente en rastros de feromonas que van de la colmena a la fuente de alimento (Lindauer y Kerr, 1958; Schmidt *et al.*, 2005; Schorkopf *et al.*, 2007). Esta estrategia de recolección y reclutamiento no demandaría de los individuos grandes habilidades de aprendizaje y memoria ya que basta seguir el camino dejado por una compañera para llegar al objetivo. Finalmente en el medio entre estas dos estrategias extremas se encuentran las abejas del género *Melipona*. Durante la recolección de alimento se ha descrito que utilizan una estrategia general de alerta que consiste en corridas agitadas dentro de la colmena y producción de sonidos (Nieh, 1998a; Hrncir *et al.*, 2000). Las compañeras salen en búsqueda de alimento de modo independiente sin tener información muy precisa sobre la ubicación o la distancia a la que se encuentra el alimento (Jarau *et al.*,

2000). Además depositan marcas de feromonas cerca de la fuente de alimento que ayudan a los individuos alertados en el acercamiento final a la fuente (Lindauer y Kerr, 1958; Nieh, 1998a).

Para poder comparar la relevancia del aprendizaje olfativo en la búsqueda de alimento de estas tres especies de abejas comenzamos poniendo a punto el protocolo de condicionamiento olfativo REP para las abejas nativas sin aguijón de las especies *Melipona quadrifasciata* y *Scaptotrigona aff. depilis* y aprovechamos el hecho de que comparten el hábitat con la abeja melífera africanizada para poder comparar su desempeño con el de esta última en el mismo protocolo.

## Materiales y Métodos

Los experimentos fueron realizados en el campus de la Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, entre Agosto y Diciembre del año 2005 y entre Julio y Noviembre del 2006. Trabajamos con una colonia de abejas *Apis mellifera* Africanizada, con cuatro colonias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* y tres colonias de *Scaptotrigona aff. depilis* (de aquí en adelante referidas como *M. quadrifasciata* y *S. aff. depilis*). Las colonias de abejas sin aguijón ya habían sido establecidas hacía más de un año en el meliponario adyacente al apiario que tenía las abejas africanizadas (Figura 1.1). Todas las colonias tenían reina, cuadros de cría y reservas de alimento.



Figura 1.1: Imágenes del Meliponario (izq) y del Apiario (der) del departamento de genética de la Universidade de São Paulo. A la derecha se observan las colmenas de las diferentes especies de abejas sin aguijón. A 10 metros se encontraba el Apiario que tenía colmenas de abejas melíferas africanizadas únicamente.

Nuestro objetivo fue analizar la capacidad de las abejas nativas sin aguijón *M. quadrifasciata* y *S. aff. depilis* de ser condicionadas olfativamente en el paradigma REP y comparar su desempeño con el de la abeja africanizada. En ensayos preliminares comprobamos que las

abejas nativas presentaban una clara respuesta REP al contactar sus antenas con solución azucarada, requisito indispensable ya que este reflejo es utilizado como RI para ser asociado al olor. La REP está influenciada por la sensibilidad gustativa al azúcar de los individuos (Scheiner *et al.*, 2001, 2003) por lo que para poder comparar el desempeño durante el condicionamiento necesitamos también comparar el URA de las tres especies a lo largo del periodo experimental.

### **Sensibilidad gustativa al azúcar**

Para estudiar la sensibilidad gustativa al azúcar de las tres especies de abejas llevamos a cabo la evaluación de los URA del modo descrito en materiales y métodos generales. Este protocolo ya había sido utilizado con las abejas melíferas (Page *et al.*, 1998; Pankiw y Page, 1999) pero no con las abejas sin aguijón. Un grupo de abejas de cada una de las tres especies (*Apis mellifera africanizada*, *M. quadrifasciata*, *S. aff. depilis*) eran recolectadas de las salidas de sus respectivas colmenas con tubos plásticos por lo menos una vez por semana entre Octubre y Diciembre del 2005 mientras se llevaba a cabo el estudio comparado de aprendizaje. Estos individuos eran encepados siguiendo la metodología ya descrita y se evaluaba su URA calculando sus puntajes URA.

### **Condicionamiento diferencial REP**

#### *Comparación entre especies*

Con el objetivo de comparar las habilidades de aprendizaje asociativo de las diferentes especies de abejas eusociales que conviven en un ambiente Neotropical llevamos a cabo un experimento de condicionamiento diferencial usando una clave olfativa (Bitterman *et al.*, 1983). Cada día capturábamos un pequeño grupo de alguna de las especies en las respectivas entradas de las colonias utilizando tubos plásticos. Una vez capturadas se les ofrecía una pequeña gota de solución azucarada 50% p/p y se las dejaba en una incubadora por 90 minutos a fin de estandarizar el nivel de hambre de los individuos. A continuación eran encepadas y se les volvía a ofrecer una pequeña gota de solución azucarada. Así encepadas las dejábamos durante 120 minutos en la incubadora antes de comenzar con el protocolo de aprendizaje con el fin de minimizar el efecto del stress generado por la manipulación durante el encepado. El condicionamiento se llevaba a cabo siguiendo los detalles ya descritos en materiales y métodos generales. En todos los ensayos de condicionamiento utilizábamos los olores florales fenilacetaldhido (FEN) y linalol (LIO). A los individuos de cada una de las especies los



separábamos en dos grupos para realizar dos tipos de condicionamiento: en uno el olor recompensado era FEN (FEN+) y en el otro el olor recompensado era el LIO (LIO+).

#### *Duración del estímulo olfativo*

Durante los meses de Octubre a Diciembre 2005 realizamos los ensayos de condicionamiento clásico siguiendo los parámetros estándar establecidos para la abeja *Apis mellifera* (6 segundos de estimulación olfativa). En vista de que los niveles de respuesta de las abejas sin aguijón, *M. quadrifasciata* y *S. aff. depilis*, obtenidos durante este condicionamiento diferencial fueron muy bajos, decidimos repetir los ensayos de aprendizaje entre Julio y Noviembre de 2006 para éstas dos especies. Repetimos el protocolo ya descrito (es decir con 6 segundos de estimulación olfativa) y además, basándonos en experiencias realizadas con abejorros (Laloi *et al.*, 1999), agregamos una nueva serie experimental en la que la estimulación olfativa era de 12 segundos. Este protocolo nos permitió evaluar en las abejas sin aguijón la influencia de la duración del estímulo en la habilidad para asociarlo a una recompensa. En estos ensayos de condicionamiento cada presentación duró también 46 segundos pero la distribución de los eventos fue la siguiente: 20 segundos de flujo de aire limpio, 12 segundos de olor (EC), y 14 de aire sin olor. Durante los ensayos recompensados el refuerzo de solución azucarada (EI) se ofreció durante los últimos 3 segundos de olor.

#### **Estadística**

La sensibilidad gustativa fue cuantificada utilizando el puntaje URA. Dichos puntajes se compararon a lo largo del periodo experimental para cada una de las especies por medio de una prueba de Kruskal Wallis con el fin de evaluar si existían variaciones en el URA durante la temporada que duró el estudio. Para comparar los URA de las diferentes especies agrupamos los datos de los dos meses de cada una de las especies y los comparamos también por medio de la prueba de Kruskal Wallis.

El desempeño en el protocolo de condicionamiento diferencial lo analizamos por medio de pruebas de ANOVA de dos factores. En ambos experimentos uno de los factores eran los sucesivos ensayos de condicionamiento (factor ENSAYO: 5 niveles de medidas repetidas). En el estudio de comparación entre especies el segundo factor fue la especie y el olor recompensado (factor TRATAMIENTO, 4 niveles: *A. mellifera* FEN+, *A. mellifera* LIO+, *M. quadrifasciata* FEN+, *M. quadrifasciata* LIO+). En el experimento de la duración del estímulo el

segundo factor fue la el olor que estaba recompensado y la duración del estímulo (factor DURACIÓN, 4 niveles: FEN+ 6 seg, LIO+ 6seg, FEN+ 12 seg, LIO+ 12 seg)

En el periodo de evaluación comparamos en cada uno de los grupos la proporción de respuestas al olor que funciono como EC+ durante el condicionamiento vs. la proporción de respuestas al EC- utilizando la Prueba exacta de Fisher.

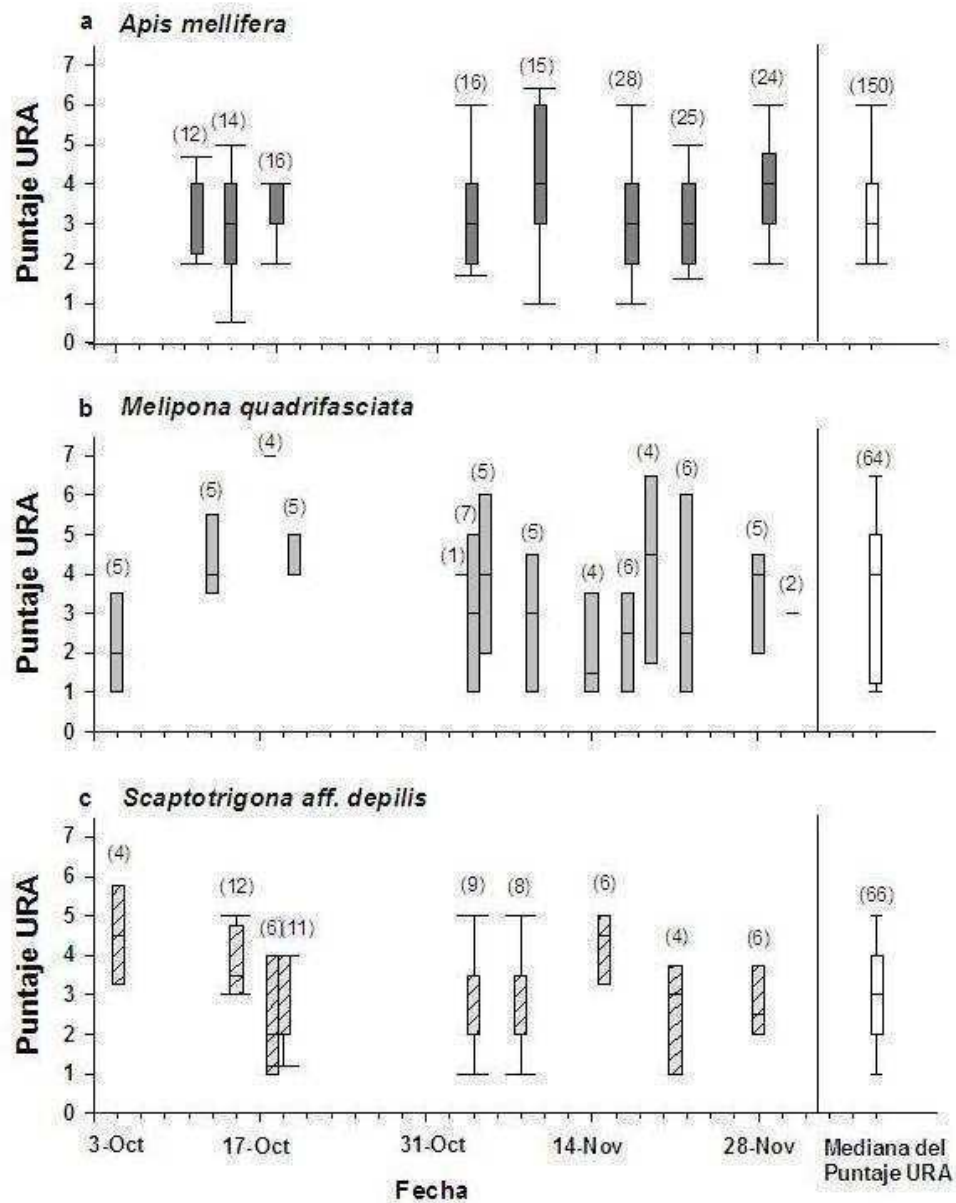
Para saber si los valores de discriminación durante la evaluación eran los mismos que los alcanzados al final de condicionamiento evaluamos la retención comparando los IDs entre el último ensayo del condicionamiento (C5) y la evaluación con una prueba de t para muestras pareadas. Como los datos del C5 habían sido utilizados en el ANOVA y los de la evaluación en la prueba de Fisher aplicamos una corrección de Bonferroni que produjo una modificación del coeficiente de significancia ( $\alpha' = 0,025$ ) (Sokal y Rohlf, 1995).

## Resultados

### Sensibilidad gustativa al azúcar

El objetivo principal de estos experimentos fue analizar la capacidad de las abejas sin aguijón de ser condicionadas en el paradigma REP y compararlo con el aprendizaje de la abeja africanizada. Dada la fuerte influencia que tiene la sensibilidad gustativa en el aprendizaje asociativo (Scheiner *et al.*, 2001, 2003) fue importante registrar sus puntajes URA durante los dos meses durante los cuales se realizaron los experimentos (Figura 1.2). A lo largo de todo el periodo experimental las abejas *A. mellifera* y *M. quadrifasciata* mantuvieron niveles de sensibilidad constante evidenciados por la falta de variaciones en sus puntajes URA (prueba de Kruskal-Wallis para *A. mellifera*:  $H(7, N=150) = 7,81$ ;  $p = 0,349$ ; para *M. quadrifasciata*:  $H(13, N=64) = 19,6$ ;  $p = 0,105$ ). En cambio las abejas de la especie *S. aff. depilis* mostraron ciertas variaciones en sus puntajes a lo largo del periodo evaluado (prueba de Kruskal-Wallis:  $H(8, N=66) = 17,59$ ;  $p = 0,024$ ). Sin embargo, al agrupar los datos de cada una de las especies y comparar sus respectivos valores generales no encontramos diferencias estadísticas inter-especificas (prueba de Kruskal-Wallis:  $H(2, N = 280) = 0,37$ ;  $p = 0,828$ ). Los valores de las medianas de los puntajes URA fueron de 3,4; 3,5 y 3,3 para *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* y *S. aff. depilis* respectivamente, que se corresponden con umbrales de respuesta a soluciones de sacarosa de concentraciones entre 3 y 10% p/p. Esta falta de diferencias y un valor umbral de alrededor de 10% nos asegura que para las tres especies la solución azucarada de 50% p/p

utilizada como recompensa en el condicionamiento diferencial podía evocar la respuesta REP y tenía un “valor de recompensa” similar para todas.



**Figura 1.2:** Variación de la respuesta gustativa (URA) en tres especies de abejas neotropicales a lo largo de un periodo experimental de dos meses (Oct-Dic 2005): (a) *Apis mellifera*, cajas gris oscuro, no observamos variaciones en el puntaje URA durante el periodo (K-W  $p=0,3$ ) (b) *Melipona quadrifasciata*, cajas grises, no observamos variaciones en el puntaje URA durante el periodo (K-W  $p=0,1$ ) y (c) *Scaptotrigona aff. depilis*, cajas rayadas, con variaciones en el puntaje URA a lo largo del periodo (K-W  $p<0,05$ ).

Las cajas blancas representan la mediana de los puntajes URA del periodo agrupados por especie. No detectamos diferencias significativas entre especies (K-W  $p=0,8$ ). Los números entre paréntesis indican la cantidad de individuos evaluados cada día. Cada caja incluye a la mediana como una barra horizontal y está definida por los cuartiles; los bigotes representan los percentiles 10/ y 90/ .

### Condicionamiento diferencial REP

Para llevar a cabo el condicionamiento olfativo clásico era necesario que los individuos presentaran la RI de extensión de la probóscide al contactar sus antenas con la solución azucarada 50/ p/p utilizada como recompensa. En vista de que por primera vez estábamos registrando REP en abejas sin aguijón nos interesó calcular cual era la proporción de individuos que presentó dicha RI durante la medición de la sensibilidad al azúcar (Figura 1.3). Las abejas de las especies *M. quadrifasciata* y *S. aff. depilis* presentaron REP a la solución azucarada 50/ p/p en el 69,2 y 67,7/ de los casos respectivamente. Estas proporciones fueron significativamente menores que la proporción de respuesta de la abeja melífera africanizada que fue de 95,5/ (Prueba de G: Gh= 46,67;  $p < 0,001$ ; N= 350; Comparaciones múltiples: *A. mellifera* vs. *M. quadrifasciata*: Gh= 33;  $p < 0,001$ ; *A. mellifera* vs. *S. aff. depilis*: Gh= 36,77;  $p < 0,001$ ; *S. aff. depilis* vs. *M. quadrifasciata*: Gh= 0,05;  $p > 0,05$ ). A pesar de que las abejas sin aguijón mostraron la RI en una proporción menor que la abeja africanizada, consideramos que siendo que cerca del 70% de los individuos respondían era factible llevar a cabo los ensayos de condicionamiento.

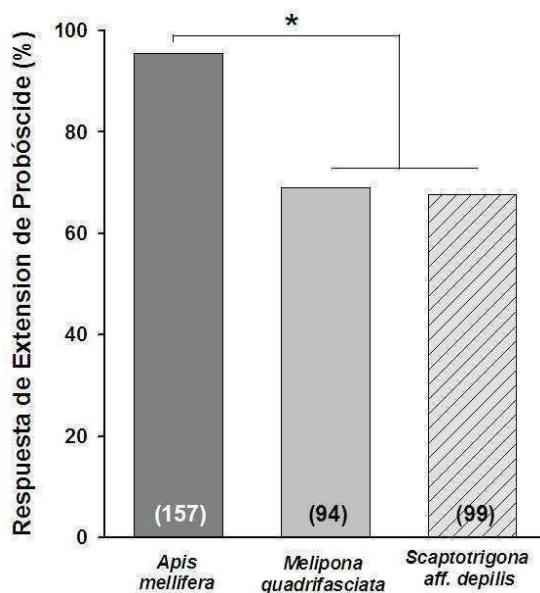


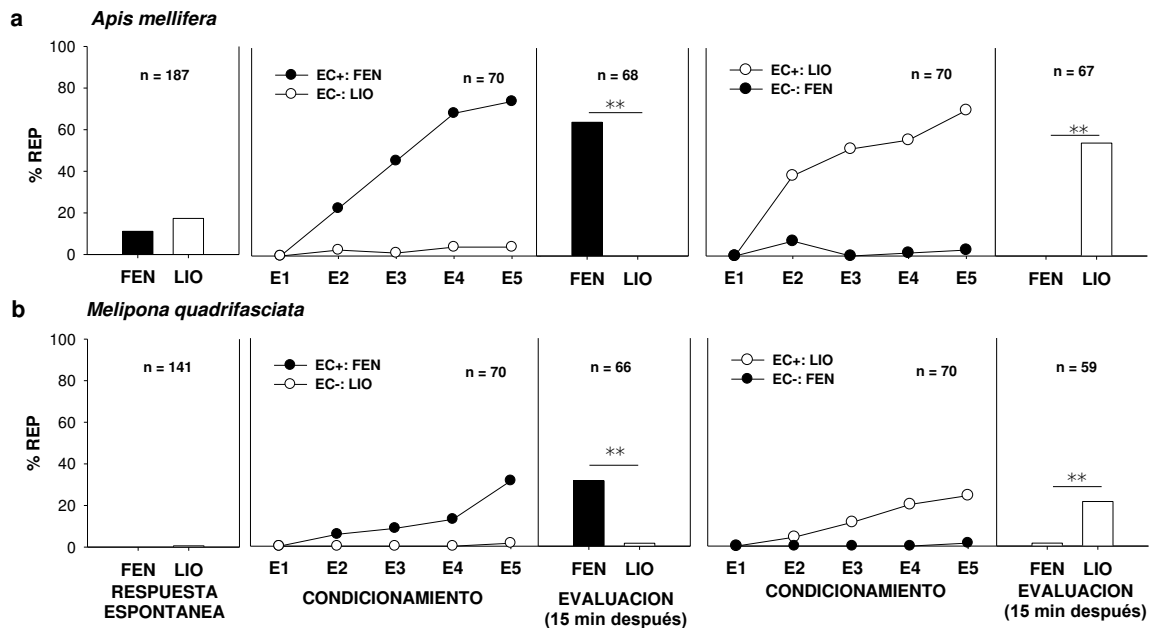
Figura 1.3: Porcentaje de abejas obreras que respondieron extendiendo su probóscide (%REP) al contactar sus antenas con solución azucarada 50% p/p durante el análisis de repuesta gustativa. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*:  $p < 0,05$ ; ver el texto para detalles). Entre paréntesis el número de abejas analizadas de cada especie.

### *Comparación del aprendizaje olfativo entre especies*

Durante el primer periodo experimental (Oct-Dic 2005), realizamos los ensayos del condicionamiento con una estimulación olfativa de 6 segundos de duración. En estas condiciones las abejas de la especie *S. aff. depilis* no respondieron al olor condicionado, a pesar de mantener la RI a la solución azucarada a lo largo del protocolo. De las 28 abejas de esta especie que evaluamos, ninguna presentó REP a la primera presentación del estímulo olfativo (RE), ni RC durante el condicionamiento o la evaluación. Este hecho contrasta con lo que pudimos observar para las abejas de las especies *A. mellifera* y *M. quadrifasciata* que presentaron respuestas condicionadas claras tanto durante el condicionamiento como en la evaluación (Figura 1.4).

La figura 1.4 (panel izquierdo) muestra la proporción de individuos con RE. Esta respuesta sólo se vio en 1 abeja de la especie *M. quadrifasciata*. De las abejas *Apis mellifera* sin embargo el 18/ mostró RE al olor LIO y el 11/ al olor FEN. Estos individuos con RE no fueron tenidos en cuenta para el subsiguiente condicionamiento diferencial ya que este tipo de respuestas pueden indicar experiencias previas no controladas con el olor.

También se ven en la figura 1.4 las curvas de aprendizaje en los condicionamientos FEN+ (Figura 1.4, panel central), y LIO+ (Figura 1.4, panel izquierdo) y la posterior evaluación en cada situación.



**Figura 1.4:** Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (%REP) durante el experimento de condicionamiento diferencial REP en la primera presentación de los olores (Respuesta Espontanea, panel izquierdo), durante los cinco pares de ensayos de condicionamiento (Condicionamiento), y durante el periodo de evaluación 15 minutos después del condicionamiento (Evaluación). (a) *Apis mellifera*, (b) *Melipona quadrifasciata*. Las abejas de la especie *Scaptotrigona aff. depilis* no mostraron ninguna respuesta condicionada durante el condicionamiento diferencial con ninguno de los olores. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba exacta de Fisher (\*\*  $p < 0,01$ )

Para evaluar si las abejas de estas especies eran capaces de discriminar entre un olor asociado a una recompensa y otro no recompensado y responder solo al recompensado, calculamos para cada individuo y en cada uno de los ensayos de condicionamiento el índice de discriminación (ID). El análisis de los datos lo efectuamos con una prueba de ANOVA de dos factores. Uno de los factores evaluados fue el efecto de los sucesivos ensayos de condicionamiento (ANOVA de medidas repetidas, Factor ENSAYO: 5 niveles) y el otro fue la especie y el olor que era recompensado (Factor TRATAMIENTO: 4 niveles: *A. mellifera* FEN+, *A. mellifera* LIO+, *M. quadrifasciata* FEN+ y *M. quadrifasciata* LIO+). El análisis demostró la existencia de variaciones significativas para cada una de las fuentes de variación: existía un efecto de los sucesivos ensayos de condicionamiento (factor ENSAYO:  $F=91,47$ ;  $gl=4$ ;  $p < 0,001$ ), de la especie con cada olor recompensado (Factor TRATAMIENTO:  $F=32,56$ ;  $gl=3$ ;  $p < 0,001$ ) y una interacción de ambos factores (INTERACCION entre factores:  $F=8,43$ ;  $gl=12$ ;  $p < 0,001$ ). Para poder encontrar donde estaban las diferencias realizamos pruebas de efectos simples y comparaciones Post Hoc con la prueba de Tukey. Pudimos observar que en el segundo ensayo

de condicionamiento (E2) el índice de discriminación promedio de las abejas *Apis* con LIO+ fue mayor que los de las abejas *M. quadrifasciata* con cualquiera de los olores como EC+. Del tercer al quinto ensayo (E3, E4 y e5) no se encontraron efectos del olor recompensado pero si de la especie de abeja: las abejas *Apis* con LIO+ o FEN+ respondieron de forma similar entre ellas y en mayor proporción que las abejas *M. quadrifasciata* cuyo nivel de respuesta tampoco presento diferencias asociadas al olor utilizado como EC+. Estos resultados demuestran claramente que las abejas obreras de la especie *M. quadrifasciata*, si bien responden menos que las abejas melífera, son capaces de aprender a discriminar entre olores florales en el paradigma REP.

La evaluación consistió en la presentación no recompensada de los dos olores utilizados durante el condicionamiento. En cada uno de los grupos observamos que la proporción de respuestas condicionadas al olor que había sido asociado a la recompensa durante el condicionamiento fue mayor que al no recompensado (Prueba exacta de Fisher: *A. mellifera* FEN+:  $p < 0,001$ ; *A. mellifera* LIO+:  $p < 0,001$ ; *M. quadrifasciata* FEN+:  $p < 0,001$ ; *M. quadrifasciata* LIO+:  $p < 0,001$ ), demostrando que 15 minutos más tarde aún existe discriminación entre ambos olores. También calculamos si los niveles de discriminación alcanzados al final del condicionamiento se mantenían en la evaluación (retención). Para ello comparamos para cada individuo el ID en el último ensayo de condicionamiento (E5) con el ID en la evaluación. Observamos que en los cuatro grupos experimentales el nivel de discriminación alcanzado no sufrió variaciones en la evaluación (Prueba de T para muestras pareadas ( $\alpha' = 0,025$ ): *A. mellifera* FEN+:  $t = 0,65$  ,  $N = 68$ ,  $p = 0,52$ ; *A. mellifera* LIO+:  $t = 1,83$ ;  $N = 67$ ,  $p = 0,07$ ; *M. quadrifasciata* FEN+:  $t = -0,27$ ,  $N = 66$ ,  $p = 0,78$ ; *M. quadrifasciata* LIO+:  $t = 0$ ,  $N = 59$ ,  $p = 1$ ). La figura 1.5 resume los ID promedio de cada especie en el último ensayo de condicionamiento, agrupando las respuestas a ambos olores.

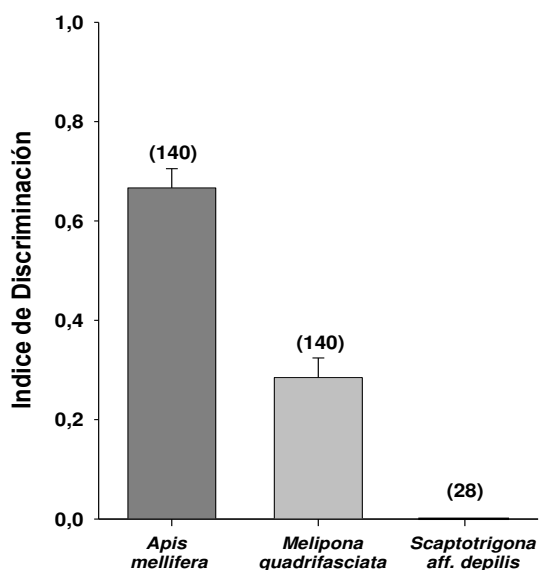


Figura 1.5: Índice de discriminación (ID) en el quinto par de ensayos de condicionamiento (E5) para abejas de las especies *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* y *S. aff. depilis* expuestas a 6 segundos de estimulación olfativa durante el condicionamiento diferencial. Se representan las medias y el error estándar. Entre paréntesis el número de abejas analizadas de cada especie.

#### *Duración del estímulo olfativo*

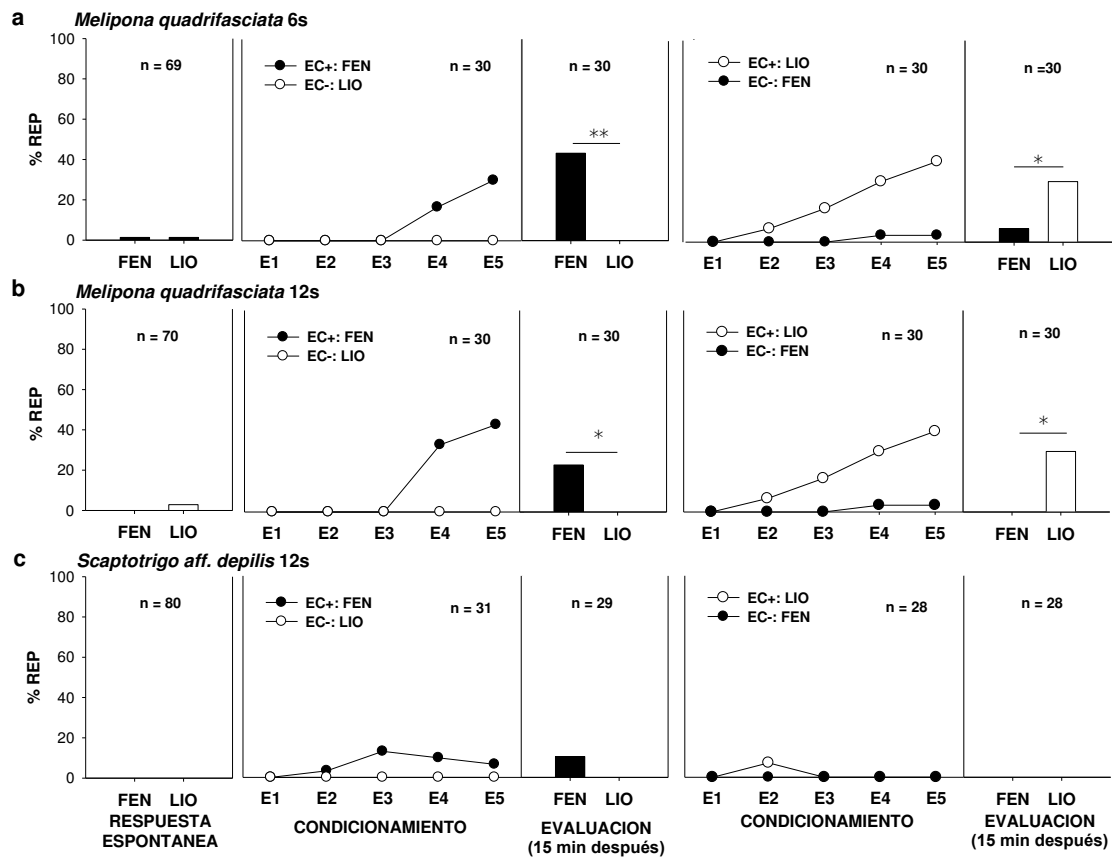
Como mencionamos anteriormente las abejas sin aguijón no mostraron un buen desempeño en el condicionamiento diferencial: las abejas *M. quadrifasciata* alcanzaron un poco menos de 40% de discriminación y *S. aff. depilis* no mostraron ni siquiera una RC en todo el condicionamiento. Teniendo en cuenta que el protocolo del condicionamiento fue originalmente puesto a punto para las abejas melíferas, durante el año 2006 repetimos esos ensayos y agregamos nuevas series en las que duplicamos la duración del estímulo olfativo.

Las abejas *M. quadrifasciata* prácticamente no respondieron de forma espontánea a ninguno de los olores, independientemente de la duración del estímulo olfativo (Figura 1.6, panel izquierdo). Para evaluar si el aumento de la duración del estímulo olfativo mejoraba el desempeño en el condicionamiento, comparamos las curvas de aprendizaje de *M. quadrifasciata* con los diferentes olores y las diferentes duraciones del estímulo (FEN+ 6s, LIO+ 6s, FEN+ 12s, LIO+ 12s)(Figura 1.6, paneles central y derecho). Si bien las abejas aumentaban el nivel de discriminación a lo largo de los sucesivos ensayos (ANOVA de medidas repetidas, factor ENSAYO:  $F=47,61$ ;  $gl=4$ ;  $p<0,001$ ) no detectamos diferencias significativas entre los grupos (factor TRATAMIENTO:  $F=2,67$ ;  $gl=3$ ;  $p=0,051$ ). En la evaluación de los cuatro grupos experimentales observamos mayor proporción de respuestas al olor que se había asociado a la recompensa que al no recompensado (Prueba exacta de Fisher: FEN+ 6s:  $p<0,001$ ; LIO+ 6s:



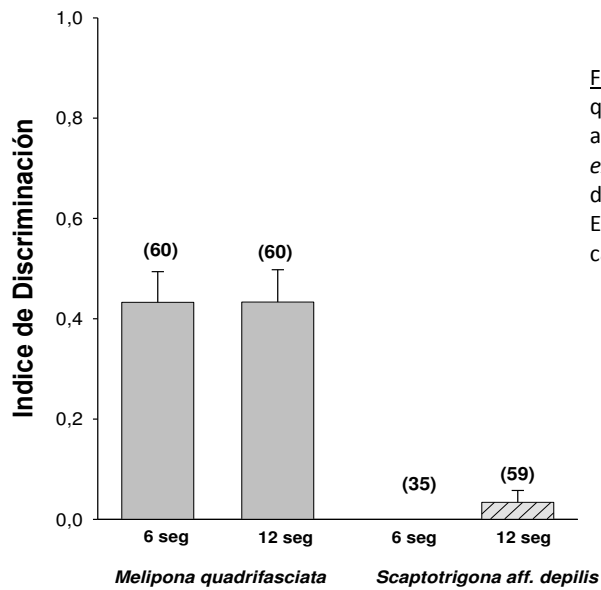
$p < 0,05$ ; FEN+ 12s:  $p < 0,05$ ; LIO+ 12s:  $p < 0,05$ ). El nivel de discriminación alcanzado al final del condicionamiento (E5) se mantuvo durante la evaluación independientemente del olor o la duración del estímulo (Prueba de T para muestras pareadas ( $\alpha' = 0,025$ ): FEN+ 6s:  $t = 1,98$ ,  $N = 28$ ,  $p = 0,057$ ; LIO+ 6s:  $t = 0,81$ ;  $N = 30$ ,  $p = 0,42$ ; FEN+ 12s:  $t = 1,98$ ,  $N = 30$ ,  $p = 0,056$ ; LIO+ 12s:  $t = 1,36$ ,  $N = 30$ ,  $p = 0,18$ ).

Las abejas de la especie *Scaptotrigona aff. depilis*, de igual modo que en el año anterior, no mostraron RCs al estímulo olfativo de 6 segundos de duración ( $N = 37$ ). Sin embargo al utilizar un estímulo olfativo de 12 segundos durante el condicionamiento, sí se registraron algunas RC al FEN como EC+ (Figura 1. 6c). En el tercer ensayo del condicionamiento (E3) respondieron el 13/ de los individuos haciendo que el ID promedio en dicho punto difiera de cero (Prueba de hipótesis,  $t = 2,04$ ,  $N = 31$ ,  $p < 0,05$ ). Sin embargo el análisis de ANOVA de medidas repetidas de un factor no reveló un efecto de los sucesivos ensayos de condicionamiento (factor ENSAYO:  $F = 1,70$ ;  $gl = 4$ ;  $p = 0,15$ ) ni tampoco observamos una mayor proporción de respuestas al olor recompensado durante la evaluación (Prueba exacta de Fisher,  $p = 0,23$ ).



**Figura 1.6:** Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (%REP) durante el experimento de condicionamiento diferencial REP en la primera presentación de los olores (Respuesta Espontánea, panel izquierdo), durante los cinco pares de ensayos de condicionamiento (Condicionamiento), y durante el periodo de evaluación 15 minutos después del condicionamiento (Evaluación): (a) Abejas *Melipona quadrifasciata* con 6 segundos de estimulación olfativa, (b) Abejas *Melipona quadrifasciata* con 12 segundos de estimulación olfativa y (c) Abejas *Scaptotrigona aff. depilis* con 12 segundos de estimulación olfativa. Las abejas *S. aff. depilis* con 6 segundos de estimulación olfativa no mostraron respuestas condicionadas a ninguno de los olores. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba exacta de Fisher (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

A modo de resumen, la figura 1.7 muestra los ID promedio en el último ensayo de condicionamiento (E5) para ambas especies y con la estimulación olfativa tanto de 6 segundos como de 12 segundos agrupando los datos de ambos olores.



**Figura 1.7:** Índice de discriminación (media +ES) en el quinto par de ensayos de condicionamiento de las abejas de las especies *M. quadrifasciata* y *S. aff. depilis* expuestas a estimulaciones olfativas de 6 y 12 segundos de duración durante el condicionamiento diferencial. Entre paréntesis el número de abejas analizadas de cada especie.

## Discusión

En nuestros experimentos aplicamos por primera vez de forma exitosa la respuesta de extensión de probóscide, REP, para evaluar la sensibilidad gustativa al azúcar de abejas sin aguijón. Esto nos permitió comparar dicha sensibilidad con la de la abeja invasora *Apis mellifera* africanizada. El hecho de que la sensibilidad de las tres especies de abejas fuera similar hizo posible comparar su desempeño en un protocolo de aprendizaje olfativo. También por primera vez conseguimos que abejas sin aguijón se desempeñaran exitosamente en un ensayo de condicionamiento clásico con el paradigma REP. Aunque el desempeño de las abejas *M. quadrifasciata* fue bastante menor que el de las abejas melíferas, el aumento en la duración del estímulo olfativo no provocó mejoras en su nivel de discriminación.

### *Diferencias ecológicas entre especies podrían explicar variaciones en los URA*

Las abejas de la especie *S. aff. depilis* son las únicas que presentaron variaciones en sus umbrales de respuesta a la sacarosa a lo largo del periodo experimental. Las aproximadamente 10 especies de abejas incluidas en el género *Scaptotrigona* son de un tamaño medio (6-7mm) con colonias muy populosas (más de 10.000 individuos) (Lindauer y Kerr, 1958). Si bien son agresivas en las entradas de sus colmenas no presentan comportamientos agonistas durante la recolección y son fácilmente desplazadas de los parches florales por polinizadores de mayor tamaño o más agresivos (Roubik, 1989; Biesmeijer y Slaa, 2006). Aunque utilizan un amplio espectro de plantas (explotan más de 100 géneros, Beismejier y Slaa, 2006) estos desplazamientos generan fluctuaciones en los recursos que pueden aprovechar, y como consecuencia, variaciones en la calidad de la comida a la que tienen acceso. Los umbrales de respuestas comportamentales están adaptados a la concentración de las soluciones azucaradas disponibles (para abejas melíferas ver Lindauer, 1948; Pankiw *et al.*, 2004), por lo que las fluctuaciones encontradas en los puntajes URA para *S. aff. depilis* podrían deberse a dichas variaciones en la disponibilidad del alimento. En cambio *A. mellifera* y *M. quadrifasciata* presentan ambas un amplio espectro dietario y una gran superposición en sus tiempos y lugares de recolección (Roubik, 1978; Wilms *et al.*, 1996; Wilms y Wiechers, 1997). Esta capacidad de explotar muchos recursos vegetales simultánea o secuencialmente pueden hacerlas menos susceptibles a cambios en la concentración de azúcar del néctar disponible y por lo tanto a mostrar variaciones en su nivel de respuesta a las soluciones azucaradas.

### *Las abejas sin aguijón pueden discriminar en el paradigma REP*

El único estudio previo de condicionamiento clásico en el paradigma REP con abejas sin aguijón (Abramson *et al.*, 1999) describía que los individuos de la especie *Melipona scutellaris* no mostraban respuestas condicionadas en un protocolo de condicionamiento absoluto. En nuestro estudio preferimos utilizar un procedimiento de condicionamiento diferencial clásico. Este tipo de condicionamiento incluye un control sobre cada individuo ya que se ven forzados a no responder frente al olor no recompensado y así poder resolver la tarea de discriminación. Este procedimiento permite asegurar la naturaleza asociativa del aprendizaje (Bitterman *et al.*, 1983; Menzel y Giurfa, 2001; Bouton y Moody, 2004) permitiendo excluir la presencia de procesos no asociativos como sensibilización (Menzel 1999). También permite descartar la posibilidad de que las abejas hayan sufrido un proceso de “priming” sensorial que produce una respuesta sesgada a un estímulo producto de su exposición previa (Schacter y Buckner, 1998; Giurfa, 2003; Bouton y Moody, 2004).

Aunque los niveles de discriminación alcanzados por las abejas *M. quadrifasciata* fueron bajos comparados con lo de las abejas africanizadas, los índices de discriminación mostraron un aumento significativo a lo largo de los sucesivos ensayos de condicionamiento, demostrando que estas abejas respondieron diferencialmente a los olores recompensados y no-recompensados. Los niveles de discriminación alcanzados al final del condicionamiento se mantuvieron durante la evaluación (15 minutos más tarde de terminado el condicionamiento), indicando la existencia de procesos de memoria de corto termino.

### *Condicionamiento diferencial en abejas africanizadas*

Si bien las abejas melíferas son un modelo ampliamente estudiado en cuestiones de aprendizaje, la mayoría de estos trabajos se han llevado a cabo con individuos de la línea genética de “abejas europeas” (Bitterman *et al.*, 1983; Takeda, 1961; Menzel y Müller, 1996). Los pocos estudios desarrollados con abejas africanizadas utilizaron ensayos de condicionamientos clásicos de tipo absoluto (Abramson *et al.*, 1997; Abramson y Aquino, 2002), que como ya fuera mencionado, es una tarea que demanda menos de los individuos que un condicionamiento diferencial y no permite descartar la presencia de procesos no asociativos (Hammer y Menzel, 1995; Giurfa, 2003). Dichos trabajos comparan el desempeño de las líneas europea y africanizada y demuestran que estas últimas aprenden más lentamente y alcanzan menores niveles de respuesta (Abramson *et al.*, 1997; Abramson y Aquino, 2002). Si bien no podemos comparar directamente nuestros resultados con el desempeño de las

abejas europeas en protocolos de condicionamiento diferencial por no haber hecho ensayos en simultáneo, pareciera que las abejas africanizadas también muestran menores niveles de discriminación en este paradigma.

#### *Protocolo REP para abejas sin aguijón*

El hecho de que las abejas sin aguijón hayan mostrado un menor desempeño que el de las abejas melíferas puede deberse a que el protocolo REP fue especialmente diseñado y optimizado para estas últimas en cuanto a la intensidad del estímulo, el tiempo entre ensayos, entre otros parámetros (Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983, Toda *et al.*, 2009). Por ejemplo, los abejorros de la especie *Bombus terrestris*, en vez de los 6 segundos de estimulación olfativa utilizados comúnmente con las abejas melíferas, necesitan 12 segundos de estimulación con esta clave así como un refuerzo de solución azucarada más concentrada para aprender la asociación entre un olor floral y el alimento (Laloi *et al.*, 1999). Para evaluar si ese era el caso con las abejas sin aguijón repetimos el protocolo estándar de 6 segundos y también aumentamos la duración del estímulo olfativo a 12 segundos. Este aumento no mejoró la discriminación de las abejas *M. quadrifasciata*, que parecieran haber llegado a un nivel de desempeño máximo en éste protocolo. En contraste el estímulo de mayor duración les permitió a las abejas *A. aff. depilis* mostrar una pequeña proporción de RC a uno de los olores en el punto medio del condicionamiento. Este nivel de discriminación sin embargo no fue significativo a lo largo del protocolo y tampoco se percibió en la evaluación. La disminución en la cantidad de RC hacia el final del condicionamiento podría deberse a que siendo éstas abejas de un tamaño menor y por lo tanto pudieron haber alcanzado un estado de saciedad luego de haber ingerido las pequeñas cantidades de solución azucarada que se ofrecían sucesivamente durante el entrenamiento. Otra posibilidad es que el periodo de encephado haya sido demasiado prolongado para estas abejas. En definitiva, este patrón de respuestas sugiere que sería posible ajustar el protocolo del condicionamiento con el fin de mejorar el desempeño de las abejas *S. aff. depilis* en el paradigma REP y por lo tanto re-analizar cuantitativamente las habilidades de aprendizaje de ésta y otras especies de trigonas en el futuro.

#### *Efecto de la estrategia de recolección en las habilidades de aprendizaje*

Una explicación posible de las diferencias en el aprendizaje entre las tres especies de abejas podría estar relacionada con diferencias intrínsecas en sus habilidades cognitivas como consecuencia de sus disímiles estrategias de recolección y reclutamiento. Para una abeja de cualquiera de las tres especies que va por primera vez en la búsqueda de alimento, los

estímulos visuales son especialmente relevantes para encontrar los parches florales a distancia (von Frisch, 1967; Wehner, 1981). El aroma de la flor pareciera jugar un papel más importante en la aproximación final a la fuente de alimento, induciendo a la abeja a aterrizar en la flor (von Frisch, 1914). Al retornar a la colmena sin embargo, las diferencias entre las tres especies se hacen evidentes. Las recolectoras del género *Scaptotrigona* depositan un sendero de feromonas todo a lo largo del camino (Lindauer y Kerr, 1958) mientras que las abejas melíponas depositan marcas de feromona sólo cerca de la fuente de alimento. La abeja melífera sólo ocasionalmente deja marcas feromonales en el lugar de alimentación y los alrededores. Esto trae como consecuencia diferencias en la relevancia que tiene el olor floral en la recolección. Las abejas melíferas cuando retornan a una fuente de alimento, o son reclutadas a una nueva fuente, utilizan la información de distancia y dirección adquiridas en sus experiencias previas o al seguir las danzas de reclutamiento de sus compañeras en la colmena. Al llegar a la fuente el olor floral se torna relevante al indicar cuál es la flor que estaba buscando (von Frisch, 1967). Las abejas *Melipona* en cambio poseen un sistema de reclutamiento basado en una alerta general con muy poca información de la dirección o distancia de la fuente de alimento (Jarau *et al.*, 2000). Las abejas alertadas dentro de la colmena salen en búsquedas aleatorias y si bien al aproximarse al alimento el olor floral gana relevancia, cuentan con las marcas de feromonas que indican la ubicación exacta (Nieh, 1998b). Finalmente las abejas *Scaptotrigona* cuando retornan a una fuente particular de alimento, o cuando son reclutadas, pueden seguir el camino de las marcas de feromonas directamente desde la entrada de la colmena y además encuentran marcas especiales indicando el punto final del camino en la fuente de alimento (Schmidt *et al.*, 2003). De estas observaciones parece plausible que durante el reclutamiento, si bien en la aproximación final a la flor el aroma de la comida debe ser importante para las tres especies de abejas, algunas de ellas tienen información extra. Relacionando estas estrategias de recolección con el desempeño en el condicionamiento surge la hipótesis de que para las abejas melíferas puede ser especialmente importante el aprendizaje de la asociación entre el olor y la comida. En cambio las abejas *Melipona* al acercarse a la fuente de alimento tienen las marcas de feromonas por lo que el aprendizaje del olor floral podría no ser tan importante. Finalmente para las abejas *S. aff. depilis* al seguir rastros de feromonas desde la colmena a la fuente podría ser que aprender el olor del alimento podría no ser muy relevante. Serían necesarios nuevos experimentos, como por ejemplo de elección de alimento en un contexto operante, para distinguir si es eso realmente lo que está ocurriendo, o si las diferencias en el

condicionamiento REP se deben solamente a una situación de estrés durante el procedimiento experimental que pudiera estar enmascarando los patrones de respuesta.



## Capítulo 2: Aprendizaje olfativo y el efecto de las experiencias olfativas previas en la abeja *Tetragonisca angustula*

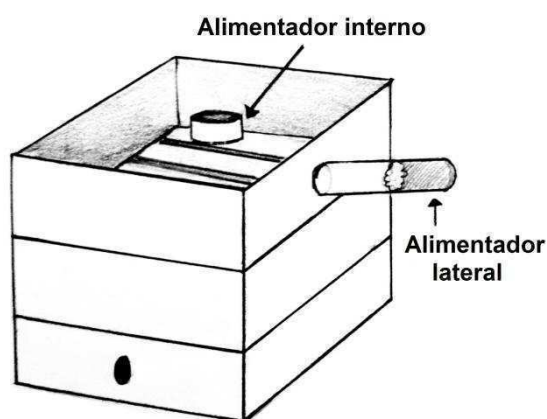
Entre las abejas sin aguijón la especie *Tetragonisca angustula* presenta una distribución geográfica particularmente extensa (Schwarz, 1938). En el continente americano se la puede encontrar en el territorio entre el sur de México y el norte de Argentina (Camargo y Pedro, 1992; Moure, 2008; Yáñez-Ordóñez *et al.*, 2008). Estas abejas prácticamente no presentan reclutamiento a las fuentes de alimento (Lindauer y Kerr, 1958; Aguilar *et al.*, 2005) y se las ha catalogado como recolectoras solitarias (Johnson, 1983). Esta categoría implica que durante la recolección utilizan únicamente información individual adquirida previamente o claves provistas por sus compañeras (Beisemeijer y Slaa, 2004), pero carecen de canales de comunicación elaborados que les permitan transmitir la ubicación puntual de una fuente de alimento (Slaa *et al.*, 2003b). Algunas de las claves que utilizan en el ámbito de la recolección son: la presencia de otra abeja de la misma especie en una fuente de alimento (local enhancement, Slaa *et al.*, 2003b), las marcas de feromonas depositadas por otros individuos de la misma especie (de la misma colonia o no) en la fuente de alimento (Villa y Weiss, 1990) o claves visuales aprendidas en viajes previos de recolección (Villa y Weiss, 1990).

En cuanto al uso de claves olfativas, hasta la fecha no existen referencias de la relevancia que pudieran tener para estas abejas. En otras especies de abejas neotropicales se describe la importancia de los olores florales durante la recolección de alimento (Roubik, 1989; Michener, 2000) y cómo esa información olfativa es adquirida en los viajes de recolección previos (Beisemeijer y Slaa, 2004). Las abejas melíferas incluso pueden adquirir la información olfativa dentro de la colmena como el olor de la comida traída por una compañera exitosa (von Frisch, 1967; Farina *et al.*, 2005). En ambos casos la adquisición de esa información implica que los individuos aprenden a asociar el estímulo sensorial (el olor) y la recompensa de alimento.

Nuestros objetivos en este capítulo fueron (1) evaluar las habilidades cognitivas de las abejas *T. angustula* para aprender claves olfativas y (2) comenzar a develar el uso que pudieran hacer de la información olfativa durante la recolección de recursos. Para ello trabajamos con un protocolo de elección en vuelo libre que les permitía a los individuos desempeñarse en un entorno que tiende al natural y con pocas restricciones. Con este mismo protocolo estudiamos el efecto de las experiencias olfativas previas, adquiridas durante la recolección o dentro de la colmena, en las subsiguientes elecciones de alimento. Observamos que la ingestión de solución azucarada aromatizada generaba un sesgo en la elección de olores por lo que utilizamos el protocolo REP para evaluar las habilidades cognitivas de estas abejas.

## Materiales y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en el campo experimental de la Universidad de Buenos Aires. Trabajamos con una colmena de abejas *Tetragonisca angustula* que había sido traída de la provincia de Misiones dos años antes de comenzar con los experimentos. Se mantuvo la colmena en el interior del laboratorio con un tubo plástico conectado a su entrada y que atravesaba la pared que permitía a las abejas el acceso al exterior. Durante la temporada de invierno mantuvimos la colmena calefaccionada con una almohada eléctrica. A fin de introducir solución azucarada durante la temporada de invierno y durante los experimentos colocamos dos tipos de alimentadores. Uno de ellos era un alimentador interno ubicado dentro de la colmena que consistía en un recipiente plástico de aproximadamente unos 20 ml con pedacitos de madera a fin de que las abejas pudieran ingerir la solución posadas sobre el sustrato sólido (Figura 2.1). También colocamos un alimentador lateral que consistía en un tubo de ensayo de plástico transparente insertado lateralmente en la pared de la colmena. Este tubo contenía una tapa de algodón que permitía a las abejas ingerir de la solución sin que ésta se derrame dentro de la colmena (Figura 2.1). La ventaja de este alimentador lateral era que permitía ver cuáles eran las abejas que estaban ingiriendo la solución y era posible removerlo para poder aislar esas abejas en particular. Ambos alimentadores estaban ubicados en la parte superior de la colmena en un compartimento ubicado por encima del área de cría y separado de esta por unas tablas de madera fina separadas entre sí aproximadamente 1cm. De esta forma las abejas tenían libre acceso a ésta área y a los alimentadores en todo momento. Los experimentos fueron realizados en las temporadas de verano (entre enero y marzo) de los años 2007, 2008 y 2009.



**Figura 2.1:** Esquema de la ubicación de los diferentes tipos de alimentadores utilizados en la colmena de las abejas *Tetragonisca angustula*.

## Elección de olores en un protocolo de vuelo libre

### *Entrenamiento*

Las abejas eran entrenadas a recolectar solución azucarada 50/ p/p de un alimentador artificial ad-libitum que consistía en un vaso de acrílico (6.5cm de alto, 4cm de diámetro) invertido sobre una placa de plástico de 5,5 cm de diámetro, 10mm de ancho y con 16 surcos (1x1x10mm) en un ordenamiento radial (Figura 2.2). Este alimentador era colocado sobre un trípode fotográfico en la salida de la colmena al mediodía. A medida que las abejas comenzaban a alimentarse el mismo se iba alejando gradualmente hasta ubicarse a unos 3 metros de la colmena. Una vez que se alcanzaba este lugar se les permitía a las abejas alimentarse por 30 minutos. Durante este tiempo, los individuos volaban entre el alimentador y la colmena libremente. Esos 30 minutos equivalían a aproximadamente 10 viajes de recolección.



Figura 2.2: Alimentador *ad-libitum* utilizado para entrenar a las abejas fuera de la colmena y detalle de una abejas *T. angustula* ingiriendo solución azucarada del mismo.

### *Preferencia espontánea entre olores*

Una vez que las abejas ingirieron durante 30 min la solución azucarada removíamos el alimentador de entrenamiento y colocábamos un rectángulo de plástico transparente de 20cm x 45cm sobre el trípode. Se colocaban en cada uno de los extremos de este rectángulo dos alimentadores limpios, idénticos y a aquel con el que habíamos hecho el entrenamiento. Cada alimentador contenía solución azucarada 50% p/p sin aromatizar y un cuadrado de papel de filtro de 2cm de lado ubicado sobre la parte superior. Este papel de filtro estaba embebido con 50  $\mu$ l de un olor puro: en una primera serie (i) los olores utilizados fueron Fenilacetaldehído (FEN) y Linalool (LIO) y en una segunda serie (ii) utilizamos 2-Octanol (OCT) y Nonanal (NON). Los cuatro olores son componentes naturales de las flores (Knudsen *et al.*, 1993) y fueron comprados a Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania. Elegimos estos pares de olores porque se sabe que las abejas melíferas en protocolos de aprendizaje olfativo pueden aprender los olores de cada par de un modo similar y además presentan un bajo nivel de generalización que permite una buena discriminación entre ellos (Sandoz *et al.*, 2001; Guerreri *et al.*, 2005).

Para cada par de olores evaluamos la proporción de elección espontánea entre ellos. A partir del momento en que retirábamos el alimentador central y colocábamos los dos alimentadores de prueba les permitimos a las abejas aterrizar en el alimentador que eligieran durante 5 minutos. En cuanto aterrizaban eran capturadas colocando un tubo plástico invertido sobre la abeja. Los individuos que aterrizaron en el alimentador mientras había otra abeja posada eran capturados de igual modo pero no fueron tenidas en cuenta para el análisis de los datos ya que su elección podría haber estado sesgada por el estímulo visual de la compañera (Slaa *et al.*, 2003b). Una vez transcurridos esos primeros 5 minutos de captura invertíamos la ubicación de los alimentadores de un extremo al otro de la placa a fin de balancear los posibles efectos de claves visuales que pudieran afectar la elección de las abejas. Con esta nueva ubicación de los alimentadores dejábamos pasar otros 5 minutos de captura. Finalizada la captura volvíamos a colocar el alimentador de entrenamiento con solución azucarada sin aromatizar en el lugar central por otros 30 minutos para no perder potenciales recolectoras. Los alimentadores de prueba se limpiaban bien con alcohol para evitar las marcas de las huellas (footprints) o cualquier otra marca de feromonas (Villa y Weiss, 1990) que pudieran intervenir con los subsiguientes 10 minutos de elección entre alimentadores. Todas las abejas capturadas en los alimentadores de elección se mataban al final del experimento para evitar medir la elección de algún individuo más de una vez.

### *Efecto de las experiencias olfativas adquiridas durante la recolección*

A continuación quisimos evaluar si las experiencias apetitivas adquiridas en el contexto de recolección tenían algún efecto en la subsiguiente elección olfativa. Para ello entrenamos a las abejas del mismo modo que describimos anteriormente a un alimentador central, el cual ofrecía solución azucarada 50% p/p sin aromatizar. Nuestra intención era evaluar si era posible sesgar sus preferencias hacia el olor por el que habían mostrado menor preferencia espontánea como consecuencia de la ingestión de alimento aromatizado con el mismo. Durante la evaluación de la preferencia espontánea las abejas *T. angustula* habían mostrado un claro sesgo hacia el LIO en la serie (i) y por NON en la serie (ii) (Fig. 2.3). Para ofrecer las soluciones aromatizadas una vez que las abejas eran entrenadas con el alimentador central y llegaban al lugar a 3 metros de la colmena llenábamos ese alimentador con la solución aromatizada. En la serie (i) ofrecimos solución azucarada 50% p/p aromatizada con 50 $\mu$ l de FEN por litro de solución y en la serie (ii) la solución azucarada aromatizada con OCT 50 $\mu$ l/L. Se les permitía a las abejas alimentarse de estas soluciones aromatizadas libremente por 30 minutos, lo que equivalía a aproximadamente 10 viajes de recolección. Durante este tiempo fueron marcadas. A continuación llevamos a cabo la evaluación de sus elecciones del mismo modo en que ya fue descrito: les ofrecimos la elección entre dos alimentadores que contenían solución sin aromatizar y con papel de filtro con olores puros.

### *Efecto de las experiencias olfativas adquiridas dentro de la colmena*

Para evaluar si las elecciones entre olores podían modificarse por las experiencias olfativas percibidas en el contexto social, colocamos solución azucarada aromatizada en el interior de la colmena. Nuevamente elegimos los olores florales por los que no habían mostrado una preferencia espontánea. Utilizamos los alimentadores internos que consistían en recipientes plásticos (20 ml aproximadamente) ubicados en la parte superior de la colmena (Fig 2.2). En dichos recipientes colocábamos la solución aromatizada 2 días antes de comenzar con los ensayos de elección a fin de permitir la circulación de alimento aromatizado entre los individuos de la colmena. De esta forma el contacto con la solución aromatizada ocurría o bien por ingestión directa desde el alimentador o por contactos trofalácticos (boca a boca) entre las compañeras de la colonia como ocurre en otros insectos sociales (Farina *et al.*, 2005). Recargábamos el alimentador con solución cada día a fin de asegurar un suministro constante de solución aromatizada mientras duró la toma de datos (entre 3 y 4 días para cada una de las series). En la serie (i) utilizamos solución azucarada 50% p/p aromatizada con FEN (50 $\mu$ l/L) y

en la serie (ii) solución aromatizada con OCT (50 $\mu$ l/L ). La serie (i) la realizamos en Enero del 2009 y la serie (ii) en Marzo del mismo año.

Evaluamos la elección de las abejas del mismo modo que antes, es decir, entrenándolas a un alimentador central con solución sin aromatizar y luego dejándolas elegir entre dos alimentadores aromatizados con un papel de filtro.

### **Condicionamiento olfativo REP**

A fin de profundizar en el estudio del aprendizaje olfativo en las abejas *T. angustula*, decidimos realizar un ensayo de condicionamiento clásico REP. Este protocolo, al contrario de la elección entre alimentadores en vuelo libre, nos permite controlar individualmente la estimulación olfativa durante el aprendizaje asociativo (Kuwabara, 1957; Takeda, 1961).

#### *Captura de los individuos y encepado*

Para capturar a los individuos con los que llevaríamos a cabo el ensayo de condicionamiento diferencial colocamos 2 ml de solución azucarada sin aromatizar en el fondo del alimentador lateral de la colmena (Figura 2.1). De este modo al ser un volumen bajo de solución sólo ocupaba la punta distal del tubo y las abejas debían caminar hasta el fondo del mismo para poder ingerir la solución. Esto permitía remover el tubo suavemente y de esta forma aislar a los individuos con los que íbamos a trabajar (entre 12 y 20 por día). De este alimentador lateral pasábamos a cada abeja a un tubo plástico pequeño. Ahí las dejábamos reposar por lo menos 40 min. Pasado ese tiempo colocábamos los tubos con las abejas en un freezer por alrededor de 1 min a fin de reducir su movilidad y poder enceparlas del mismo modo descrito en la sección de materiales y métodos generales. Una vez encepadas se las ubicaba en una incubadora (28° C, 55% humedad relativa, oscuridad) y se las dejaba aproximadamente 2 horas hasta que presentaran RI de extensión de la probóscide como respuesta al contacto de las antenas con solución azucarada 50 %.

#### *Condicionamiento diferencial*

En ensayos preliminares con el protocolo estándar de condicionamiento diferencial REP con las abejas *T. angustula* no observamos respuestas condicionadas al olor recompensado (estímulo olfativo de 6 segundos de duración). Basándonos en los antecedentes con abejorros (Laloi *et al.*, 1999) y en nuestras experiencias previas con las abejas *Scaptotrigona aff. depilis* decidimos aumentar la duración de la estimulación olfativa y trabajamos con 12 segundos de estimulación del mismo modo que fue descrito en el capítulo anterior. La recompensa de

solución azucarada en los ensayos que eran recompensados se otorgaba en los últimos 3 segundos de olor.

Llevamos a cabo condicionamientos con FEN como olor recompensado (FEN+) y otros en los que era LIO el olor asociado a la recompensa (LIO+).

#### *Pre-estimulación olfativa*

A pesar de que trabajamos con un estímulo olfativo de larga duración en el condicionamiento diferencial REP (12 segundos), las abejas *Tetragonisca angustula* prácticamente no mostraron respuestas condicionadas durante el mismo. Nos preguntamos entonces si experiencias olfativas previas podrían mejorar su desempeño. Decidimos alimentar a las abejas con solución aromatizada antes de someterlas al condicionamiento. Para ello colocábamos 1,5ml de solución azucarada 50% p/p aromatizada con LIO o FEN (50µl/l) en el alimentador lateral y les permitíamos a las abejas alimentarse durante una hora. Pasado ese tiempo separábamos el alimentador de la colmena suavemente y capturábamos a los individuos que estuvieran ahí dentro. Si bien no teníamos un control fino de los individuos que habían ingerido el alimento aromatizado, consideramos que el hecho de capturar a las abejas directamente de adentro del alimentador que contenía la solución aromatizada implicaba que las abejas habían tenido algún contacto dicha solución. Una vez capturadas ubicábamos a las abejas en tubos individuales y las encepábamos del mismo modo ya descrito.

En las abejas melíferas se suele utilizar la respuesta espontánea en el paradigma REP como un indicador de las experiencias apetitivas previas de los individuos (Gerber *et al.*, 1996; Sandoz *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2005; Grüter *et al.*, 2006; Arenas y Farina, 2008). Como prácticamente no registramos RE en ninguno de los tratamientos sometimos a los individuos al protocolo de condicionamiento diferencial REP completo a fin de evaluar si las experiencias olfativas previas modificaban la dinámica de aprendizaje (Chandra *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2009).

Establecimos cuatro grupos experimentales: de las abejas que eran alimentadas con solución con LIO un grupo era sometido a un condicionamiento diferencial con FEN como EC+ (pre-estimulación con LIO-FEN+) y otro con LIO como EC+(pre-estimulación con LIO-LIO+). La misma separación hicimos con las abejas alimentadas con solución con FEN (pre-estimulación con FEN-FEN+, pre-estimulación con FEN-LIO+).

### **Análisis estadístico**

Para comparar la proporción de abejas que elegían un determinado olor en cada una de las situaciones experimentales (Preferencia espontánea, Recolección y Colmena) utilizamos una prueba de G de bondad de ajuste para cada una de las series experimentales (Serie (i) y Serie (ii)). En las comparaciones múltiples aplicamos la corrección de Dunn-Sidak correspondiente según la cantidad de grupos comparados (Sokal y Rohlf, 1995).

El desempeño durante el condicionamiento diferencial lo analizamos calculando el Índice de discriminación (ID) para cada individuo en cada uno de los pares de ensayos de condicionamiento. En aquellos grupos experimentales en los que las abejas mostraron RC comparamos los IDs en cada uno de los sucesivos pares de ensayos de condicionamiento por medio de una prueba de ANOVA de un factor de medidas repetidas (factor ENSAYO: 5 niveles de medidas repetidas). En los grupos en que detectamos diferencias significativas realizamos pruebas de Tukey para encontrar las diferencias entre los ensayos del condicionamiento.

En la evaluación comparamos para cada grupo la proporción de respuestas al olor recompensado con la proporción de respuestas al olor no recompensado por medio de una prueba de Fisher.

## **Resultados**

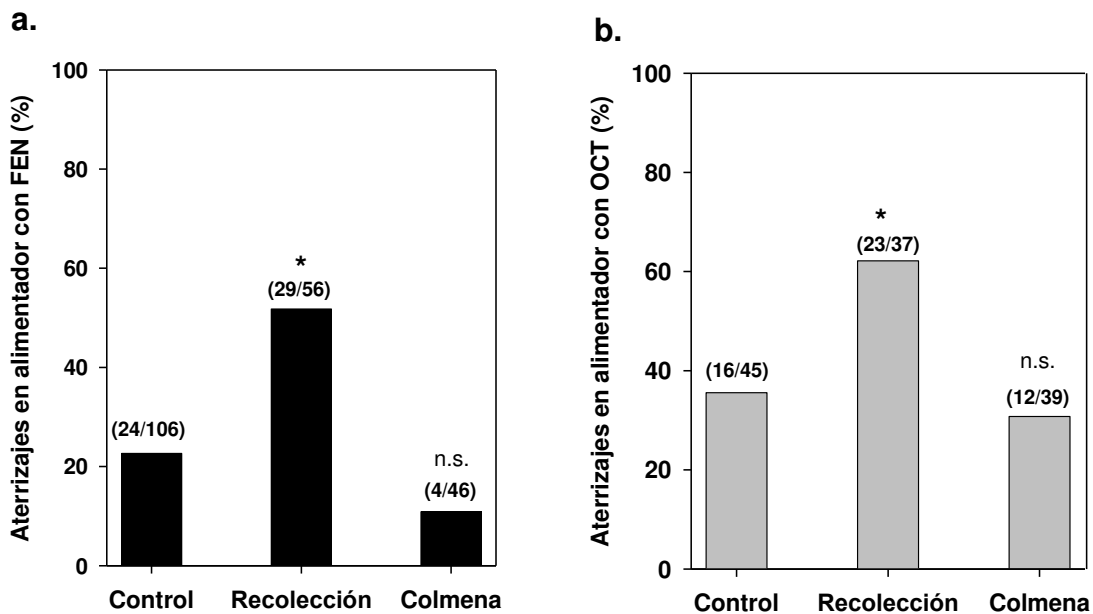
### *Influencia de las experiencias olfativas apetitivas en la elección de alimento*

El objetivo de este experimento fue evaluar si las experiencias olfativas apetitivas que las abejas *T. angustula* pudieran tener durante la recolección de alimento en un alimentador externo o dentro de la colmena podían sesgar sus elecciones alimenticias. La serie (i), en la cual trabajamos con el par de olores LIO y FEN, fue llevada a cabo durante dos años consecutivos: un grupo de preferencia espontánea y la estimulación en el alimentador externo se realizaron en 2008 y otro grupo de preferencia espontánea y la estimulación dentro de la colmena en 2009. Los dos grupos en los que evaluamos la preferencia espontánea de las abejas entre los olores LIO y FEN no diferían significativamente (Prueba exacta de Fisher  $p=0,818$ ) por lo que los agrupamos. Este fue el grupo control contra el que comparamos las elecciones entre los olores luego de cada una de las estimulaciones olfativas apetitivas. De aquellas abejas en que registramos la preferencia espontánea sólo el 23% aterrizó en el alimentador aromatizado con FEN, la mayoría prefirieron aterrizar en el que estaba aromatizado con LIO (Figura 2.3, panel izquierdo). Para evaluar si dicha preferencia podía ser sesgada por la ingesta de solución azucarada aromatizada durante la recolección, alimentamos



a un grupo de abejas con solución azucarada aromatizada con FEN en el alimentador externo. Le elección del alimentador aromatizado con FEN aumentó a 53/ (Prueba de G: Gh=23,624;  $p < 0,05$ ; N=208; Comparaciones Múltiples: Preferencia espontanea de FEN vs. FEN en el alimentador,  $\alpha' = 0,025$ : Gh=13,85;  $p < 0,001$ ). En cambio en la situación en que la solución aromatizada fue colocada en el interior de la colmena no vimos que aumentara la preferencia por el FEN de modo significativo, incluso pareciera haber una leve tendencia a elegir dicho alimentador aun menos que en el caso de la preferencia espontanea (elección de FEN: 11%) (Comparaciones Múltiples: Preferencia espontanea de FEN vs. FEN en la colmena,  $\alpha' = 0,025$ : Gh=3,13;  $p = 0,076$ ).

Para asegurarnos que estos resultados no dependían de los olores evaluados decidimos repetir el experimento con un nuevo par de olores: serie (ii) con los olores OCT y NON. Con este nuevo par de olores registramos que el olor menos preferido por las abejas fue el OCT: el 35/ de los individuos aterrizaron en el alimentador aromatizado con OCT (Figura 2.3 panel derecho). En cuanto al efecto de las estimulaciones con alimento aromatizado durante la recolección o dentro de la colmena, observamos un patrón similar al de la serie (i): cuando las abejas ingerían solución azucarada aromatizada con OCT en el alimentador externo aumentaban su elección de ese alimentador, pero no cuando la solución aromatizada se colocaba dentro de la colmena (Prueba de G: Gh=8,94;  $p < 0,05$ ; N=121; Comparaciones Múltiples: Preferencia espontanea de OCT vs. OCT en el alimentador,  $\alpha' = 0,025$ : Gh=5,83;  $p < 0,025$ ; Preferencia espontanea de OCT vs. OCT en la colmena,  $\alpha' = 0,025$ : Gh=0,22;  $p = 0,639$ ).



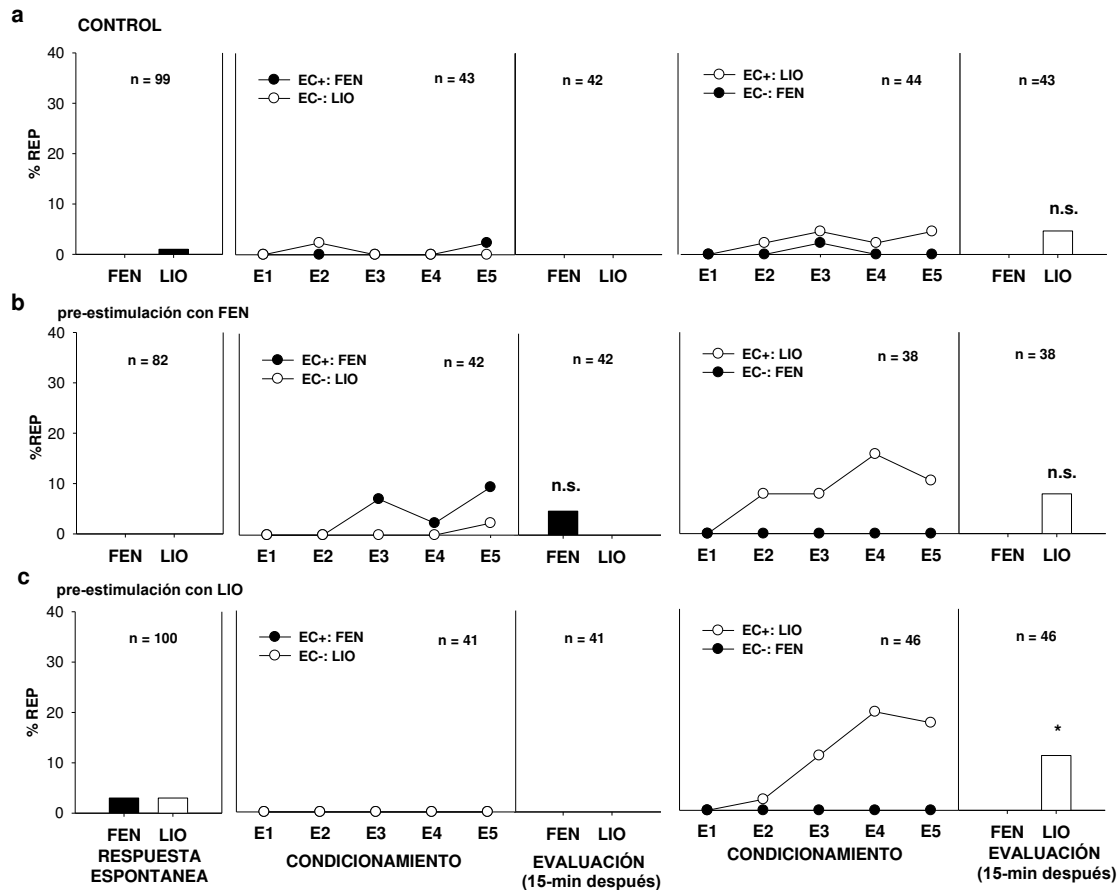
**Figura 2.3:** Elección entre alimentadores aromatizados durante el protocolo de elección en vuelo libre. (a) Proporción de abejas que elegían aterrizar en el alimentador aromatizado con FEN durante la serie (i) de los grupos control (elección espontánea), del grupo de pre-estimulación durante la recolección de alimento (Recolección) y del grupo pre-estimulado dentro de la colmena (Colmena) (b) Proporción de abejas que elegían aterrizar en el alimentador aromatizado con OCT durante la serie (ii) de los grupos control (elección espontánea), del grupo de pre-estimulación durante la recolección de alimento (Recolección) y del grupo pre-estimulado dentro de la colmena (Colmena). Los asteriscos indican diferencias significativas al comparar con el grupo control, Prueba de G (\*  $p < 0,025$ , ver Resultados para mas detalle).

### Condicionamiento Clásico REP

Para poder llevar a cabo un condicionamiento diferencial era necesario que las abejas presentaran una clara REP al contactar sus antenas con solución azucarada. De las 407 abejas *T. angustula* que fueron encephadas el 69% de ellas mostraron esta respuesta al contactar las antenas con solución azucarada 50% p/p. Estas abejas que presentaban la RI fueron las que utilizamos para llevar a cabo el condicionamiento diferencial.

En la figura 2.4a se observan las curvas de aprendizaje durante el condicionamiento diferencial en el paradigma REP de aquellas abejas *T. angustula* que no sufrieron ninguna estimulación olfativa previa (Grupo Control). Estas abejas prácticamente no mostraron RE ante la primera presentación de cada uno de los olores. Tanto en el condicionamiento FEN+ como en el LIO+ las abejas mostraron muy pocas RCs a lo largo del protocolo. En cada ensayo de condicionamiento calculamos el ID y por medio de un análisis de ANOVA de medidas repetidas analizamos si existía un aumento del ID a medida que se sucedían los ensayos de condicionamiento. Con ninguno de los olores recompensados evidenciamos que las abejas *T.*

*angustula* fueran aumentando su discriminación a lo largo del condicionamiento (ANOVA de medidas repetidas: Control FEN+:  $F=1,25$ ;  $gl=4$ ;  $p=0,289$ ; Control LIO+:  $F=0,49$ ,  $gl=4$ ;  $p=0,739$ ).



**Figura 2.4:** Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (%REP) durante el experimento de condicionamiento diferencial REP en la primera presentación de los olores (Respuesta Espontanea, panel izquierdo), durante los cinco pares de ensayos de condicionamiento (Condicionamiento), y durante el periodo de evaluación 15 minutos después del condicionamiento (Evaluación): (a) CONTROL: un alimentador lateral en la colmena ofrecía solución azucarada sin aromatizar; (b) Pre-estimulación FEN: el alimentador lateral en la colmena ofrecía solución azucarada aromatizada con FEN; (c) Pre-estimulación LIO: el alimentador lateral en la colmena ofrecía solución azucarada aromatizada con LIO. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba exacta de Fisher de una cola (\*  $p < 0,05$ , ver Resultados para más detalles).

A continuación nos interesó saber si la ingestión de alimento aromatizado podía llevar a las abejas a establecer alguna asociación entre el olor y el alimento que posteriormente se evidenciara como mejoras en la discriminación en el condicionamiento diferencial. Para ello a un grupo de abejas las alimentamos con solución azucarada aromatizada con FEN (pre-

estimulación FEN) y a otro con solución con LIO (Pre-estimulación LIO) antes de llevar a cabo los condicionamientos diferenciales FEN+ o LIO+.

En aquellos condicionamientos FEN+ (Figura 2.4, panel izquierdo), independientemente del olor de la pre-estimulación, los individuos no mostraron niveles significativos de discriminación a lo largo del protocolo (ANOVA de medidas repetidas: pre-estimulación FEN, FEN+:  $F=1,67$ ;  $gl=4$ ;  $p=0,160$ ; pre-estimulación LIO, FEN+: no registramos ninguna RC). En cambio pareciera que cuando durante el condicionamiento el olor recompensado era LIO las abejas fueron capaces de discriminar y responder diferencialmente a ese olor: individuos con ambos tipos de pre-estimulación evidenciaron niveles de discriminación mayores hacia el final del protocolo (ANOVA de medidas repetidas: pre-estimulación FEN, LIO+:  $F=2,43$ ;  $gl=4$ ;  $p=0,049$ ; pre-estimulación LIO, LIO+:  $F=4,47$ ;  $gl=4$ ;  $p=0,002$ ; Figura 2.4, panel derecho). Las abejas del grupo pre-estimulación FEN mostraron en el 4to ensayo una mayor discriminación que en ensayo inicial (prueba de Tukey) y aquellas pre-estimuladas con LIO mostraron mayores niveles de discriminación en el 4to y 5to ensayo (prueba de Tukey). Estos resultados indican que cuando LIO era el olor que estaba asociado a la recompensa azucarada durante el condicionamiento, las abejas que habían tenido acceso previamente a alimento aromatizado, si bien presentaron niveles de discriminación muy bajos, pudieron responder de modo diferencial y en mayor proporción al olor recompensado. El efecto de la pre-estimulación pareciera no haber sido específico ya que el alimento aromatizado con ambos olores generó un efecto similar de aumentar la discriminación de LIO como olor recompensado.

Durante la evaluación, es decir durante la presentación de ambos olores sin recompensa 15 minutos después de terminado el condicionamiento, solo aquellas abejas que habían sido pre-estimuladas con LIO y que además tenían a LIO como EC+ mostraron una mayor proporción de respuestas específicas al olor recompensado comparado con las respuestas al olor no recompensado (Prueba exacta de Fisher, una cola: Control, LIO+:  $p=0,247$ ; pre-estimulación FEN, FEN+:  $p=0,247$ ; pre-estimulación FEN, LIO+:  $p=0,120$ ; pre-estimulación LIO, LIO+:  $p=0,028$ ; Los grupos control y pre-estimulación LIO ambos con FEN como EC+ no mostraron ninguna RC en la evaluación; Figura 2.4, panel derecho).

## Discusión

En los presentes experimentos con la abeja nativa *Tetragonisca angustula* observamos que la ingesta de solución azucarada aromatizada durante viajes de recolección puede producir sesgos en las posteriores elecciones entre olores. Sin embargo cuando la solución aromatizada

era colocada dentro de la colmena ésta estimulación olfativa no pareciera tener efecto en sus elecciones. Diseccionando las habilidades de aprendizaje asociativo de estas abejas por medio del paradigma REP observamos que les resulta muy difícil discriminar y responder diferencialmente a un olor en este tipo de protocolos a menos que hayan tenido experiencias apetitivas previas con los olores del condicionamiento. Así y todo solo registramos una clara discriminación en el caso en que era LIO el olor recompensado y no cuando era FEN, indicando cierta asimetría en la habilidad de aprender los diferentes olores.

#### *Efecto de las experiencias olfativas previas en la elección de alimento*

Durante la recolección de alimento los animales deben tomar múltiples decisiones basándose en información que adquirieron en diferentes contextos. La única fuente de información que es común a cualquiera de ellos es el individuo en si mismo, es decir sus preferencias espontáneas y la memoria de sus experiencias previas (Beismeyer y Slaa, 2004). En el experimento de elección entre alimentadores observamos que las abejas se dirigen en mayor proporción a uno de los olores ofrecidos. Sin embargo esta tendencia inicial es plástica y puede ser modificada. Después de varios viajes recolectando una solución azucarada aromatizada con el olor por el que mostraron menor preferencia observamos un aumento en la elección de dicho olor. Este hecho pareciera indicar que las abejas *T. angustula* al elegir entre dos fuentes de alimento tienen en cuenta las claves quimiosensoriales de aquellos viajes de recolección previos que resultaron exitosos.

En el caso de las abejas melíferas se ha descrito que además de la información de los propios viajes de recolección exitosos pueden también utilizar la información adquirida dentro de la colonia para la elección entre fuentes de alimento (Free, 1969; Arenas *et al.*, 2007, 2008). Los abejorros también sesgan sus elecciones durante la recolección influenciados por el olor incorporado a la colmena por una compañera exitosa o introducido en los potes de miel (Molet *et al.*, 2009). En nuestros estudios sin embargo, no observamos cambios en las elecciones de *T. angustula* que dependieran del olor de la comida colocada dentro de la colmena.

#### *Condicionamiento clásico en el contexto REP*

EL condicionamiento clásico REP es un protocolo de aprendizaje estándar comúnmente utilizado en el estudio de las abejas melíferas (Bitterman, 1983). Si bien ha sido adaptado para ser utilizado con abejorros (Laloi *et al.*, 1999) y, como hemos visto en el capítulo anterior, es

posible utilizarlo con abejas sin aguijón del género *Melipona*, no debemos olvidar que fue desarrollado específicamente para el trabajo con las abejas melíferas (Toda *et al.*, 2009). Tanto los abejorros como las abejas *Melipona* alcanzan niveles finales de discriminación menores de los que pueden alcanzar las abejas melíferas quienes son capaces de mostrar una proporción de respuestas condicionadas al olor de entre 70 y 100% aun después de un único evento de condicionamiento (ver Bitterman *et al.*, 1983; máximo nivel alcanzado por abejorros: 44% Lalo *et al.*, 1999; *Meliponas*: 60% Capítulo 1). En nuestro estudio observamos que las abejas de la especie *Tetragonisca angustula* no fueron capaces de discriminar entre el olor recompensado y el que no lo estaba en este protocolo de aprendizaje. Prácticamente no mostraron respuestas condicionadas a lo largo de todo el condicionamiento. Sin embargo, cuando los individuos habían tenido contacto con una solución azucarada aromatizada dentro de la colmena, si bien su nivel de discriminación fue muy bajo (alrededor del 20%), observamos niveles significativos de discriminación, sugiriendo que las experiencias olfativas previas en un contexto social pueden ayudar a las abejas *T. angustula* a resolver la tarea de discriminación en el contexto REP.

Si bien registramos niveles significativos de discriminación en el condicionamiento, existieron asimetrías entre los olores: las abejas pudieron discriminar LIO como el EC+ pero no FEN. Existen ejemplos similares en abejorros quienes pueden discriminar LIO mucho mejor de lo que discriminan FEN (Lalo *y Pham-Delegue*, 2004). Esta mayor saliencia del LIO podría estar relacionada al hecho de que si bien ambos olores son componentes típicos de los olores florales, LIO pareciera ser más común en la flora melífera (Knudsen *et al.*, 1993). Otros autores han propuesto que LIO podría tener un valor intrínseco de comunicación como un componente de feromonas (Sandoz *et al.*, 2001; Lalo *y Pham-Delegue*, 2004). Apuntando en esta dirección en los experimentos de elección espontánea entre olores también observamos una preferencia de las abejas *T. angustula* por el LIO: cerca del 80% de las recolectoras sin experiencias olfativas previas aterrizaron en el alimentador aromatizado con este olor. La mayor saliencia de LIO por sobre FEN también fue evidente en el pre-tratamiento con alimento aromatizado antes del condicionamiento diferencial. Si bien la discriminación de LIO como EC+ solo fue significativa en las abejas pre-estimuladas, el efecto de este contacto previo con soluciones aromatizadas no fue el mismo para ambos olores: después de la pre-estimulación con FEN la discriminación del LIO como el EC+ fue apenas significativa ( $p=0,049$ ) y se perdió en la etapa de evaluación, mientras que con la pre-estimulación con LIO las abejas no sólo discriminaron mejor durante el entrenamiento, sino que también mostraron una mayor

respuesta específica al LIO en la evaluación. Este fenómeno podría ser un indicador de que el olor en el alimento ingerido en la colmena no sólo cumple un papel inespecífico, aumentando la discriminación de los olores en el posterior aprendizaje asociativo, sino que podría ser que se establezca una asociación específica entre el olor y el alimento y que esta asociación pueda ser evocada en un contexto de aprendizaje como el paradigma REP. Este fenómeno de transferencia de información olfativa entre un contexto en el cual se adquiere información y otro contexto en el cual se evoca ha sido descrito en abejas melíferas (Gerber *et al.*, 1996).

#### *Transferencia de información/alimento dentro de la colmena*

Cuando una abeja retorna de un viaje de recolección descarga del buche el alimento que transportó desde la fuente de alimento. En las abejas melíferas esta descarga es hecha a otras compañeras que se encargan de procesar el néctar y además tienen contactos trofalácticos cortos con otras compañeras (von Frisch, 1967; Farina, 1996; De Marco y Farina, 2003; Grüter *et al.*, 2008; Farina y Grüter, 2009). Estos contactos dentro de la colmena transmiten el olor del alimento a la abeja que recibe el néctar (Farina *et al.*, 2007) y permiten la rápida transferencia de la información olfativa hacia toda la colmena (Grüter *et al.*, 2006). En los abejorros el individuo recolector deposita la carga de néctar directamente en los potes de miel (Dornhaus y Chittka, 2005). Estos potes de reserva de miel funcionan como centros de información olfativa almacenada dentro de la colonia: antes de salir en un viaje de recolección los abejorros prueban el néctar/miel contenido en dichos potes (Dornhaus y Chittka, 2005). Para las abejas *Tetragonisca angustula* no existe una descripción detallada de la circulación de alimento dentro de la colmena. La única referencia al respecto describe la ocurrencia de contactos trofalácticos (Ferreira Grosso y Bego, 2002) pero el resto del circuito de procesamiento de alimento no ha sido descrito. En nuestro estudio trabajamos con tres tipos de alimentadores: uno en el exterior, uno lateral y uno interno. Tanto en el alimentador lateral (pre-estimulación antes del condicionamiento diferencial) como en el alimentador fuera de la colmena los individuos tenían contacto directo con la solución aromatizada y en ambos casos detectamos un efecto de la estimulación olfativa. Por otro lado, al colocar la solución aromatizada en el alimentador dentro de la colmena asumimos que el alimento aromatizado circularía entre todas las compañeras de la colonia, o bien por contacto directo con la solución y/o por trofalaxia. En esta situación no registramos modificaciones del comportamiento de las abejas como efecto del olor en la comida. Este alimentador interno estaba en la parte superior de la colmena, por encima de los cuadros de cría. Es posible que el grupo de abejas encargadas de procesar ese alimento y colocarlo en los potes de miel no interactuara directamente con las

recolectoras de néctar que salían de la colmena ya que la entrada/salida estaba ubicada en la parte inferior. De este modo es posible que las abejas recolectoras que eligieron entre los alimentadores aromatizados nunca tuvieron contacto previo con la solución aromatizada y es por eso que sus elecciones no se vieron afectadas por la supuesta experiencia olfativa. En los abejorros se ha descrito que cuando se coloca un olor dentro de la colmena que no está directamente asociado a una recompensa de alimento, éste olor no genera ningún efecto en la elección entre alimentadores en el exterior (Molet et al, 2009). En nuestro trabajo cuando las abejas tuvieron que elegir entre los alimentadores externos aromatizados con LIO o FEN incluso observamos cierta tendencia a evitar el alimentador con FEN que era el olor que había sido colocado dentro de la colmena. Este tipo de fenómeno en el que se evita el alimentador que está aromatizado con un olor que estuvo dentro de la colmena pero no asociado con alimento ya ha sido descrito para las abejas melíferas (Arenas *et al.*, 2007).

#### *Estrategias de recolección*

El olor de una fuente de alimento es quizás la información más comúnmente utilizada por las abejas recolectoras. Entre las abejas sin aguijón las diferentes especies utilizan esta información junto con muchas otras claves dando lugar a diferentes estrategias de recolección. Para algunas especies el olor del alimento es la única clave utilizada cuando salen en una búsqueda aleatoria mientras que en otras especies la búsqueda se basa en claves precisas de reclutamiento, como pueden ser claves químicas depositadas en o cerca de la fuente de alimento, y el olor del alimento solo se vuelve relevante en el reconocimiento final de la fuente (Aguilar, 2004). Cuando una abeja *T. angustula* retorna a la colmena luego de un viaje de recolección exitoso despliega un comportamiento de alerta general por medio de corridas en zig-zag y producción de sonidos (Kerr, 1969; Aguilar, 2004). Como ya mencionamos antes estas abejas son recolectoras solitarias (Johnson, 1983) que no muestran un reclutamiento eficiente medido como un aumento de compañeras en una fuente de alimento productiva (Aguilar *et al.*, 2005). Teniendo esto en cuenta es posible que su estrategia recolectora esté basada en sus propias experiencias previas y no tanto en la información provista por las compañeras de la colonia. Esto explicaría porque solo el contacto directo con el alimento aromatizado generó un efecto en el subsiguiente comportamiento de elección entre alimentadores y no la simple circulación de alimento aromatizado dentro de la colmena. El uso de la información individualmente adquirida pareciera ser extremadamente importante en las abejas en general, incluso las abejas melíferas, que presentan el canal de comunicación más sofisticado y finamente afinado entre todos los insectos (la danza de reclutamiento, von Frisch, 1967)



pueden en ciertas ocasiones ignorar la información adquirida al seguir las danzas de contoneo de sus compañeras dentro de la colmena y utilizan la información adquirida en viajes previos de recolección en su búsqueda de alimento (Grüter *et al.*, 2008).

Otro factor a tener en cuenta al analizar la relevancia del olor del alimento para las abejas *T. angustula* es que dicho olor para las abejas en general es relevante en el acercamiento final a la fuente de alimento, induciendo a la abeja a aterrizar (von Frisch, 1914). Se sabe que las abejas *T. angustula* depositan fuertes marcas de feromonas en las fuentes de alimento que fomentan la elección de las abejas, incluso si eso contradice la experiencia previa individual con el color de la fuente (Villa y Weiss, 1990). En este sentido es posible que el olor del alimento no sea particularmente relevante para esta especie de abejas sociales.

### **Capítulo 3: Efecto de la Octopamina en el aprendizaje olfativo de la abeja *Melipona Scutellaris***

En la búsqueda de los sustratos neuronales del aprendizaje, los insectos en general y la abeja *Apis mellifera* en particular, han resultado modelos particularmente productivos (Hammer, 1997; Menzel, 1999; Scheiner *et al.*, 2006; Giurfa, 2007). En esta búsqueda han surgido numerosos estudios sobre las aminas biogénicas debido a su papel en el control y la modulación tanto de respuestas fisiológicas como comportamentales (en abejas ver resumen: Scheiner *et al.*, 2006; en *Drosophila*: ver Gerber y Stocker, 2007). Las aminas biogénicas son sustancias derivadas de aminoácidos que cumplen funciones de neurotransmisores, neuromoduladores y neurohormonas tanto en vertebrados como invertebrados (Scheiner *et al.*, 2006). En las abejas melíferas las aminas biogénicas modulan las respuestas reflejas a estímulos de diferentes modalidades sensoriales (Scheiner *et al.*, 2002; Pankiw y Page, 2003) e incluso comportamientos complejos como el aprendizaje y la formación y evocación de memoria (Mercer y Menzel, 1982; Hammer *et al.*, 1994; Hammer y Menzel, 1998; Menzel *et al.*, 1999; Farooqui *et al.*, 2003), los despliegues de danza (Barron *et al.*, 2007) y la división de tareas dentro de la colmena (Schulz y Robinson, 2001). Estas aminas pueden actuar a nivel inespecífico modificando el estado interno del individuo (Hammer y Menzel, 1994; Hammer y Menzel, 1995; Menzel, 1990; Huber, 2005) pero también se ha visto que tienen efectos muy concretos como la capacidad de suplantar al refuerzo apetitivo en el aprendizaje asociativo (Hammer, 1993; Hammer y Menzel, 1998; Schroll *et al.*, 2006).

Entre las aminas biogénicas, la Octopamina (OA) cumple en invertebrados funciones de neurohormona en el metabolismo de grasas y carbohidratos, neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central y de neuromodulador de músculos y neuronas sensoriales (Roeder, 1999; Hammer, 1997; Schroeter *et al.*, 2006). Si bien la OA y la noradrenalina no son químicamente idénticas, se ha planteado que la OA cumpliría funciones homólogas a las del sistema adrenérgico de los vertebrados (Roeder, 1999). Entre los muchos efectos que tiene la OA en la abeja *A. mellifera* resulta de particular interés su rol en el aprendizaje de naturaleza apetitiva. Por un lado aumenta la sensibilidad al azúcar (Scheiner *et al.*, 2002), lo que llevaría a aumentar el valor de la recompensa (neuromodulador). Además, puede reemplazar completamente a la recompensa azucarada ya que es el neurotransmisor de las neuronas VUM (ventral unpaired median) que son quienes codifican esta recompensa (Hammer y Menzel, 1998; Giurfa, 2006; Schroeter *et al.*, 2006). Se ha observado que los tratamientos con antagonistas de OA, o que disminuyen la funcionalidad de los receptores de OA, tienen efectos

adversos tanto en la adquisición como la evocación de lo aprendido en un protocolo REP (Farooqui *et al.*, 2003). También se ha visto que micro inyecciones de OA en diferentes partes del cerebro de la abeja inducen el aprendizaje asociativo (Hammer y Menzel, 1998).

En lo que respecta a las abejas sin aguijón hasta la fecha no se han realizado estudios sobre el efecto que pudieran tener las aminas biogénicas sobre la conducta o la fisiología de los individuos. El hecho de estar estrechamente emparentadas con las abejas melíferas (Michener, 2000) nos permite suponer que probablemente compartan los sustratos neurológicos que intervienen en la adquisición y el almacenamiento de información quimio-sensorial (Hammer y Menzel, 1996; Hammer, 1997; Giurfa, 2007). Sin embargo presentan un amplio espectro comportamental en lo referido a la actividad recolectora tanto individual como colectiva (Lindauer y Kerr, 1958; Nieh, 2004; Beismejijer y Slaa, 2004; Barth *et al.*, 2008). Este gradiente comportamental permitiría realizar estudios comparativos del efecto de las aminas en el aprendizaje y/o la sensibilidad gustativa que permitieran cotejar los mecanismos de acción de las mismas propuestos para la abeja melífera.

Basándonos en todo esto consideramos a la Octopamina como un buen punto de partida para estudiar el efecto de neuromoduladores en el aprendizaje de las abejas sin aguijón ya que la misma estaría presente en las redes neuronales involucradas en el aprendizaje de tipo asociativo. Trabajamos con abejas de la especie *Melipona scutellaris*. Como punto de partida evaluamos el efecto de la OA en la sensibilidad gustativa de estas abejas por medio del protocolo URA. En lo que respecta al aprendizaje olfativo reportes previos relataban la incapacidad de las abejas *Melipona scutellaris* de aprender en el protocolo de condicionamiento simple REP (Abramson *et al.*, 1999). Sin embargo consideramos que si la OA tenía un efecto similar al visto en las abejas melíferas de fomentar la adquisición del aprendizaje asociativo, entonces podríamos conseguir un mejor desempeño de estas abejas en ese tipo de protocolos. Para evaluarlo realizamos un estudio de condicionamiento diferencial en el paradigma REP que como ya fue mencionado nos permite descartar la ocurrencia de procesos no asociativos y asegurarnos que existen procesos asociativos específicos. Este hecho junto con la evaluación de los URA resulta de particular importancia en el tratamiento con OA ya que, en el caso de observar mejoras en el aprendizaje (es decir, aumento en los niveles de adquisición), nos permitiría descartar que se deban a cambios en la sensibilidad o el estado de activación (arousal).

## **Materiales y métodos**

Los experimentos se realizaron en el Campus de Ribeirão Preto de la Univerisdade de São Paulo, Brasil, entre Mayo y Julio del 2009. Trabajamos con dos colonias de abejas *Melipona scutellaris* que habían sido traídas de Aracajú (Noreste Brasileiro) y establecido en el interior del laboratorio a principios del 2007. Estas colmenas estaban conectadas al exterior por medio de tubos plásticos que atravesaban la pared permitiendo la libre salida de las abejas. Ambas colonias tenían una reina, cuadros de cría y reservas de alimento en cantidad suficiente.

El objetivo de este estudio fue evaluar si existe un efecto de la Octopamina (OA) sobre la sensibilidad gustativa y/o el aprendizaje asociativo en las abejas Meliponas. Para poder evaluar tanto la sensibilidad gustativa como la capacidad de aprender asociativamente de esta especie de abejas, comenzamos poniendo a punto el protocolo REP. Para ello verificamos que presentaran una clara respuesta de extensión de la probóscide al contactar las antenas con solución azucarada. Una vez establecido esto utilizamos esta respuesta refleja para llevar a cabo el protocolo de Umbrales de respuesta al azúcar (URA) y de condicionamiento diferencial olfativo. Ambos protocolos se realizaron antes y después de administrar Octopamina de forma oral (según protocolo ya utilizado con anterioridad, ver Scheiner *et al.*, 2002).

### **Captura y encepado de las abejas**

Entrenamos a las abejas a recolectar solución azucarada 50% p/p sin aromatizar de un alimentador ad-libitum colocado entre 3 y 5m de la entrada de las colmenas. Una vez alcanzado un número alto de recolectoras (más de 20) comenzamos con la captura de los individuos. En cuanto aterrizaban en el alimentador colocábamos un frasco pequeño de vidrio invertido sobre la abeja antes de que tuviera tiempo de alimentarse. De este modo esperamos estandarizar la carga de buche que pudieran tener los individuos. Una vez capturadas las abejas eran encepadas del modo ya descrito se las mantenía a temperatura ambiente y en oscuridad (dependiendo del protocolo a seguir) entre 50 y 90 minutos.

### **Sensibilidad Gustativa**

Para evaluar la sensibilidad gustativa de las abejas *M. scutellaris* utilizamos el protocolo de URA. Una vez que los individuos habían sido encepados se los dejaba reposar por 50 minutos antes de evaluar sus URA siguiendo el protocolo ya descrito. Acto seguido separábamos a las abejas en cuatro grupos y las alimentábamos con soluciones azucaradas que contenían diferentes concentraciones de OA. Basándonos en trabajos similares realizados con abejas melíferas (Scheiner *et al.*, 2002) dejábamos pasar 30 minutos y volvíamos a evaluar los URA.

De este modo teníamos el dato para cada individuo de su Puntaje URA antes y después de la ingestión de OA.

#### *Administración Oral de Octopamina*

Estudios previos muestran que la administración oral de soluciones con OA en abejas melíferas aumenta la concentración de ésta amina en el cerebro (Schulz y Robinson, 2001; Barron, 2007). Con esas abejas se encontraron diferencias en los puntajes URA luego de la ingestión de 1,9 µg y 19 µg de OA disuelta en 10 µl de solución azucarada (Scheiner *et al.*, 2002; Pankiw y Page, 2003). Basándonos en estos trabajos y teniendo en cuenta que las abejas *M. scutellaris* son un poco más pequeñas que las abejas melíferas (el tamaño promedio de una obrera de *M. scutellaris* es de aproximadamente 10-12 mm) decidimos alimentarlas con 5µl de solución azucarada 50/ p/p con alguna de las siguientes concentraciones de OA: el grupo control recibió solución azucarada sin OA(0 µg OA), un segundo grupo solución azucarada con OA 0,01M (9,5µg de OA), un tercer grupo con OA 0,02M (19µg de OA), y un último con OA 0,04M (38µg de OA). Todas las soluciones contenían ácido ascórbico  $10^{-2}$  M para evitar la rápida oxidación de las soluciones de OA.

#### **Aprendizaje asociativo del tipo olfativo**

Para evaluar el posible efecto de la Octopamina en el aprendizaje asociativo decidimos utilizar el protocolo de condicionamiento clásico REP. Para ello una vez que las abejas eran capturadas y encepadas las dejábamos reposar durante 90 minutos. Pasado ese tiempo evaluábamos cuales de los individuos presentaban la respuesta incondicionada REP al contactar sus antenas con solución azucarada 50% p/p. Estos individuos que presentaban una respuesta REP eran separados en dos grupos: uno era alimentado con 5µl solución azucarada 50% p/p (grupo control) y el otro con 5 µl de la solución azucarada con OA 0.02M (19µg OA) (grupo tratado con OA). Elegimos ésta concentración de OA ya que en el análisis de la sensibilidad gustativa observamos que era la cantidad de OA que generaba un mayor efecto en las abejas *M. scutellaris*. Ambos grupos se dejaban reposar por 30 min para dejar actuar a la OA y luego se los sometía a un protocolo de condicionamiento diferencial REP. Durante el condicionamiento utilizamos los olores puros FEN (como EC+) y LIO (como EC-).

### **Análisis estadístico**

El análisis de la sensibilidad gustativa antes y después de la ingestión de OA se realizó comparando los puntajes URA en cada situación por medio de una prueba de T para muestras pareadas (Zar, 1999).

El desempeño durante el protocolo de condicionamiento diferencial REP se analizó calculando los IDs de cada individuo en cada ensayo. En vista de que ninguna de las abejas respondió al EC- en todo el condicionamiento, en este caso los IDs pasaron a ser simplemente 1 si respondía al EC+ y 0 si no respondía. Estos IDs se compararon por medio de una prueba de ANOVA de medidas repetidas de dos factores: un factor fueron los sucesivos ensayos (factor ENSAYO: 5 niveles de medidas repetidas) el otro el tratamiento con OA (factor TRATAMIENTO: 2 niveles; control y tratado con OA).

Para evaluar la retención de los niveles de discriminación adquiridos durante el condicionamiento comparamos los IDs del último ensayo de condicionamiento (5to ensayo) con los de la evaluación por medio de una prueba de *t* para muestras pareadas. En vista de que los datos del último ensayo de condicionamiento ya habían sido utilizados para el análisis de ANOVA de medidas repetidas aplicamos una corrección de Bonferroni que produjo una modificación del coeficiente de significancia ( $\alpha' = 0,025$ ).

### **Resultados**

Teniendo en cuenta los experimentos de los índices URA junto con el de condicionamiento diferencial, en total se capturaron y encephalaron 346 abejas *M. scutellaris*. El 86% de ellas respondieron extendiendo la probóscide al contactar las antenas con solución de azúcar 50% p/p ya fuera al final del ensayo de URA o antes del condicionamiento. Semejante proporción de respuestas nos hace considerar a *M. scutellaris* como una especie de abeja sin aguijón apropiada para trabajar con este tipo de protocolos.

#### **Efecto de la ingestión de OA en la sensibilidad gustativa**

Para evaluar el efecto de la ingestión de OA sobre la sensibilidad gustativa de las abejas *M. scutellaris* comparamos sus puntajes URA antes y después de la ingestión de soluciones azucaradas con diferentes concentraciones de OA. En la figura 3.1 se puede observar que en el caso en que la solución ingerida no contenía OA (sin OA) no encontramos diferencias significativas en los puntajes URA antes y después de la ingesta de solución (prueba de *t* para muestras pareadas:  $t = -0,6$ ;  $gl = 36$ ;  $p = 0,55$ ). Los otros tres grupos experimentales en los que

las abejas ingirieron soluciones azucarada con OA diluida en distintas concentraciones (0,01M, 0,02M y 0,04M) mostraron un aumento en su sensibilidad al azúcar demostrado por un aumento en sus puntajes URA (prueba de t para muestras pareadas: 0,01M:  $t = -2,32$ ;  $gl=36$ ;  $p=0,025$ ; 0,02M:  $t = -3,42$ ;  $gl=42$ ;  $p=0,001$ ; 0,04M:  $t = -2,03$ ;  $gl=40$ ;  $p=0,048$ ).

Estos resultados demuestran que la sensibilidad al azúcar e las abejas *M. scutellaris* puede ser modulada por la ingestión de una amina biogénica como la OA.

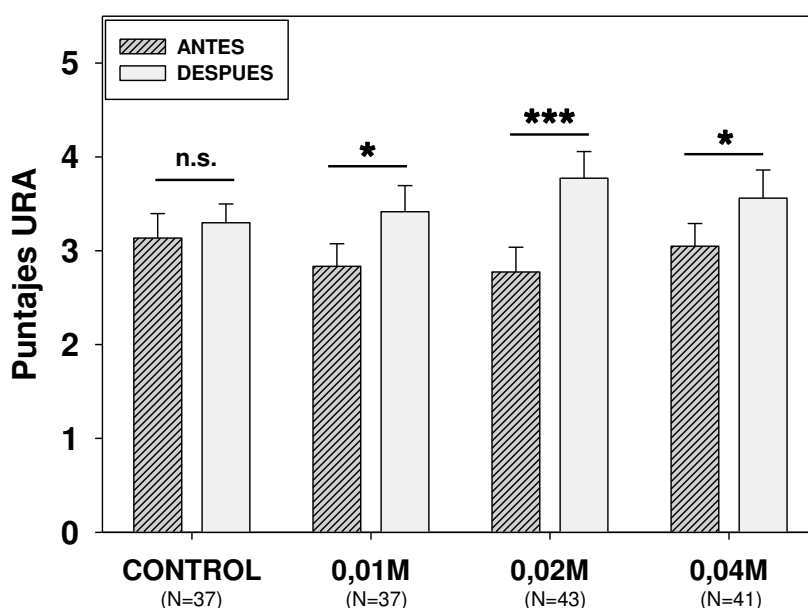


Figura 3.1: Sensibilidad Gustativa. Puntajes URA de las abejas *M. Scutellaris* antes y después de la ingestión de solución azucarada 50% p/p con diferentes concentraciones de OA: el grupo sin OA ingirió sólo solución azucarada y los otros grupos solución azucarada con OA 0,01M, OA 0,02M y OA 0,04M. Las tres concentraciones de OA produjeron un aumento significativo en la sensibilidad gustativa de las abejas. (Test de t de muestras pareadas, \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ )

### Efecto de la OA en el aprendizaje asociativo

Altos valores de puntaje URA implican un menor umbral de respuesta al azúcar y han sido asociados a un mejor desempeño en los protocolos de aprendizaje asociativo en las abejas melíferas (Scheiner *et al.*, 2001, 2003). Nuestra intención fue evaluar si lo mismo ocurría en las abejas de la especie *M. scutellaris*. En el experimento anterior observamos que la ingesta de solución azucarada con OA 0,02M aumentaba significativamente la sensibilidad al azúcar de estas abejas, por lo que comparamos su desempeño en el protocolo de condicionamiento

diferencial REP luego de haber ingerido 5 $\mu$ l de solución azucarada 50% (grupo Control) o 5 $\mu$ l de solución azucarada con OA 0,02M (grupo Tratamiento con OA). Observamos que en ambos grupos las abejas *M. scutellaris* pudieron resolver el paradigma de discriminación respondiendo diferencialmente al olor asociado a la recompensa (Figura 3.2). Incluso no registramos ninguna respuesta al olor no recompensado (EC-) sino sólo al EC+. El aprendizaje de ambos grupos se evidencia en el aumento de la proporción de respuestas al EC+ en los sucesivos ensayos de condicionamiento (ANOVA de dos factores, factor ENSAYO con 5 medidas repetidas:  $F= 17,89$ ;  $gl= 4$ ;  $p<0,001$ , Figura 3.2). A pesar de haber visto que la ingestión de solución de OA 0,02M generaba un aumento en la sensibilidad gustativa, no observamos que el tratamiento con OA produjera un aumento significativo en la discriminación durante el condicionamiento (ANOVA de dos factores, factor TRATAMIENTO:  $F= 0,88$ ;  $gl= 1$ ;  $p=0,35$ ).

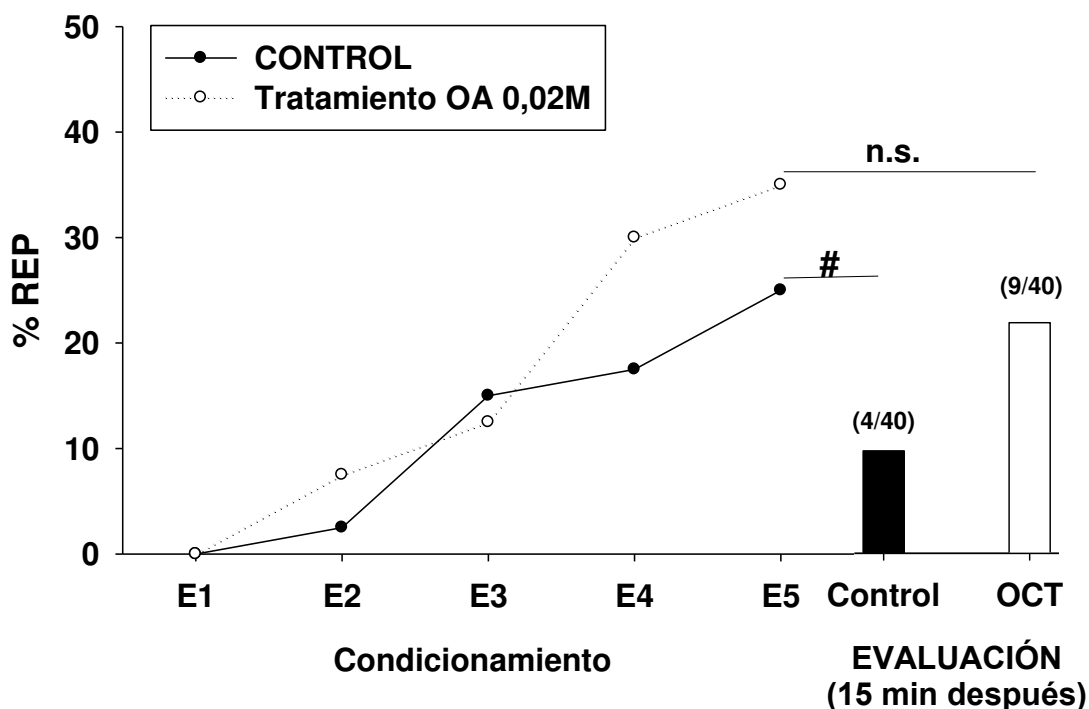


Figura 3.2: Porcentaje de las abejas *M. scutellaris* que extendieron su probóscide (%REP) al EC+ (FEN) durante los cinco pares de ensayos en un protocolo REP de condicionamiento diferencial y porcentaje de las abejas que respondieron extendiendo la probóscide a la presentación de FEN en la etapa de evaluación 15 minutos después de terminado el condicionamiento. CONTROL: abejas que ingirieron solución azucarada 50% p/p sin OA; Tratamiento OA 0,02M: abejas que ingirieron solución azucarada 50% p/p con OA 0,02M. # indica diferencias significativas con un nivel de significancia  $\alpha= 0,05$  (test de t de muestras pareadas)



A fin de evaluar si la ingestión de OA tenía algún efecto en la retención de lo aprendido durante el condicionamiento, comparamos el nivel de respuesta alcanzado al final del protocolo (5to ensayo de condicionamiento) con el de la evaluación. Observamos que las abejas del grupo control mostraron una tendencia a disminuir sus niveles de discriminación en la evaluación (prueba de  $t$  para muestras pareadas: ( $\alpha'=0,025$ ):  $t= 2,22$ ;  $gl= 39$ ;  $p= 0,03$ , Figura 3.2) mientras que los individuos que habían ingerido la solución con OA mantuvieron en la evaluación los niveles de respuesta alcanzados durante el condicionamiento (prueba de  $t$  para muestras pareadas: ( $\alpha'=0,025$ ):  $t= 1,95$ ,  $gl= 39$ ;  $p= 0,06$ ).

## Discusión

En el presente estudio administramos OA de forma oral a abejas sin aguijón de la especie *Melipona scutellaris* a fin de evaluar si esa amina biogénica tenía algún efecto similar a los descritos para las abejas melíferas. Pudimos observar que la ingesta de OA generó un aumento en la sensibilidad gustativa. En lo que respecta al aprendizaje asociativo observamos que las abejas *M. scutellaris* si bien fueron capaces de resolver las tareas de discriminación que requiere el condicionamiento diferencial, 15 minutos más tarde había una disminución en la capacidad de discriminar. Al administrar OA por vía oral antes del condicionamiento observamos que los niveles de adquisición fueron los mismos que los de las abejas sin tratar, pero en cambio mantenían la discriminación aprendida durante el condicionamiento durante la evaluación 15 minutos más tarde. El agregado de OA permitiría entonces desarrollar el protocolo de condicionamiento clásico del modo en que fue diseñado para las abejas melíferas.

### *Modulación de la sensibilidad gustativa por la OA en M. scutellaris*

En abejas melíferas la determinación del URA es un procedimiento estandarizado que permite evaluar la sensibilidad gustativa al azúcar (Page *et al.*, 1998). Esta medida a su vez resulta un indicador de una propensión general a responder a estímulos de diferentes modalidades sensoriales (Scheiner, 2004; Erber *et al.*, 2006) y por lo tanto se lo toma como un indicador del estado de activación (arousal) de los individuos (Page y Erber, 2002). Esta idea surge a partir de que los URA correlacionan con la división de tareas dentro de la colmena (Pankiw y Page, 1999) y modulan tanto el aprendizaje asociativo REP (Scheiner *et al.*, 1999, 2001) como procesos de aprendizaje no asociativo (Scheiner, 2001). Es por todo esto que la medida de la sensibilidad gustativa puede ser un buen indicador del efecto que pudieran tener las aminas biogénicas sobre el estado interno de las abejas.

En nuestros experimentos registramos aumentos de los puntajes URA con las tres cantidades de OA administradas (9,5; 19 y 38 $\mu$ g). En las abejas melíferas los aumentos en la sensibilidad al azúcar se evidenciaron luego de la ingesta de 1,9 o 19 $\mu$ g de OA (Scheiner *et al.*, 2002). En lo que respecta entonces a la administración por vía oral de OA pareciera que las cantidades que generan efectos en las abejas melíferas y las abejas sin aguijón estarían en intervalos similares. Otros métodos de administración en las abejas melíferas requieren menores cantidades de OA para producir efectos sobre la sensibilidad gustativa: la inyección en el tórax de 0,19 $\mu$ g produce una disminución del URA (Scheiner *et al.* 2002) o la inyección de 0,005 $\mu$ g directamente en el cerebro produce un aumento en la propensión a responder espontáneamente a olores o al vapor de agua (Mercer y Menzel, 1982).

Teniendo en cuenta que las cantidades de OA administradas a las abejas *M. scutellaris* en nuestros experimentos produjeron cambios significativos en los URA fueron esas mismas cantidades las que administramos para evaluar el efecto de esta amina en el aprendizaje asociativo en el paradigma REP.

#### *Condicionamiento diferencial en el paradigma REP en las abejas M. scutellaris*

Son muy pocas las referencias de estudios de condicionamiento y/o aprendizaje asociativo en las abejas sin aguijón previos a este trabajo de tesis. De las pocas referencias existentes la mayoría son en protocolos de condicionamiento operante utilizando claves visuales (Pessotti y Sénéchal, 1981; Villa y Weis, 1990). En lo que respecta al condicionamiento clásico en el paradigma REP la única referencia previa era la de Abramson y colaboradores (1999), quienes al estudiar las habilidades cognitivas de las abejas *Melipona scutellaris* informaron que ésta especie era incapaz de ser condicionada en un protocolo de condicionamiento absoluto, aun luego de 12 presentaciones de un olor asociado a una recompensa azucarada. Nuestros resultados, sin embargo, indican que estas abejas son capaces de asociar un olor a una recompensa en el protocolo REP. Si bien tanto el condicionamiento absoluto como el diferencial son ejemplos de aprendizaje elemental (Giurfa, 2003) en el primer caso se presenta un único olor recompensado sucesivas veces. Esta situación de repetidas estimulaciones con azúcar podría generar aumentos en la respuesta al olor simplemente como un efecto de sensibilización provocado por la recompensa azucarada (Hammer *et al.*, 1994) o un efecto de “priming” sensorial que produce una respuesta sesgada a un estímulo producto de su exposición previa (Schacter y Buckner, 1998; Giurfa, 2003; Bouton y Moody, 2004). El condicionamiento diferencial en cambio, implica discriminar entre dos olores, uno recompensado (EC+) y otro no recompensado (EC-), y responder únicamente al primero,

permitiendo asegurar que el mecanismo de aprendizaje es de naturaleza asociativa (Bitterman *et al.*, 1983; Menzel y Giurfa, 2001; Bouton y Moody, 2004). De este modo nuestros resultados en el condicionamiento diferencial nos permiten asegurar que las abejas *Melipona scutellaris* pueden aprender la asociación específica entre un olor floral y la recompensa azucarada en el paradigma REP.

#### *Efecto de la OA en el aprendizaje asociativo*

En la abeja melífera se ha establecido que el aumento de los niveles de OA por microinyección en el lóbulo antenal produce aumentos en la proporción de respuestas de los individuos en el condicionamiento apetitivo que utiliza azúcar como recompensa (Hammer y Menzel, 1998). También se ha visto que el bloqueo de los receptores de OA mediante un antagonista inespecífico como la mianserina, reduce significativamente los procesos de adquisición y de evocación de memorias de forma independiente (Farooqui *et al.*, 2003). Estas modulaciones del aprendizaje son posibles debido a que existen fibras octopaminérgicas que inervan la mayoría de los neuropilos del cerebro (Kreissl *et al.*, 1994; Scheiner *et al.*, 2006). Además de esas modulaciones, a un nivel neuronal específico, gran parte de los efectos de la OA en el aprendizaje de las abejas se deben a que la OA es el neurotransmisor de las neuronas VUM (ventral unpaired median interneuron). Los somas de estas neuronas están ubicados en el ganglio subesofágico pero sus ramificaciones incluyen diferentes centros relacionados con la percepción de olores, de azúcar y centros de asociación como los cuerpos pedunculados (Kreissl *et al.*, 1994, Schroeter *et al.*, 2006). Estas neuronas responden tanto a estímulos olfativos como a la sacarosa y se cree que median en la función de refuerzo durante el aprendizaje asociativo (Hammer, 1993; Schroeter *et al.*, 2006). Entre las neuronas VUM muchos de los efectos de la OA en el aprendizaje se han asociado específicamente a la actividad de la interneurona VUMmx1 (Hammer, 1997; Menzel, 1999). Registros electrofisiológicos han demostrado que al estimular esta neurona se puede llegar a reemplazar a la recompensa azucarada durante el condicionamiento (Hammer y Menzel, 1998). La función de la recompensa en el aprendizaje puede ser codificada por VUMmx1, ya que responde liberando OA (Hammer, 1993) al contactar las piezas bucales con azúcar, pero no responde espontáneamente a un olor. Sin embargo, luego de un protocolo de asociación entre el azúcar y la recompensa comienza a responder también al olor recompensado (Hammer, 1993).

Si bien se desconocen los sustratos neuronales de las abejas melíponas, creemos poder asumir que no deben diferir demasiado de los de las abejas melíferas. Al agregar OA en la dieta, asumimos que se produce un aumento de los niveles de ésta en el cerebro del mismo modo

que en las abejas melíferas (Barron *et al.*, 2007). Este aumento podría afectar la concentración basal de OA en el cerebro aumentando la fuerza de la recompensa azucarada. Esto podría tener como consecuencia un mayor nivel de aprendizaje. Si bien observamos cierta tendencia de las abejas tratadas con OA a presentar mayor proporción de respuestas REP no se encontró una diferencia significativa en su discriminación al comparar los individuos control con los tratados. Sin embargo, pudimos observar que el grupo de abejas que habían ingerido OA presentaron una retención del aprendizaje al mantener el nivel de respuesta adquirido durante el condicionamiento en la etapa de evaluación, 15 minutos más tarde. Si bien esta retención de lo aprendido por el establecimiento de memorias de corto término es lo que usualmente se ve en las abejas melíferas (Menzel, 1999); en el grupo control se observó una caída de ese nivel de respuesta. Aunque se registró un buen desempeño de las abejas *M. scutellaris* durante el condicionamiento, es posible que esta especie de abeja sin aguijón no sea capaz de establecer durante el condicionamiento las memorias necesarias para mantener la discriminación la terminar el protocolo (como ya se discutió en capítulos anterior para otras especies sin aguijón). En ese sentido la OA podría estar facilitando la formación de una memoria de corto término más estable que en las abejas sin tratar. Este tipo de fenómeno ya ha sido observado para las abejas melíferas (Farooqui *et al.*, 2003).

Es posible entonces que la OA estuviera generando otras modificaciones en el aprendizaje de las abejas *M. scutellaris* pero que hicieran falta adaptaciones del protocolo REP para visualizar dichos efectos. Un cambio posible en el protocolo podría ser aumentar la cantidad de OA ingerida. En nuestros experimentos las abejas ingirieron 19µg de OA. Dicha cantidad podría no haber sido suficiente para generar cambios significativos en el nivel de OA en el sistema nervioso central, que es donde se genera el aprendizaje asociativo. Los experimentos con abejas melíferas en los cuales se midió un aumento de la cantidad de OA en el sistema nervioso central luego de la administración oral de la misma y además efectos de la OA en diferentes comportamientos complejos como en la danza de reclutamiento (Barron *et al.*, 2007) o la probabilidad de iniciar la actividad recolectora en abejas de colmena (Schultz y Robinson, 2001) fueron realizados ofreciendo solución de OA cercana a 0,01M ad-libitum dentro de la colmena por cerca de 4 días (Shultz y Robinson 2002, Barron et al 2007). Bien podría ser que al ingerir sólo 19µg de OA los niveles de esta amina en el cerebro de las abejas *M. scutellaris* no aumentara significativamente como para permitir cambios notorios en un comportamiento complejo como es el condicionamiento diferencial. Los umbrales de respuesta al azúcar en cambio pueden estar modulados por ganglios periféricos donde es posible que los niveles de OA fueran mayores que la concentración que efectivamente llegó al

cerebro (Barron *et al.*, 2007). Por todo lo expuesto el tema de la cantidad de OA necesaria para generar este tipo de modificaciones en comportamientos complejos pareciera no estar tan claro ni siquiera en las abejas melíferas.

Otro factor a tener en cuenta es el tiempo entre la administración de la OA y el protocolo de aprendizaje. Si bien en las abejas melíferas 30min parece ser suficiente para producir cambios en los URA (Scheiner *et al.*, 2002), como hemos mencionado anteriormente, los aumentos del nivel de OA en el cerebro se dieron luego de alimentar a las abejas con soluciones de OA durante varios días (Barron *et al.*, 2007). Con las hormigas por ejemplo, probablemente debido a que su tasa metabólica es mucho menor que la de las abejas (Blatt y Roces, 2001; Schilman y Roces, 2008), es necesario dejar pasar cerca de 3 horas para ver cambios en el comportamiento luego de la ingestión de soluciones con aminos biogénicas (Lic. Agustina Falibene, resultados no publicados).

Si bien nuestros resultados no son concluyentes respecto al efecto de la OA como facilitadora del aprendizaje asociativo en las abejas *M. scutellaris*, la disminución de su URA y la facilitación de la memoria de corto término observada en la retención de lo aprendido en el condicionamiento, sugieren dicho efecto.

**PARTE II: Interacciones sociales en el contexto de recolección de recursos y reclutamiento en abejas nativas**

## **CAPITULO IV: Transferencia de información olfativa en la abeja** ***Melipona quadrifasciata***

En el proceso de aprendizaje, la habilidad de evocar información en un contexto diferente a aquel en el que fue adquirida es un atributo clave de la plasticidad del comportamiento animal (Rescorla *et al.*, 1985). Esta transferencia de información permite optimizar el uso de las memorias almacenadas haciéndolas menos dependientes del contexto en el que fueron adquiridas y utilizar la información aprendida en cualquier momento y lugar que fuera necesario. En el contexto de la recolección de recursos, la habilidad de transferir asociaciones relacionadas con el alimento resulta esencial para mejorar la eficiencia en un ambiente en constante cambio (Balsam, 1985).

En este marco, los insectos sociales han resultado modelos sumamente útiles, ya que es posible analizar su comportamiento en diferentes contextos controlados experimentalmente. Existen muchos ejemplos que demuestran que las experiencias olfativas adquiridas en un contexto social pueden afectar comportamientos individuales posteriores y viceversa (abejas melíferas: von Frisch, 1967; Wenner *et al.*, 1969; Gerber *et al.*, 1996; Sandoz *et al.*, 2000; Chaffiol *et al.*, 2005; abejorros: Dornhaus y Chittka, 1999; hormigas: Roces, 1990; avispas: Jandt y Jeanne, 2005). Para poder hacer uso de los olores de la comida encontrados previamente durante la búsqueda de alimento, los individuos deben en este contexto evocar la información olfativa adquirida dentro de la colonia. Para las abejas las interacciones sociales entre compañeras dentro del nido son un aspecto clave en la adquisición de la información asociada al alimento. Este tipo de aprendizaje que está influenciado por un conspecífico ha sido definido como **aprendizaje social** (Heyes, 1994), y ha sido descrito en varias especies de insectos (para un resumen ver Leadbeater y Chittka, 2007). La información social puede ser transmitida de forma inadvertida, en cuyo caso se habla de claves, o basada en comportamientos específicamente moldeados por selección natural para transmitir información, en cuyo caso hablamos de señales (Dancin *et al.*, 2004). Las abejas puntualmente son capaces de establecer una amplia gama de asociaciones, simples y complejas, (Menzel, 1999; Giurfa, 2003) y además, muestran una gran habilidad para aprender de conspecíficos (Leadbeater y Chittka, 2007).

En las abejas melíferas varios aspectos relacionados con el aprendizaje social han sido estudiados utilizando protocolos de condicionamiento clásico con el paradigma REP (Farina *et al.*, 2005; Gil y De Marco, 2005; Grüter *et al.*, 2006). Este protocolo permite un gran control

sobre los parámetros del aprendizaje. Como hemos demostrado en la primera parte de esta tesis es posible utilizar este protocolo con las abejas sin aguijón. Esto nos permite utilizarlo para evaluar si las abejas de la especie *Melipona quadrifasciata* son capaces de transferir asociaciones entre diferentes contextos. Particularmente nos interesó evaluar la posibilidad de la transferencia de información desde el contexto social al individual.

Debido al amplio espectro de comportamientos de recolección y reclutamiento que presentan las abejas sin aguijón, el uso que pueden hacer de la información olfativa también es variable. En general la estrategia de reclutamiento más comúnmente utilizada pareciera ser la de alerta de las compañeras dentro del nido por movimientos agitados y producción de sonidos (Lindauer y Kerr, 1958; Hrncir *et al.*, 2006b). Este tipo de estrategias o bien no presentan ningún tipo de información sobre la ubicación de la fuente de alimento (ej. *Trigona iridipennis* Lindauer 1956), o pareciera que solo contienen información sobre la dirección en que se encuentra el alimento pero no lo distancia al mismo (ej. *Melipona scutellaris* y *M. quadrifasciata* Jarau *et al.*, 2000; *Plebeia tica* Aguilar *et al.*, 2005). En este marco las abejas alertadas salen de la colonia volando en busca del olor que la abeja reclutadora ha transportado a la colmena y aterrizan en cualquier fuente de alimento en su camino que comparta ese mismo olor (Jarau *et al.*, 2000). Estos estudios comportamentales sin embargo no han analizado a nivel individual la información del olor floral que las abejas reclutadas llevan consigo en el momento de la búsqueda de la fuente alimenticia informada, ni el efecto a nivel individual de las propias experiencias previas con alimento aromatizado.

Nuestro objetivo ha sido evaluar si las abejas de la especie *Melipona quadrifasciata* son capaces de transferir información olfativa entre diferentes contextos y analizar si las experiencias previas con alimento aromatizado en la colmena pueden afectar el desempeño durante un condicionamiento de tipo olfativo. Puntualmente analizamos la influencia de una pre-estimulación con alimento aromatizado (1) introducido artificialmente dentro la colmena y (2) cuando el alimento aromatizado era introducido por compañeras de la colonia. También evaluamos la influencia del olor del alimento consumido 24 horas antes de llevar a cabo el ensayo de aprendizaje.



## **Materiales y Métodos**

Los experimentos fueron realizados en el campus de la Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, entre Agosto y Diciembre del año 2005 y entre Julio y Noviembre del 2006. Trabajamos con cuatro colonias de abejas de la especie *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Estas colmenas ya se habían establecido en el meliponario por lo menos un año antes de comenzar con los experimentos. Cada colonia contaba con una reina, cría y reservas de alimento.

### **Series Experimentales**

#### ***Serie Experimental I: ofrecimiento de alimento aromatizado dentro de la colmena***

Nuestro primer objetivo fue estudiar la influencia de las experiencias olfativas previas en el desempeño de las abejas *M. quadrifasciata* en el condicionamiento diferencial utilizando el paradigma REP. En tres colmenas colocamos unos pequeños recipientes plásticos (20ml aproximadamente) llenos con solución azucarada 50% p/p. Los recipientes eran recargados cada 2 días para asegurar un constante suministro de solución azucarada. En una de las colonias colocamos solución sin aromatizar (colmena CONTROL), en una segunda colonia colocamos solución aromatizada con Linalol (LIO) en una concentración de 50µl por litro de solución azucarada (colmena LIO) y en la tercera la solución estaba aromatizada con fenilacetaldéhidó (FEN) en la misma concentración (colmena FEN). La concentración de olor puro utilizada es la mínima capaz de evocar una respuesta comportamental en las abejas melíferas (Gil y De Marco 2005). El alimento fue colocado en las colmenas 2 días antes de comenzar con el experimento para permitir que la mayoría de las abejas pudieran entrar en contacto con el olor ya fuera por ingestión directa de la solución o por su distribución entre compañeras por trofalaxia. Cada día capturábamos un pequeño grupo de individuos de cada una de las colmenas a la salida de las mismas utilizando tubos de ensayo de plástico. En estos tubos colocábamos a las abejas durante 40 minutos en una incubadora (28°C, 60% humedad relativa y en oscuridad). Acto seguido encepamos a los individuos del mismo modo ya descrito en la sección de materiales y métodos generales. Una vez que las abejas recuperaban la movilidad de la cabeza y las piezas bucales se las alimentaba con solución azucarada 50% . Para ello contactábamos sus antenas con un palillo embebido en la solución azucarada y cuando extendían la probóscide les permitíamos libar por aproximadamente 2 segundos. A continuación volvíamos a colocar a los individuos en la incubadora por lo menos por 2 horas más, hasta que presentaran la REP. Las abejas encepadas de cada colonia fueron

separadas en dos grupos y sometidas a un protocolo estándar de condicionamiento diferencial en el paradigma REP: un grupo recibió LIO como el EC+ y FEN como EC- (LIO+) y el otro grupo a la inversa (FEN+). La toma de datos de esta serie duro aproximadamente 20 días.

### ***Serie Experimental II: transferencia de alimento aromatizado durante el reclutamiento***

En la serie experimental I las abejas entraban en contacto con uno de los olores utilizados posteriormente en el condicionamiento diferencial por medio de un alimentador ubicado dentro de la colmena. A continuación quisimos evaluar el efecto del contacto con alimento aromatizado en el marco del reclutamiento, es decir mediante las interacciones sociales que ocurren dentro de la colmena cuando un individuo retorna a la colmena luego de encontrar una fuente productiva. Para ello entrenamos 3-4 abejas a recolectar solución azucarada 50% p/p sin aromatizar de un alimentador ad-libitum situado a unos 20 m de distancia de las colmenas. Estas abejas recolectoras eran marcadas con un punto de pintura acrílica en el tórax (Figura 4.1). Una vez que las recolectoras estaban volando regularmente entre la colmena y el alimentador reemplazamos el alimentador de entrenamiento por otro conteniendo diferentes tipos de solución azucarada. Establecimos tres grupos experimentales: en un caso colocamos solución azucarada 50% p/p sin aromatizar y en otros dos casos colocamos solución azucarada aromatizada con alguno de los olores puros florales, LIO o FEN (ambos en concentraciones 50 µl por litro de solución azucarada). Las abejas reclutadas, es decir aquellas que llegaban al alimentador que no tenían la marca de color en el tórax, eran capturadas con tubos plásticos en el instante en que aterrizaban en el alimentador, antes de que tuvieran ningún contacto con a solución azucarada. Si alguna abeja llegaba ingerir de esa solución era descartada de análisis. De este modo nos asegurábamos que cualquier contacto que pudieran haber tenido las abejas reclutadas con el olor debía haber ocurrido dentro de la colmena y por interacción con las compañeras que estaban efectivamente recolectando alimento. Si bien no realizamos observaciones directas dentro de la colmena, la interacción más plausible entre ellas eran los contactos trofalácticos con la recolectora activa (Hrncir *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2005, 2007; Gil y De Marco, 2005). La captura de las abejas reclutadas duraba 45 minutos. Estos individuos contenidos en los tubos de captura eran colocados en la incubadora durante 15 minutos. A continuación eran encepadas y colocadas nuevamente en la incubadora por lo menos por 90 minutos, hasta que mostraran una clara REP al contactar sus antenas con solución azucarada. Las abejas que habían sido reclutadas a la solución sin aromatizar fueron divididas en dos grupos y sometidas a un condicionamiento diferencial REP: un grupo con LIO+ y el otro con FEN+. Las abejas reclutadas a la solución aromatizada con LIO fueron sometidas a un

condicionamiento diferencial LIO+, mientras que las reclutadas a la solución aromatizada con FEN a un condicionamiento FEN+. Para llegar a un número suficiente de abejas en cada grupo experimental repetimos el experimento con cada una de las situaciones (sin olor, LIO y FEN) durante 4-5 días. Para evitar que los individuos fueran evaluados más de una vez al final del condicionamiento marcábamos a las abejas con pintura acrílica en el tórax y evitábamos volver a utilizarlas en los experimentos subsiguientes.



Figura 4.1: Abejas *Melipona quadrifasciata* ingiriendo solución azucarada de un alimentador *ad libitum*. Las marcas de pintura acrílica en el tórax nos permitían identificarlas como recolectoras y diferenciarlas de aquellas abejas que llegaban al alimentador sin estar marcadas y habían sido reclutadas a la fuente de alimento.

### ***Serie Experimental III: Condicionamiento clásico 24 horas después de recolectar solución aromatizada***

En esta serie experimental nuestro objetivo fue evaluar si las abejas *M. quadrifasciata* poseen memoria de largo término que dure por lo menos 24 horas. Para ello colocamos un alimentador *ad libitum* con solución azucarada 50% p/p sin aromatizar en el centro del meliponario y dejamos que abejas de diferentes colmenas se alimentaran libremente. Una vez que había un grupo estable de abejas que iban y volvían del alimentador a las colmenas reemplazamos el alimentador por otro alimentador similar con solución azucarada 50% p/p aromatizada. Establecimos dos grupos: en una situación la solución azucarada estaba aromatizada con LIO 50  $\mu$ l/l y otro con FEN 50  $\mu$ l/l. Todas las abejas que ingerían solución aromatizada eran marcadas con un punto de pintura acrílica en el tórax. Pretermitíamos que se alimentaran libremente de esta solución durante una hora. 24 horas después colocábamos un alimentador con solución sin aromatizar en el mismo lugar del día anterior. Todas las abejas marcadas que llegaban eran capturadas en cuanto aterrizaban en el alimentador. La captura duraba 45 minutos. Las abejas capturadas en los tubos plásticos eran colocadas en la incubadora por 15 minutos. A

continuación las encepábamos y volvíamos a ubicarlas en la incubadora por lo menos por 90 minutos. Las abejas que habían ingerido solución aromatizada con LIO el día anterior eran sometidas a un condicionamiento diferencial LIO+ y para las que habían recolectado solución aromatizada con FEN llevamos a cabo un condicionamiento diferencial FEN+.

### **Análisis estadístico**

Para comparar las proporciones de respuesta espontánea a la primera presentación de los olores realizamos una prueba de G con comparaciones múltiples teniendo en cuenta la corrección de Dunn-Sidak según el número de contrastes (Sokal y Rohlf, 1995).

El desempeño durante el condicionamiento fue analizado calculando el ID para cada individuo en cada uno de los ensayos y los comparamos por medio de una prueba de ANOVA dos factores. En cada serie analizamos las curvas de adquisición para cada uno de los olores utilizados como EC+. Uno de los factores evaluados fueron los sucesivos ensayos de condicionamiento (factor ENSAYO: 5 niveles de medidas repetidas). El segundo factor varió dependiendo de la serie experimental. En la serie I el segundo factor fue el tratamiento de la colmena (Factor TRATAMIENTO: 3 niveles: colmena CONTROL, colmena FEN y colmena LIO). Los datos de las series II y III fueron analizados de forma conjunta. En esta situación el segundo factor analizado fue la experiencia olfativa previa de los individuos, es decir, si habían sido reclutadas a una solución sin olor, reclutadas a una solución con olor o si habían ingerido solución aromatizada 24 horas antes del condicionamiento (factor EXPERIENCIA: 3 niveles: reclutadas SIN OLOR, reclutadas CON OLOR e ingesta 24hs antes). En los casos en que detectamos diferencias significativas en los factores principales llevamos a cabo comparaciones post hoc de Scheffé. En los casos en que existían diferencias significativas en el término de la interacción entre ambos factores analizamos los efectos simples utilizando el error correspondiente y posteriormente comparaciones con el control utilizando la prueba de Tukey.

En el periodo de evaluación comparamos en cada uno de los grupos la proporción de respuestas al olor que funcionó como EC+ durante el condicionamiento vs. la proporción de respuestas al EC- utilizando la Prueba exacta de Fisher (Sokal y Rohlf, 1995). Además comparamos la proporción de respuestas a cada uno de los olores utilizados como EC+ de cada una de las colmenas por medio de una prueba de G. Como los datos de la evaluación ya habían sido utilizados para el análisis con la prueba exacta de Fischer modificamos la significancia de la prueba de G a  $\alpha' = 0,025$ .

## Resultados

### ***Serie Experimental I: ofrecimiento de alimento aromatizado dentro de la colmena***

Nuestro objetivo en esta serie experimental fue evaluar si el contacto con alimento aromatizado dentro de la colmena modificaba el desempeño de las abejas *M. quadrifasciata* en una tarea de aprendizaje asociativo. Durante el condicionamiento diferencial, la primera vez que se presenta a las abejas con un olor y estas responden extendiendo la probóscide se considera como su respuesta espontánea (RE). Esta respuesta puede estar influenciada por experiencias olfativas previas (Gerber *et al.*, 1996; Farina *et al.*, 2005). Comparamos la proporción de RE a cada uno de los olores de las abejas de las tres colmenas. La RE a LIO fue mayor para las abejas de la colmena tratada con LIO que para las abejas de la colmena control (Prueba de G:  $G_h = 19$ ,  $p < 0,05$ ,  $g_l = 203$ ; comparaciones múltiples ( $\alpha' = 0,025$ ): colmena CONTROL vs. Colmena LIO:  $G_h = 15,39$ ,  $p < 0,025$ ; colmena CONTROL vs. Colmena FEN:  $G_h = 1,01$ ,  $p = 0,31$ ; Figura 4.2, panel izquierdo). Al comparar la RE a FEN observamos que las abejas de ambas colmenas estimuladas con solución aromatizada presentan mayor RE al FEN que las abejas de la colmena control (Prueba de G:  $G_h = 8,31$ ;  $p < 0,05$ ;  $g_l = 201$ ; comparaciones múltiples ( $\alpha' = 0,025$ ): colmena CONTROL vs. Colmena LIO:  $G_h = 6,87$ ;  $p < 0,025$ ; colmena CONTROL vs. Colmena FEN:  $G_h = 6,87$ ;  $p < 0,025$ ). Todas aquellas abejas que respondían espontáneamente a alguno de los olores no continuaban con el condicionamiento diferencial. Si bien la proporción de RE a los diferentes olores ya es una medida del efecto de las experiencias olfativas previas, realizamos el condicionamiento diferencial a fin de evaluar si estas experiencias olfativas podían también modificar la dinámica de adquisición durante el condicionamiento.

Para analizar la influencia del contacto con solución aromatizada dentro de la colmena analizamos la dinámica de adquisición de cada uno de los olores como EC+ de las abejas de las tres colmenas. Cuando el olor recompensado fue FEN (Figura 4.2 panel central) el análisis de varianzas reveló diferencias significativas para todas las fuentes de variación: existía un efecto de los sucesivos ensayos de condicionamiento (factor ENSAYO:  $F = 25,41$ ,  $g_l = 4$ ,  $p < 0,001$ ), un efecto de la estimulación olfativa (factor TRATAMIENTO:  $F = 7,6$ ;  $g_l = 2$ ,  $p < 0,001$ ) y una interacción de de ambos factores (INTERACCIÓN:  $F = 2,58$ ,  $p < 0,01$ ). Para desentrañar cuales eran las diferencias significativas llevamos a cabo un análisis de efectos simples con comparaciones post-hoc con la prueba de Tuckey. Este análisis reveló lo siguiente: (1) en el segundo ensayo de condicionamiento (E2) los individuos de la colmena FEN mostraron mayores niveles de discriminación que las abejas de la colmena LIO; (2) en el tercer, cuarto y quinto ensayo (E3, E4,

E5) las abejas de la colmena FEN mostraron mayores niveles de discriminación que las de la colmena CONTROL y que las de la colmena LIO. Estos resultados demuestran que cuando las abejas habían tenido contacto previo con una solución aromatizada con FEN dentro de la colmena alcanzaron al final del protocolo mayores niveles de discriminación que aquellas abejas que estuvieron en contacto con solución sin aromatizar o aromatizado con un olor diferente (LIO en este caso).

En lo que respecta los condicionamientos LIO+ (Figura 4.2, panel derecho) observamos un efecto de los sucesivos ensayos de condicionamiento (factor ENSAYO:  $F = 35,74$ ;  $gl=4$ ,  $p < 0,001$ ). Sin embargo si bien hay una tendencia de mayor discriminación de los individuos que habían tenido contacto con las soluciones aromatizadas, no observamos diferencias significativas entre los tratamientos (factor TRATAMIENTO:  $F=2,58$ ;  $gl=2$ ;  $p=0,08$ ).

Una vez terminado el condicionamiento de las abejas dejamos pasar 15 minutos y evaluamos la respuesta a la presentación no recompensada de los olores (evaluación). Observamos que en cada uno de los grupos la proporción de respuestas al olor utilizado como EC+ fue mayor que al olor no recompensado durante el condicionamiento (EC-) (Prueba exacta de Fisher: Colmena CONTROL-FEN+:  $p < 0,01$ ; Colmena CONTROL-LIO+:  $p < 0,025$ ; Colmena FEN-FEN+ :  $p < 0,01$ ; Colmena FEN-LIO+:  $p < 0,01$ ; Colmena LIO-FEN+:  $p < 0,01$ ; Colmena LIO-LIO+:  $p < 0,01$ ). Al comparar los niveles de respuesta al FEN en esta etapa entre las tres colmenas no observamos diferencias significativas entre ellas (Prueba de G ( $\alpha' = 0,025$ ):  $Gh = 4,94$ ;  $p = 0,08$ ;  $N = 100$ ; Figura 4.2, panel central, barras negras). Tampoco la proporción de respuesta al LIO mostró diferencias entre colmenas (Prueba de G ( $\alpha' = 0,025$ ):  $Gh = 5,22$ ;  $p = 0,07$ ;  $N = 103$ ; Figura 4.2, panel derecho, barras blancas). La retención de la información adquirida durante el condicionamiento parece ser independiente de los niveles alcanzados durante el protocolo de aprendizaje.

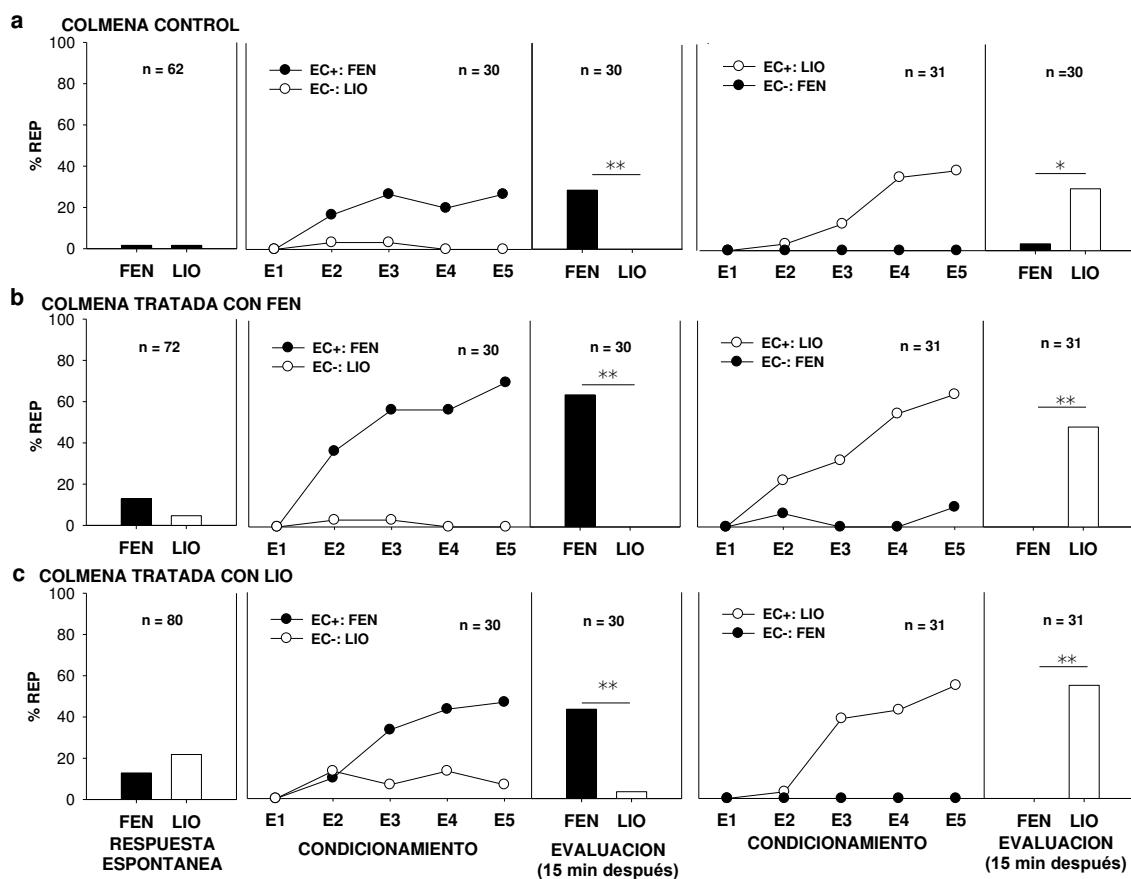


Figura 4.2: Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (%REP) durante el experimento de condicionamiento diferencial REP en la primera presentación de los olores (Respuesta Espontanea, panel izquierdo), durante los cinco ensayos de condicionamiento (Condicionamiento), y durante el periodo de evaluación 15 minutos después del condicionamiento (Evaluación): (a) COLMENA CONTROL: un alimentador en la colmena ofrecía solución azucarada sin aromatizar; (b) COLMENA TRATADA CON FEN: un alimentador en la colmena ofrecía solución azucarada aromatizada con FEN; (c) COLMENA TRATADA CON LIO: un alimentador en la colmena ofrecía solución azucarada aromatizada con LIO. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba exacta de Fisher (\*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , ver Resultados para más detalles)

### ***Serie Experimental II: transferencia de alimento aromatizado durante el reclutamiento***

Durante el reclutamiento de las abejas *M. quadrifasciata* ocurren contactos trofalácticos en los que la abeja recolectora transfiere parte del alimento a sus compañeras dentro de la colmena (Hrnecir *et al.*, 2000). Nuestro objetivo en esta serie experimental fue evaluar si las abejas que reciben alimento aromatizado durante el reclutamiento son capaces de aprender el olor del alimento recibido y evocar esa información en el paradigma de aprendizaje REP.

Entrenamos a un pequeño grupo de abejas a recolectar alimento de un alimentador artificial que ofrecía solución azucarada sin aromatizar o solución aromatizada. A medida que llegaban al alimentador las compañeras reclutadas las capturábamos y las sometíamos a un condicionamiento diferencial REP. Tanto las abejas reclutadas a una solución azucarada sin aromatizar, como aquellas reclutadas a una solución aromatizada mostraron niveles de RE muy bajos, que no nos permitieron realizar ningún análisis estadístico (figura 4.3, panel derecho).

A fin de evaluar si las experiencias con alimento aromatizado durante el reclutamiento podían modificar la dinámica de aprendizaje llevamos a cabo el condicionamiento diferencial. Comenzamos analizando el desempeño en el condicionamiento FEN+ de individuos reclutados a una solución sin aromatizar y de individuos que habían sido reclutados a una solución aromatizada con FEN (figura 4.3 a y b, panel izquierdo). En el análisis de ANOVA observamos un efecto de la interacción entre la discriminación en los sucesivos ensayos del condicionamiento y la experiencia previa de los individuos (ANOVA de dos factores. Factor ENSAYO:  $F = 51,8$ ;  $gl=4$ ,  $p<0,001$ ; factor EXPERIENCIA:  $F=9,41$ ;  $gl=2$ ,  $p< 0,001$ , INTERACCION entre ambos factores:  $F=4,93$ ,  $gl=8$ ,  $p< 0,001$ ). El análisis de la interacción por medio de pruebas de efectos simples y de las correspondientes comparaciones de Tuckey nos permitió observar que en el segundo, tercer y cuarto ensayo de condicionamiento (E2, E3 y E4), las abejas reclutadas a una solución aromatizada con FEN mostraban mayor discriminación del FEN como EC+. Sin embargo en el quinto (último) ensayo esas diferencias desaparecían. Esto indicaría que aunque las abejas reclutadas a una solución con FEN alcanzan los mismos niveles de discriminación que sus compañeras reclutadas a una solución sin aromatizar, aprenden más rápidamente a discriminar a FEN como el olor recompensado. En la situación en que las abejas eran reclutadas a una solución aromatizada con LIO, observamos que la discriminación en un condicionamiento diferencial LIO+ era mayor que el de los individuos reclutados a una solución sin aromatizar todo a lo largo del condicionamiento (ANOVA de dos factores. Factor ENSAYO:  $F = 27,5$ ;  $gl=4$ ;  $p<0,001$ ; factor EXPERIENCIA:  $F=8,69$ ;  $gl=2$ ,  $p<0,001$ ; comparación post-Hoc con la prueba de



Tuckey  $p < 0,05$ ). Estos resultados indican que el contacto con alimento aromatizado con LIO recibido de las compañeras durante el reclutamiento ayudó a las abejas a resolver la tarea de discriminación en un condicionamiento diferencial mejor que aquellas abejas que carecían de esta experiencia previa.

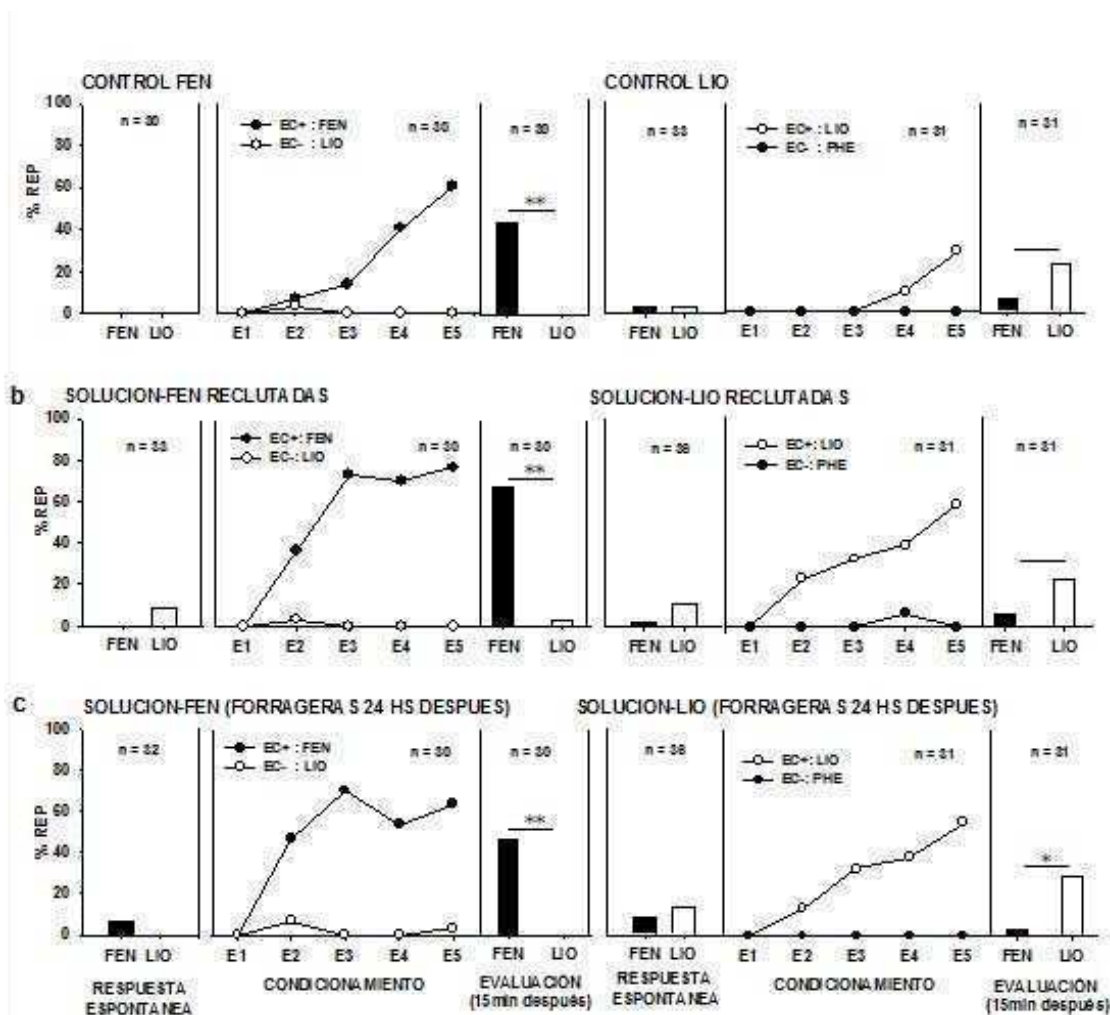


Figura 4.3: Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (%REP) durante el experimento de condicionamiento diferencial REP en la primera presentación de los olores (Respuesta Espontanea, panel izquierdo), durante los cinco ensayos de condicionamiento (Condicionamiento), y durante el periodo de evaluación 15 minutos después del condicionamiento (Evaluación): (a) CONTROL FEN Y CONTROL LIO: discriminación de abejas que habían sido reclutadas a una solución sin aromatizar. (b) SOLUCION-FEN RECLUTADAS y SOLUCION-LIO RECLUTADAS: discriminación de abejas que habían sido reclutadas a soluciones aromatizadas con FEN y LIO respectivamente (c) SOLUCION-FEN y SOLUCION-LIO (RECOLECTORAS 24 HS DESPUES): discriminación de abejas recolectoras que habían ingerido solución aromatizada con FEN y LIO respectivamente 24 horas antes de llevar a cabo el condicionamiento diferencial. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba exacta de Fisher (\*  $p < 0,05$ , ver Resultados para más detalles)

Durante la etapa de evaluación, en la que la presentación de los olores no estaba asociada a recompensa, los individuos que habían sido sometidos a un condicionamiento FEN+ mostraron mayor proporción de respuestas al olor que había sido recompensado durante el condicionamiento pero no fue el caso de los individuos que tuvieron un condicionamiento LIO+ (Prueba exacta de Fischer: Control FEN:  $p < 0,01$ ; Control LIO:  $p < 0,05$ ; solución-FEN reclutadas:  $p < 0,01$ ; solución-LIO reclutadas:  $P < 0,01$ ). Al comparar la proporción de respuestas en la evaluación entre los grupos pre-estimulados con sus respectivos grupos control no encontramos diferencias significativas (Prueba de G ( $\alpha' = 0,025$ ): Control FEN vs. Solución-FEN reclutadas:  $G_h = 3,33$ ;  $p = 0,07$ ,  $N = 60$ ; Control LIO vs. Solución-LIO reclutadas:  $G_h = 0,01$ ;  $p = 0,93$ ;  $N = 80$ ).

### ***Serie Experimental III: Condicionamiento clásico 24 horas después de recolectar solución aromatizada***

Con el objetivo de analizar si la asociación entre el olor y la recompensa genera memoria de largo término analizamos el desempeño de abejas que habían sido alimentadas con solución azucarada aromatizada 24hs antes del condicionamiento. Al presentar los olores en el condicionamiento por primera vez, aquel que habían ingerido el día anterior y otro novedoso, la proporción de RE a ambos fue muy baja, e incluso en el caso en que habían ingerido solución aromatizada con LIO también bastante indiscriminada (la mayoría de las abejas que respondieron lo hicieron a ambos olores). Durante el condicionamiento diferencial, del mismo modo que observamos para las abejas reclutadas a una solución aromatizada, los individuos que habían ingerido solución aromatizada 24 hrs antes presentaron niveles de discriminación mayores que las abejas que no habían tenido contacto previo con el olor (Figura 4.3, paneles a y c). En el condicionamiento FEN+, las abejas que habían recolectado solución aromatizada con FEN 24 horas antes mostraron mayores índices de discriminación en el segundo y tercer ensayos del condicionamiento (E2 y E3) que las abejas del grupo control (ANOVA de dos factores. Factor ENSAYO:  $F = 51,8$ ;  $gl = 4$ ,  $p < 0,001$ ; factor EXPERIENCIA:  $F = 9,41$ ;  $gl = 2$ ,  $p < 0,001$ , INTERACCION entre ambos factores:  $F = 4,93$ ,  $gl = 8$ ,  $p < 0,001$ . Análisis de la interacción por medio de pruebas de efectos simples y las correspondientes comparaciones con el control con la prueba de Tuckey). En el caso en que LIO era el EC+ las abejas que habían recolectado solución aromatizada con LIO presentaron mayores niveles de discriminación que aquellos individuos que carecían del contacto previo con el LIO (ANOVA de dos factores. Factor ENSAYO:  $F = 27,5$ ;  $gl = 4$ ;  $p < 0,001$ ; factor EXPERIENCIA:  $F = 8,69$ ;  $gl = 2$ ,  $p < 0,001$ ; comparación post-Hoc con la prueba de Tuckey).

## **Discusión**

El objetivo de este trabajo fue analizar si las abejas *M. quadrifasciata* son capaces de transferir información entre diferentes contextos comportamentales y específicamente si las experiencias olfativas percibidas dentro de la colmena pueden influenciar el aprendizaje asociativo posterior en el contexto (pavloviano) clásico. A pesar de las diferencias entre los olores, pareciera que la habilidad de discriminar entre olores en un contexto de condicionamiento REP mejora como consecuencia del contacto previo con uno de esos olores en el contexto natural (dentro de la colmena o durante la recolección en el campo 24hs antes). Este efecto del contacto con el olor dentro de la colmena fue visto tanto en la situación con un alimentador dentro de la colmena como cuando las abejas eran activadas por las recolectoras que volvían de una fuente de alimento aromatizada. Este último resultado, en el cual el contacto con la solución aromatizada fue mediado por una compañera, demuestra que las abejas *M. quadrifasciata* son capaces de aprendizaje social, como ya fue descrito para las abejas melíferas (Farina *et al.*, 2005). También detectamos una mejora en la discriminación en las abejas recolectoras que habían ingerido solución azucarada aromatizada 24 horas antes del condicionamiento, lo que indicaría la formación de una memoria estable de largo término de los olores florales en estas abejas sin aguijón.

#### *Efecto del contacto con alimento aromatizado en la colmena*

En nuestro trabajo registramos proporciones de RE muy bajas para las abejas *M. quadrifasciata*, probablemente debido a las limitaciones del protocolo REP para el trabajo con estas abejas. Este hecho trajo como consecuencia que no pudiéramos utilizar esa respuestas como un indicador de las experiencias olfativas previas, como se ha hecho con las abejas melíferas (Farina *et al.*, 2005, 2007; Grüter *et al.*, 2006; Arenas y Farina, 2008). Un modo de profundizar el estudio del efecto de las experiencias previas es desarrollar un protocolo de condicionamiento y evaluar la dinámica de adquisición durante el mismo (Chandra *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2009). En ese sentido el condicionamiento diferencial resulta provechoso ya que al forzar al individuo a discriminar entre los olores y explícitamente no responder al olor no recompensado constituye un control intra-individuo.

En nuestros experimentos observamos que al colocar alimento aromatizado dentro de la colmena se produjo una mejora en el desempeño durante el protocolo de aprendizaje. Este tipo de aumentos podría deberse a procesos no asociativos como la sensibilización o por priming sensorial. Sin embargo, además de contar con el condicionamiento diferencial que permite descartar este tipo de procesos, los aumentos en la discriminación como efecto de los estímulos

olfativos previos fueron específicos para el olor expuesto. Especialmente en el caso de las abejas de la colmena FEN, observamos un claro aumento de su discriminación del FEN como EC+, pero no del LIO como EC+. Este tipo de especificidad nos permite plantear la hipótesis de que el efecto de la estimulación con alimento aromatizado permitió el establecimiento de un aprendizaje asociativo específico con ese olor.

En la situación de la pre-estimulación con LIO, si bien observamos una tendencia a mayores niveles de discriminación de las abejas de la colmena LIO, estas diferencias no resultaron significativas. Existen descripciones de asimetrías en la facilidad con que las abejas aprenden los diferentes olores florales durante un condicionamiento olfativo (Sandoz *et al.*, 2001; Laloi y Pham-Delegue, 2004). En abejorros se ha visto que el LIO resulta más fácil de aprender a asociar con una recompensa que el FEN (Laloi *et al.*, 1999). En capítulos previos también observamos este tipo de asimetrías con las abejas *Tetragonisca angustula*, quienes también mostraban una mayor facilidad para asociar el LIO que el FEN. En ese marco es posible que aunque los niveles de discriminación de las abejas *M. quadrifasciata* fueran bajos comparados con el desempeño que pueden presentar las abejas melíferas en este protocolo, el aprendizaje de LIO ya estuviera en el máximo nivel posible de alcanzar por estas abejas aun sin estimulación. En esa situación no sería posible evidenciar efectos del contacto previo con LIO ya que no sería posible obtener mayores niveles de discriminación de esta especie de abejas en este protocolo.

#### *Influencia del olor del alimento en las estrategias de recolección*

Las abejas sin aguijón despliegan estrategias de recolección y reclutamiento que incluyen diferentes tipos de interacciones dentro de la colmena, como por ejemplo la trofalaxia (Hrncir *et al.*, 2000) o la producción de señales vibratorias (Aguilar y Briceño, 2002; Hrncir *et al.*, 2006b, Jarau *et al.*, 2000; Nieh, 2004). Estas interacciones sociales podrían ser rasgos relevantes durante la recolección colectiva de recursos, permitiendo la transferencia de claves relacionadas con el recurso de forma inadvertida, es decir como un subproducto de las acciones de los individuos (Danchin *et al.*, 2004; Dall *et al.*, 2005). Particularmente las abejas *M. quadrifasciata* no parecieran proveer información precisa sobre la ubicación de la fuente de alimento, por lo menos durante los primeros 90 minutos del reclutamiento (Jarau *et al.*, 2000). Su sistema de reclutamiento parece estar basado principalmente en corridas agitadas dentro del nido, simplemente alertando a sus compañeras mientras distribuyen muestras del alimento recolectado. Los individuos reclutados dejan la colmena para desplegar una búsqueda aleatoria por la zona. En este panorama, el olor del alimento podría ser especialmente importante,

particularmente porque se han descartado que estas abejas utilicen marcas de feromonas a lo largo del camino, o vuelos guiados, o claves mecánicas sensoriales con información precisa sobre la ubicación de la fuente (Hrncir *et al.*, 2000).

#### *Transferencia de información olfativa*

Se ha demostrado para las abejas melíferas que los contactos trofalácticos les permiten a las abejas receptoras del alimento aprender la asociación entre el olor y la recompensa azucarada (Gil y De Marco, 2005; Grüter *et al.*, 2006; Farina *et al.*, 2007). También es conocida por estas abejas la habilidad de transferir las asociaciones adquiridas entre diferentes contextos: del ambiente natural (durante la recolección o dentro de la colmena) y en entorno artificial como es el paradigma de aprendizaje REP (Gerber *et al.*, 1996; Farina *et al.*, 2005, 2007; Grüter *et al.*, 2006). Aunque no podamos asegurar que ocurrieron contactos trofalácticos durante el reclutamiento porque no hicimos observaciones dentro de la colmena, resulta claro que los individuos que fueron reclutados utilizando una solución aromatizada mostraron mejores desempeños en el condicionamiento (bien con mayores niveles finales de discriminación o aprendiendo la discriminación más rápido). Este hecho nos da la pauta de que existió transferencia de información olfativa durante la circulación del alimento aromatizado y que las abejas *M. quadrifasciata* son capaces de evocar luego esa información en el paradigma REP. El uso que pudieran hacer durante la recolección de recursos de esa información, es decir si pueden sesgar sus elecciones alimenticias como fue visto en las abejas melíferas (von Frisch, 1967; Wenner *et al.*, 1969; Arenas *et al.*, 2007) o en los abejorros (Dornhaus y Chittka, 1999), aun debe ser estudiado. Experimentos de elección entre alimentadores podrían ayudar a resolver esa pregunta.

La adquisición de información dentro de la colmena resulta crucial para las respuestas coordinadas de los individuos a nivel de la colonia (Seeley, 1995), permitiendo un mejor ajuste a las ofertas de alimento del entorno en un momento particular. Para las abejas melíferas se ha demostrado que la información olfativa asociada al alimento puede rápidamente distribuirse entre los individuos en el interior de la colmena (Grüter *et al.*, 2006), y afectar a las recolectoras en su búsqueda de alimento (Grüter *et al.*, 2008) y cuando las abejas sobrevuelan cerca de la fuente de alimento (von Frisch, 1967; Wenner *et al.*, 1969; Arenas *et al.*, 2007). La evidencia de este trabajo demuestra que las abejas *M. quadrifasciata* pueden establecer asociaciones con el olor del alimento, bien por circulación del mismo en la colmena o por transferencia por sus compañeras, junto con el hecho de que esas asociaciones pueden durar por lo menos 24 horas,

nos pueden ayudar a comenzar a dilucidar la importancia del olor floral en las estrategias de recolección de estas abejas.

## Capítulo V: Las vibraciones recibidas durante la trofalaxia modulan la formación del vínculo olor-recompensa

Los contactos trofalácticos no sólo cumplen la función de transferir alimento, sino que también permiten a los individuos adquirir información de varias modalidades sensoriales simultáneamente. Al aceptar alimento de sus compañeras, los individuos receptores pueden adquirir claves quimiosensoriales de dicho alimento y esto genera modificaciones en su comportamiento subsiguiente. Por ejemplo en las abejas melíferas los individuos que reciben solución azucarada modifican sus umbrales de respuesta al azúcar dependiendo de la concentración de azúcar de la solución transferida (Martínez y Farina, 2008). También existe evidencia de que los contactos trofalácticos permiten tanto a las abejas como a las hormigas aprender el olor del alimento transferido gracias a la contingencia entre olor y recompensa (Gil y De marco, 2005; Farina *et al.*, 2007; Goyret y Farina, 2005; Farina *et al.*, 2005; Provecho y Josens, 2009). Además de las claves quimiosensoriales, durante la trofalaxia existen claves mecánicas como por ejemplo los contactos antenales y de las patas anteriores que correlacionan con diferentes parámetros de la productividad de la fuente de alimento (Abejas melíferas: Goyret y Farina, 2003; Hormigas carpinteras: Mc Cabe *et al.*, 2006). Otro tipo de claves que han sido descritas durante la trofalaxia tanto en abejas melíferas como en las abejas sin aguijón es la producción de vibraciones (Hrncir *et al.*, 2006a, 2006b). Si bien las vibraciones son un tipo de clave presente en varios contextos dentro de la colmena de las abejas melíferas (Schneider y Lewis, 2004), puntualmente se ha descrito que las abejas que perciben vibraciones aumentan la tasa de contactos trofalácticos así como la duración de esas interacciones (Cao *et al.*, 2007).

En las abejas sin aguijón del género *Melipona* las vibraciones ocurren casi exclusivamente durante los contactos trofalácticos (Lindauer y Kerr, 1958; Esch, 1967a; Hrncir *et al.*, 2004a, 2004b, 2006b) (Figura 5.1b). Las vibraciones se producen por movimiento de las alas y los músculos torácicos (Michelsen, 2003) y se transmiten tanto por el sustrato (Esch, 1965; Hrncir *et al.*, 2006a) como por aire (sonidos) (Lindauer y Kerr, 1958; Esch, 1965; Hrncir *et al.*, 2000, 2008a) (Figura 5.1a). En cuanto al valor funcional de estas vibraciones existen autores que describen correlaciones entre diferentes parámetros de las vibraciones con la ubicación de la fuente de alimento (distancia al nido: Esch *et al.*, 1965; Nieh y Roubik, 1998; altura sobre el nivel del suelo: Nieh y Roubik, 1998), mientras que otros cuestionan la transmisión de información simbólica a través de la estructura de la señal vibratoria (Hrncir *et al.*, 2000, 2004<sup>a</sup>, 2008b). En lo que si

pareciera haber consenso es en que la producción de vibraciones correlaciona con la concentración de la solución azucarada que está siendo recolectada (Aguilar y Briceño, 2002; Hrnir *et al.*, 2004b; Nieh *et al.*, 2003). Las respuestas comportamentales de los individuos que reciben la señal vibratoria son un aumento del número de individuos que salen de la colmena y un mayor número de individuos que llegan a la fuente de alimento (Lindauer y Kerr, 1958; Esch, 1965; Nieh y Roubick, 1995; Jarau *et al.*, 2000; Nieh *et al.*, 2003). Las vibraciones producidas dentro de la colmena entonces parecieran estar “alertando” a las compañeras, lo que genera un mayor nivel de actividad y un incremento en el número de individuos que salen del nido. En este sentido las señales vibratorias en las abejas sin aguijón parecieran ser más modulatorias que contener información específica (Schneider y Lewis, 2004).

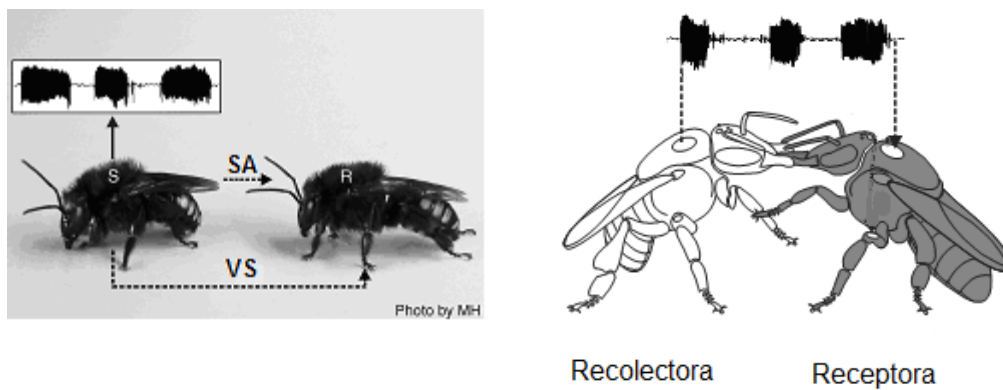


Figura 5.1: Transmisión de las vibraciones emitidas por una abeja recolectora al volver de un viaje de recolección exitoso. (a) Las vibraciones producidas por el movimiento de las alas y los músculos torácicos se transmiten a las compañeras por el sustrato (VS) o como sonidos por el aire (SA). (b) En las abejas del género *Melipona* la abeja receptora suele recibir las vibraciones durante la transferencia de alimento en la trofalaxia. (Figura (a) adaptada de Hrnir *et al.*, 2006b, (b) de Hrnir *et al.*, 2006a)



### *Hipótesis de trabajo*

En el capítulo anterior hemos visto que las abejas *M. quadrifasciata* aprenden el olor del alimento durante el reclutamiento a una fuente de alimento aromatizada y pueden posteriormente evocarlo en el paradigma REP. El proceso de reclutamiento en esta especie incluye contactos trofalácticos (Hrncir *et al.*, 2000) y, como mencionamos anteriormente, es en esa interacción cuando ocurren las vibraciones producidas por la dadora de alimento (Hrncir *et al.*, 2006b) que están positivamente correlacionadas por la productividad de la fuente de alimento que previamente ha explotado (Hrncir *et al.*, 2004b). De este modo, un individuo que permaneció dentro de la colmena (receptor) recibe de su compañera que vuelve de un viaje de recolección (dadora) tanto alimento, con sus correspondientes claves quimiosensoriales, como vibraciones. A partir de ello es que el objetivo de este capítulo fue evaluar si el aprendizaje olfativo del individuo receptor; es decir, el establecimiento de la contingencia olor-recompensa, podría ser modulado por las vibraciones recibidas de la dadora. Nuestra hipótesis es que cuando una fuente de alimento tiene una alta productividad, la dadora produce mayor cantidad de vibraciones que cuando su productividad es reducida. La abeja que recibe esta señal entonces podría aumentar su sensibilidad y/o probabilidad de respuesta a diferentes estímulos sensoriales, y como consecuencia mejorar el aprendizaje del olor del alimento transferido.

De existir estos cambios en la sensibilidad o en la fuerza del aprendizaje esperaríamos luego poder evidenciarlos en el paradigma REP. La sensibilidad al azúcar de las abejas está positivamente correlacionada a una disposición general del sujeto a responder a estímulos de diferentes modalidades sensoriales (Scheiner, 2004; Erber *et al.*, 2006). Esta propensión a responder estaría asociada a un estado de activación general (arousal) que le permitiría adquirir mayor cantidad de información favoreciendo el establecimiento de asociaciones específicas relacionadas al alimento (refuerzo) (Hammer y Menzel, 1995; Menzel, 1999). Al recibir mayor cantidad de vibraciones durante la trofalaxia se podrían generar cambios en el estado de activación de las abejas que sería percibido como una mayor sensibilidad al azúcar en el paradigma URA. A su vez si las vibraciones favorecieran el establecimiento del vínculo entre el olor y la recompensa durante la trofalaxia podríamos detectar cambios en el desempeño del sujeto durante el condicionamiento diferencial, como ya hemos visto en capítulos anteriores.

## Materiales y Métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en el campus de la Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, en el mes de Mayo de 2009. Trabajamos con una colmena de abejas de la especie *Melipona quadrifasciata* que fue mantenida en una caja de madera dentro del laboratorio, pero conectada por medio de un tubo plástico con el exterior para permitirles a las abejas recolectar alimento libremente. Entre el nido y el tubo de entrada/salida colocamos una arena de observación conformada por una caja plástica (10 x 5x 4 cm) cubierta con un vidrio que permitía observar los movimientos de entrada y salida de las abejas y sus interacciones con las compañeras de la colonia (Jarau *et al.*, 2000; Hrncir *et al.*, 2000) (Figura 5.2). Las abejas recolectoras al entrar luego de un viaje de recolección en el exterior solían establecer contactos trofalácticos con las compañeras en esta arena antes de su ingreso a la colmena (Hrncir *et al.*, 2000; Nieh, 1998).

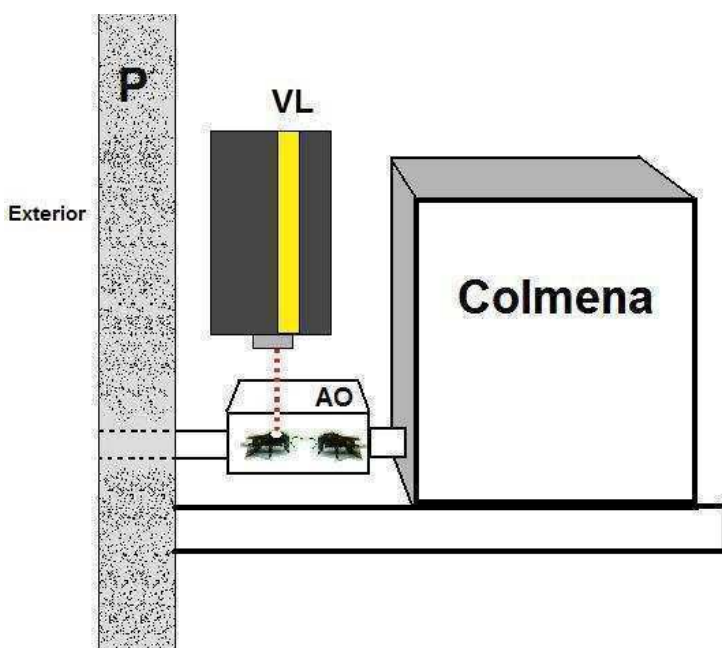


Figura 5.2: Esquema del dispositivo experimental. Cuando una abeja retornaba de un viaje de recolección para poder llegar a la colmena debía atravesar la pared (P) por medio de un tubo plástico inserto en la misma y luego llegaba a una arena de observación (AO). En esta arena solían ocurrir contactos trofalácticos durante los cuales registrábamos las vibraciones emitidas por la abeja recolectora por medio de un vibrómetro láser (VL). La abeja receptora era luego capturada antes de que pudiera entrar de nuevo en la colmena para continuar con el protocolo experimental.

### Entrenamiento

El foco de nuestro estudio estuvo sobre el individuo receptor de alimento durante la trofalaxia, es decir aquel que en el interior de la colmena recibe la solución azucarada recolectada por su

compañera (dadora) en el exterior. El objetivo fue investigar si la cantidad de vibraciones recibidas durante la trofalaxia modificaba la sensibilidad gustativa o el aprendizaje olfativo en las abejas *M. quadrifasciata*. Para ello fue necesario analizar individuos que recibieran durante los contactos trofalácticos diferentes cantidades de vibraciones. Si bien estas abejas modulan la producción de vibraciones dependiendo de la concentración de azúcar de la solución recolectada (Hrnir *et al.*, 2004b) existe mucha variación en los diferentes parámetros de la vibración producida con cada una de las concentraciones de solución azucarada (Hrnir *et al.*, 2004b). En un intento de tener contactos trofalácticos sin vibraciones y otros con vibraciones elegimos trabajar con una solución azucarada 20% p/p. Esta concentración fue elegida ya que en experiencias preliminares observamos que las abejas que recolectaban dicha solución presentaban una gran variabilidad en la cantidad de vibraciones proveyendo un amplio intervalo de respuestas: algunas abejas no emitían vibraciones y otras pasaban casi el 60% de la trofalaxia vibrando.

Cada día de experimento comenzaba cuando entrenábamos a las primeras abejas (entre 1 y 3) a recolectar solución azucarada 20% p/p de un alimentador ad-libitum ubicado a 5 metros de la entrada de la colmena. El alimentador consistía de un recipiente de vidrio (30ml aprox) invertido sobre una placa de acrílico hexagonal (77mm de diámetro) con seis canaletas radiales que permitía a las abejas ingerir la solución azucarada libremente. Estas abejas recolectoras fueron marcadas con pintura acrílica blanca en el tórax. Esto se hizo para poder identificarlas cuando volvieran a la colonia y establecieran contactos trofalácticos y además facilitaba la medición de las vibraciones por medio de un vibrómetro laser (ver próxima sección).

En vistas de que nuestro objetivo era evaluar el efecto de las vibraciones en el establecimiento de la contingencia olor-recompensa durante la trofalaxia buscamos que existieran contactos trofalácticos en las cuales las abejas dadoras transfirieran solución sin aromatizar como control y otras en las que la solución transferida estuviera aromatizada. Para ello establecimos dos grupos experimentales: (1) las abejas del grupo Sin Olor recolectaron solución azucarada 20% sin aromatizar durante todo el período experimental; (2) para el grupo tratado Con Olor una vez que ya estaban las abejas recolectoras de ese día volando entre el alimentador y la colmena se les reemplazó el alimentador por otro muy similar pero que contenía solución azucarada 20% p/p aromatizada con Fenilacetaldehído (FEN) en una concentración de 50 µl por litro de solución azucarada.

De este modo los contactos trofalácticos que se establecían en la colmena podían implicar la transferencia de solución aromatizada o no, y además dentro de cada grupo había individuos que recibían diferentes cantidades de vibraciones.

### **Comunicación: Vibraciones durante la Trofalaxia**

Cuando una abeja recolectora entraba a la colmena debía obligatoriamente pasar por la arena de observación. En este lugar la mayoría de las veces establecía contactos trofalácticos con sus compañeras (Hrncir *et al.*, 2000; Nieh, 1998). Durante estos contactos medimos las vibraciones emitidas por la abeja dadora de néctar durante dicha interacción. Basándonos en el trabajo de Hrncir *et al.* (2006a), asumimos que esas vibraciones medidas sobre la dadora son las que está recibiendo la abeja receptora de néctar. De este modo conocemos la concentración de azúcar, si existe olor o no en el néctar transferido y además las vibraciones que las abejas recibían durante la trofalaxia. Las vibraciones fueron medidas utilizando un vibrómetro Doppler portátil (PDV-100, Polytec, Waldbronn, Germany). Dicho aparato emitía un haz láser que ubicábamos sobre el punto de acrílico blanco en el tórax de la abeja dadora (Figura 5.2, Figura 5.3). La salida del vibrómetro era conectada a una computadora por medio de una placa de sonido stereo de 24 bits (PSC 805, Philips, Amsterdam, The Netherlands) y del programa Soundforge 7.0 (Sony Pictures Digital Inc., Madison, WI, USA) con una tasa de muestreo de 44.1 kHz. El análisis de las vibraciones grabadas lo realizamos con el programa SpectraPro 3.32 (Sound Technology Inc., Campbell, CA, USA).

#### *Parámetros de las vibraciones*

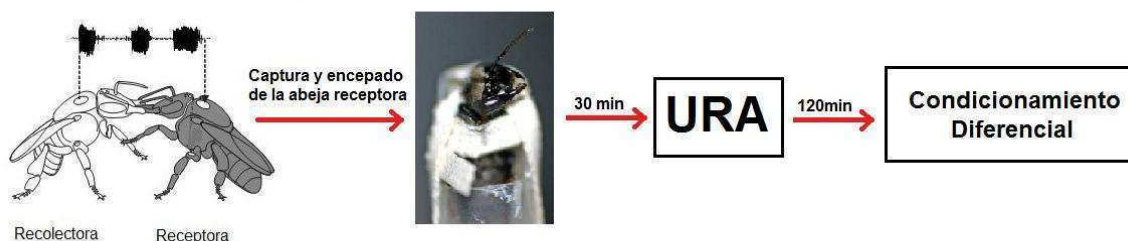
A fin de cuantificar las vibraciones recibidas durante la trofalaxia definimos para cada uno de los contactos trofalácticos los siguientes parámetros: (a) Duración del pulso (DP), calculada como la mediana de todos los pulsos recibidos durante el contacto trofaláctico; (b) Frecuencia de Pulsos (FP), calculada como el número total de pulsos recibidos durante la trofalaxia dividido por la duración total del contacto; (c) Porcentaje de Vibración (PV) calculado como la suma de la duración de todos los pulsos de un contacto dividido por la duración total del mismo y multiplicado por 100: representa el porcentaje del tiempo del contacto durante el cual la abeja efectivamente recibió vibraciones.

### **Captura de los individuos**

A fin de evaluar los efectos en la sensibilidad gustativa o en el aprendizaje olfativo que pudieran haber ocurrido durante la transferencia de alimento en la trofalaxia capturamos a los individuos que habían recibido la solución azucarada y las vibraciones. Para ello tan pronto como terminaba el contacto trofaláctico removíamos la tapa de vidrio de la arena de observación y por medio de una manguera plástica y de una leve succión de aire la aislábamos y retirábamos de la arena de observación para colocarla en un tubo de ensayo. Permanecía ahí hasta llegar al número de 15 abejas capturadas (aproximadamente una hora en total) y luego era encepada (Figura 5.3).

### Sensibilidad gustativa: Umbral de respuesta al azúcar (URA)

Una vez que las abejas eran encepadas las dejábamos por media hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Acto seguido mediamos sus umbrales de respuesta al azúcar del mismo modo ya descrito (Page *et al.*, 1998; Figura 5.3). Para cada individuo calculamos su valor de puntaje URA (Pankiw y Page, 2003) como una medida del estado interno del individuo (Page y Erber, 2002) y de su sensibilidad al azúcar luego de la trofalaxia.



**Figura 5.3:** Esquema de las diferentes etapas del protocolo experimental. Durante la trofalaxia la abeja receptora recibía solución azucarada y vibraciones. Esta abeja receptora era capturada y encepada. 30 minutos más tarde se evaluaba su sensibilidad gustativa por medio del protocolo URA. Se las dejaba luego a temperatura ambiente y oscuridad por 120 minutos antes de someterla al condicionamiento diferencial olfativo y evaluar sus memorias olfativas.

### Condicionamiento diferencial olfativo

Nuestra intención era evaluar las memorias olfativas que pudieran haberse establecido durante la trofalaxia y el efecto de las vibraciones en el establecimiento de dichas memorias. Para ello pasados 120 minutos del análisis de los URA sometimos a cada abeja a un protocolo de condicionamiento diferencial en el protocolo REP. De este modo esperamos observar diferencias entre los individuos que recibieron solución sin/con olor y/o dentro de cada uno de estos grupos entre quienes recibieron diferentes cantidades de vibración. Para ambos grupos experimentales (Sin Olor y Con Olor) utilizamos FEN como olor recompensado (EC+) y LIO como no recompensado (EC-). Aquellos individuos que presentaban una respuesta espontánea a alguno de los dos olores eran dejados de lado y no continuaban con el condicionamiento. Además del índice de discriminación calculado en cada par de ensayos que utilizamos para el análisis del condicionamiento, calculamos un índice de discriminación global (IDG) en el cual sumamos todas las respuestas condicionadas al EC+ menos todas las respuestas al EC- a lo largo de los 4 pares de ensayo de condicionamiento posteriores al primer par en el cual mediamos la respuesta espontánea (Bitterman *et al.*, 1983). De este modo el IDG podía fluctuar entre los valores extremos de -4, si la abeja respondía sistemáticamente al EC- y no al EC+, o de +4 en la situación opuesta en que respondiera solo al EC+ y nunca al EC-. La evaluación consistía en la presentación sin recompensar de ambos olores.

### **Análisis de los datos**

Como una primera aproximación quisimos saber si existen diferencias entre las vibraciones que percibe una abeja que recibió solución sin aromatizar y aquella que recibió solución aromatizada durante la trofalaxia. Para ello comparamos cada uno de los parámetros de la vibración (DP, FP, PV) entre el grupo Sin Olor y el grupo Con Olor por medio de la prueba de Mann-Whitney (Zar, 1999).

En cuanto a la sensibilidad gustativa nos interesó analizar si los individuos que recibieron solución aromatizada presentaban una sensibilidad al azúcar diferente de aquellos que recibieron solución azucarada sin aromatizar. Para ello comparamos los puntajes URA entre ambos grupos por medio de la prueba de Mann-Whitney (Zar, 1999)

El análisis del desempeño de las abejas en el condicionamiento diferencial lo realizamos por medio de una prueba de ANOVA de dos factores con medidas repetidas (Sokal y Rohlf, 1995). Uno de los factores fueron los sucesivos ensayos de condicionamiento (factor ENSAYO: medidas repetidas con 5 niveles) y el segundo factor fue el tratamiento con olor (factor TRATAMIENTO: 2

niveles). La proporción de respuestas condicionadas en la evaluación las comparamos entre tratamientos por medio de la prueba de Fisher.

El principal objetivo de nuestro estudio fue analizar si es que existe para las abejas *M. quadrifasciata* una relación entre la comunicación durante la trofalaxia (vibraciones recibidas) con su aprendizaje (sensibilidad al azúcar y/o condicionamiento olfativo). Es decir si la cantidad de vibraciones que reciben las abejas durante la trofalaxia produce un aumento en su probabilidad de respuesta al azúcar o a olores florales, y además, si la cantidad de vibraciones pueden mejorar el establecimiento del vínculo específico olor-recompensa en la trofalaxia. Para analizar esto necesitábamos ver, en cada uno de los grupos experimentales (Sin Olor y Con Olor), si existían correlaciones entre las variables de las vibraciones que había recibido cada individuo con su sensibilidad al azúcar y/o con su desempeño en el condicionamiento diferencial. Para ello en cada uno de los grupos realizamos un análisis de correlaciones múltiples (correlación de Pearson) junto con un análisis de componentes principales (ACP) basado en correlaciones entre las variables. Dicho análisis tuvo en cuenta para cada individuo las vibraciones recibidas (DP, FP, PV) junto con su umbral de respuesta al azúcar (URA), su desempeño durante el condicionamiento (IDG) y la respuesta o no al EC+ en la evaluación (Respuesta Condicionada en la Evaluación, RCE). Si bien las correlaciones múltiples permiten ver qué variables están asociadas de a pares, el ACP permite de un modo más global analizar las asociaciones entre todas ellas y al reducir el número de variables a solo unos pocos factores explicativos de la variabilidad encontrar explicaciones más generales sobre el origen de dicha variabilidad.

## Resultados

### Vibraciones durante la trofalaxia

Durante el contacto trofaláctico las abejas no solo reciben néctar o solución azucarada, sino que también pueden percibir las vibraciones emitidas por su compañera durante la descarga del buche. Al comparar las vibraciones que recibieron las abejas junto con la solución azucarada sin aromatizar con las que recibieron cuando la solución estaba aromatizada registramos un aumento significativo de las vibraciones al transmitir solución con un olor floral (Figura 5.4). Pudimos observar un aumento en la duración de los pulsos (DP) (Sin Olor: Mediana= 56,1ms, N= 26; Con Olor: Mediana= 90,9, N=25; prueba de Man-Withney: U= 169,5;  $p < 0,005$ . Figura 5.5a, panel superior) y también del número de pulsos por segundo (FP) (Sin Olor: Mediana= 1,16

pulsos/s, N= 26; Con Olor: Mediana= 2,45 pulsos/s, N=25; Prueba de Man-Withney: U= 163;  $p < 0,005$ . Figura 5.5b, panel central). Estos aumentos traen como consecuencia un aumento en la proporción del tiempo de la trofalaxia durante el cual la abeja recibió vibraciones (PV)(Sin Olor: Mediana= 9,61/ , N= 26; Con Olor: Mediana= 30,78/ , N=25; prueba de Man-Withney: U= 150;  $p < 0,005$ . Figura 5.5c, panel inferior).

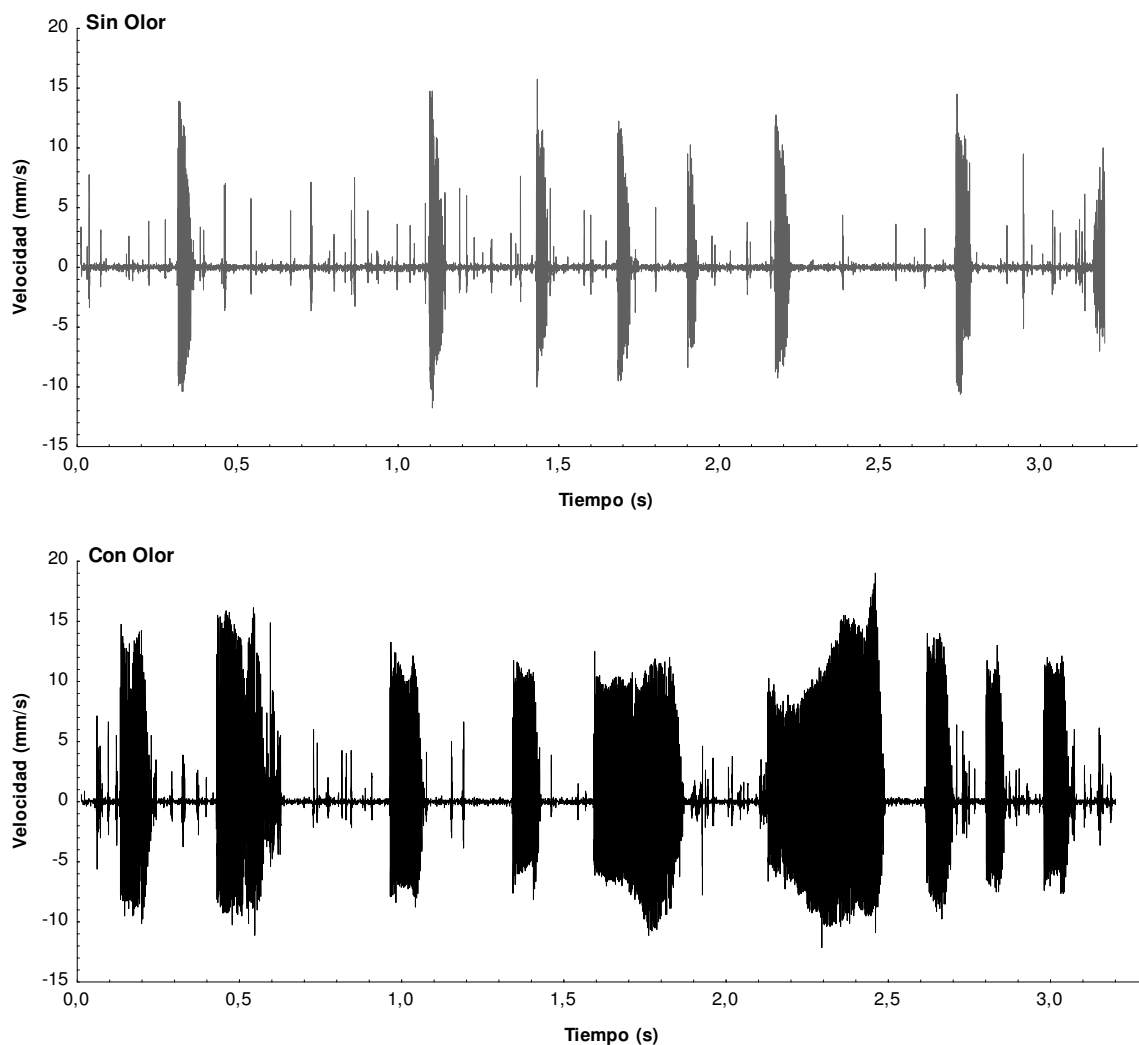
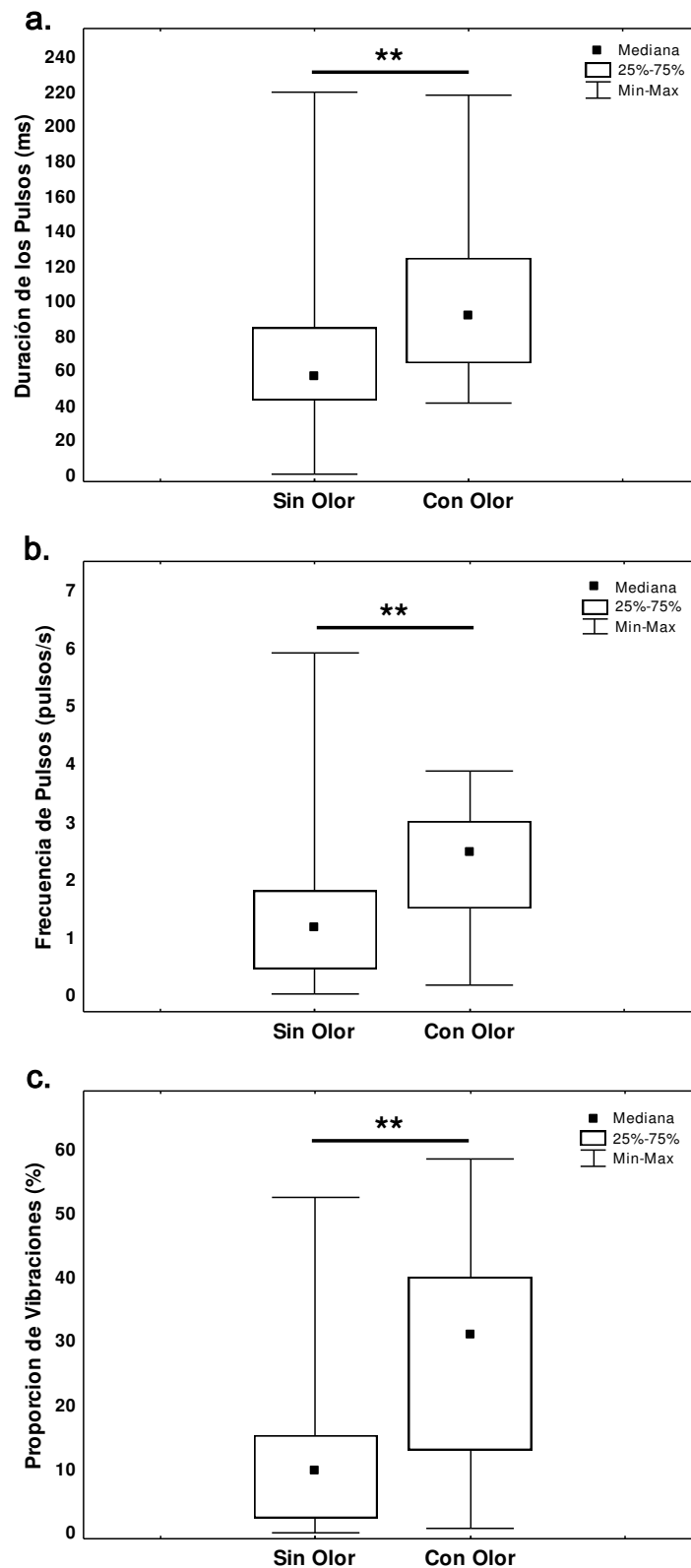


Figura 5.4: Ejemplos de las vibraciones registradas durante la trofalaxia en la situación en que la solución transferida no estaba aromatizada (Sin Olor) y cuando estaba aromatizada con un olor floral (Con Olor).





**Figura 5.5:** Parámetros relacionados con las vibraciones emitidas por la dadora durante el contacto trofaláctico durante el cual se transmite solución sin aromatizar (Sin Olor) y cuando la solución esta aromatizada con FEN (Con Olor). Los tres parámetros de las vibraciones muestran aumentos significativos (\*\*  $p < 0,005$ ) cuando el alimento estaba aromatizado. N Sin Olor: 26; N Con Olor: 25.

### Sensibilización gustativa

Como acabamos de ver los individuos que recibieron solución azucarada aromatizada también recibieron mayor cantidad de vibraciones. Podría ser que la presencia de una clave olfativa y/o mayores cantidades de vibraciones recibidas durante la trofalaxia produjeran un cambio en la sensibilidad gustativa de la abeja receptora. Sin embargo, al evaluar los URA en las abejas *M. quadrifasciata* después de la trofalaxia observamos que tanto los individuos que recibieron una solución aromatizada como los que recibieron una solución sin aromatizar presentaron puntajes URA similares (Prueba de Mann-Whitney:  $U = 169$ ;  $N = 38$ ;  $P = 0,74$ . Figura 5.6). En ambos grupos de abejas la mediana del puntaje URA es de 2, lo que significa que la concentración mínima a la cual los individuos respondieron extendiendo la probóscide fue de 30% p/p.

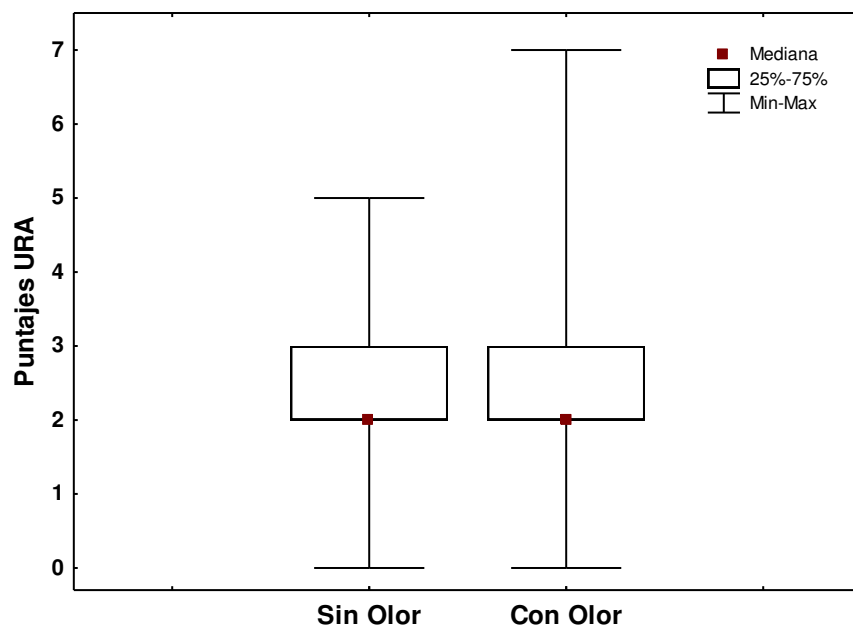
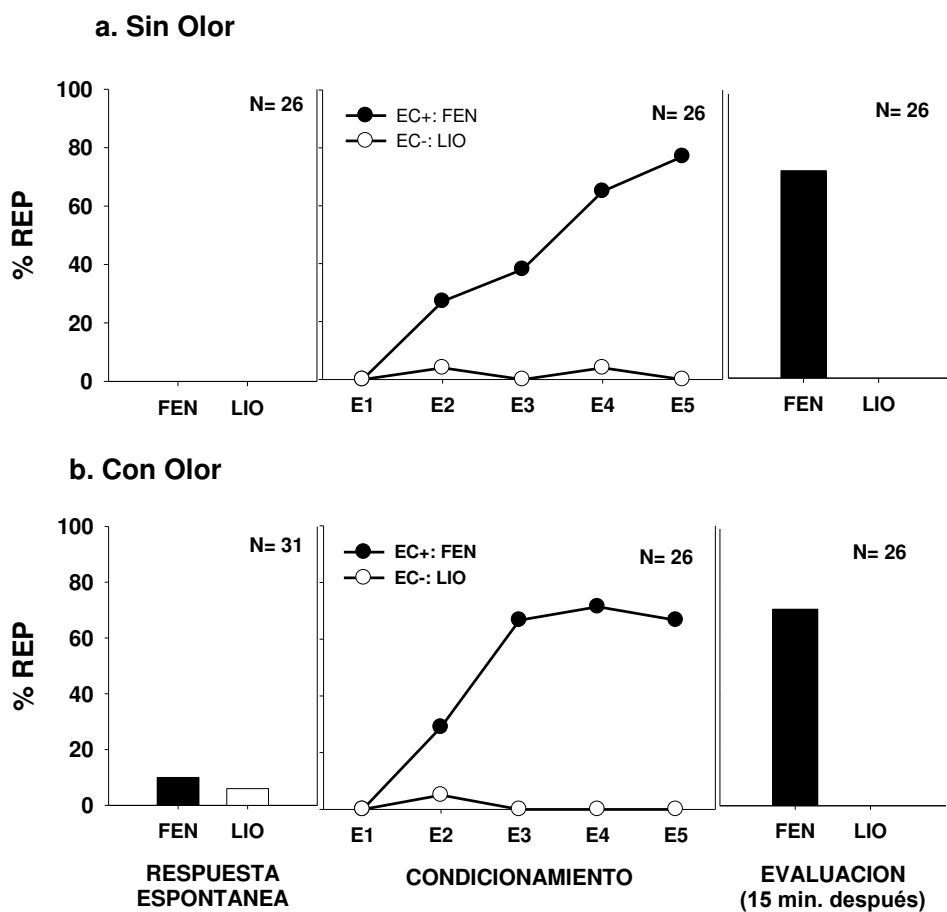


Figura 5.6: Puntajes URA de las abejas receptoras de néctar durante la trofalaxia luego de recibir una solución sin aromatizar (Sin Olor) o una solución aromatizada (Con Olor). En ambas situaciones el URA evidenciado por la mediana de sus puntajes URA fue cercano a 30% p/p. no decir control sino sin olor. N Sin Olor: 18; N Con Olor: 20.

### Condicionamiento diferencial olfativo

Durante el condicionamiento olfativo la primera presentación de los olores puede generar una respuesta espontánea a dichos olores que correlaciona con las experiencias olfativas previas del individuo (Bitterman *et al.*, 1983; Menzel, 1990; Farina *et al.*, 2005). Las abejas del grupo control, que durante la trofalaxia recibieron solución azucarada sin aromatizar no mostraron ninguna respuesta espontánea a ninguno de los olores (Figura 5.7a, panel izquierdo). En cambio algunos de los individuos que recibieron solución aromatizada mostraron respuestas espontáneas, aunque en una proporción tan baja que no permitió realizar un análisis estadístico (Figura 5.7b, panel izquierdo).

A lo largo del ensayo de condicionamiento diferencial las abejas recibieron 5 presentaciones de dos olores: uno de ellos asociado a una recompensa de azúcar (EC+: FEN) y otro no (EC-: LIO) (Figura 5.8, panel central). El desempeño en este protocolo fue analizado evaluando los índices de discriminación (ID) de cada una de las abejas en cada par de ensayos. Estos IDs fueron comparados por medio de una prueba de ANOVA dos factores. Este análisis demostró que las abejas fueron aprendiendo a responder diferencialmente al olor recompensado a lo largo de los sucesivos ensayos (prueba de ANOVA, factor ENSAYO con 5 medidas repetidas:  $F= 29,07$ ;  $gl= 4$ ;  $p < 0,001$ ), independientemente de haber recibido o no solución aromatizada durante la trofalaxia (prueba de ANOVA, factor INTERACCIÓN:  $F= 1,97$ ;  $gl= 4$ ;  $p= 0,1$ ). Los niveles de discriminación alcanzados por las abejas de cada uno de los dos grupos experimentales no mostraron diferencias significativas (Prueba de ANOVA, factor TRATAMIENTO:  $F= 0,87$ ;  $gl= 1$ ;  $p= 0,36$ ). Del mismo modo la proporción de respuestas en la evaluación fue de alrededor del 70% independientemente del tratamiento (Prueba exacta de Fisher:  $p=1$ . Figura 5.7, panel derecho).



**Figura 5.7:** Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (%REP) durante la primera presentación de los olores (Respuesta Espontánea, panel izquierdo), porcentaje de abejas que respondieron durante los cinco pares de ensayos de condicionamiento (Condicionamiento), y abejas que respondieron durante el periodo de evaluación 15 minutos después del condicionamiento (Evaluación) durante el condicionamiento diferencial REP: (a) Sin Olor: abejas que recibieron durante la trofalaxia solución azucarada sin aromatizar (b) Con Olor: Abejas que recibieron durante la trofalaxia solución aromatizada con FEN. No se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos ni en el condicionamiento (ANOVA) ni en la evaluación (Prueba de Fisher).

### **Correlación entre las vibraciones y el aprendizaje olfativo durante la trofalaxia**

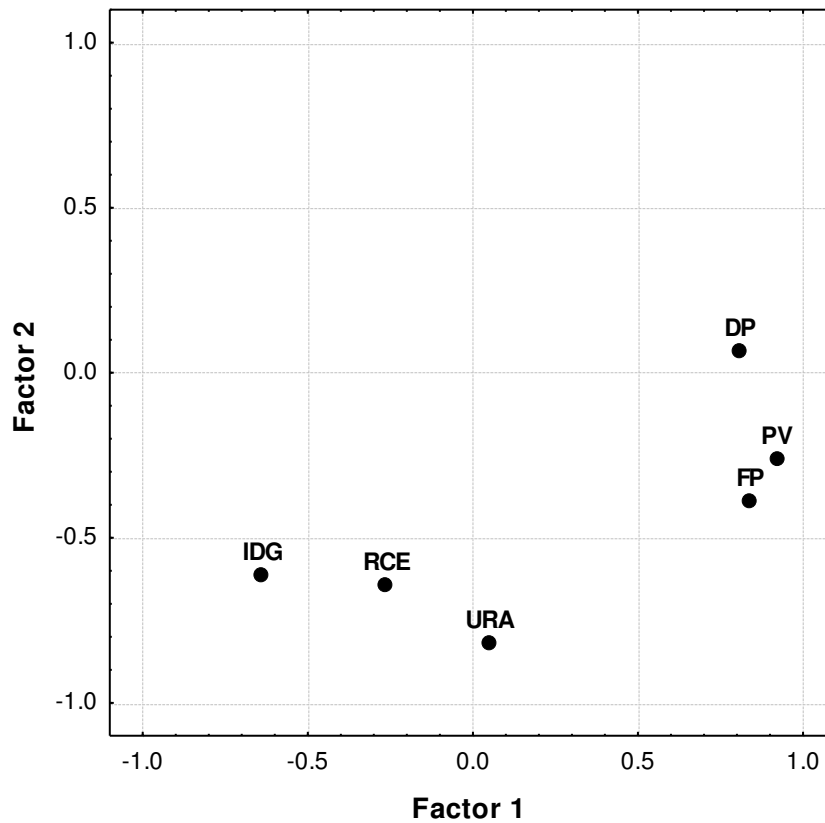
Para evaluar de forma global el efecto de las vibraciones en la sensibilidad gustativa y el aprendizaje olfativo analizamos en cada grupo experimental las correlaciones entre cada uno de los parámetros por medio de correlaciones múltiples y de un análisis de componentes principales (ACP).

En la situación en la que el alimento transferido no estaba aromatizado (Sin Olor) el análisis de correlación múltiple demuestra que existe una correlación positiva entre los tres parámetros de las vibraciones y además una correlación negativa entre el IDG y la duración de los pulsos (Tabla 5.1). El ACP muestra que los dos primeros factores son suficientes para explicar el 73% de la variación de los datos. Estos dos factores parecieran separar los parámetros asociados a las vibraciones de aquellos relacionados con el aprendizaje. El primer factor, que explica el 44,9% de la variación, muestra correlaciones positivas con los tres parámetros de las vibraciones y además correlaciona de forma negativa con el IDG (Figura 5.8, factor 1). El segundo factor, que explica el 28,2% de la variabilidad correlaciona de forma negativa con los tres parámetros asociados al aprendizaje (IDG, URA y RE) pero no muestra una correlación importante con los parámetros de la vibración (Figura 5.8, factor 2). Es decir que la variabilidad de los datos podría explicarse por dos factores independientes entre si: el primer factor serian las vibraciones y el segundo el aprendizaje.

La figura 5.8 muestra la distribución de las diferentes variables en el plano generado por estos dos factores. Visualmente podemos apreciar la misma tendencia descrita anteriormente: los parámetros de las vibraciones se ven agrupados entre si y alejados del otro grupo de variables que son aquellas asociadas al aprendizaje.

**Tabla 5.1:** Matriz de correlación múltiple (Pearson) entre las variables de la vibración y el aprendizaje de las abejas del grupo Control. DP: duración del pulso; FP: frecuencia de pulsos; PV: proporción de vibraciones; URA: puntaje del umbral de respuesta al azúcar; IDG: índice de discriminación global en el condicionamiento diferencial; RCE: respuesta condicionada en la evaluación del condicionamiento diferencial. Las correlaciones marcadas con aquellas estadísticamente significativas con  $p < 0,05$ . N=18.

	DP	FP	PV	URA	IDG	RCE
DP						
FP	<u>0,47</u>					
PV	<u>0,62</u>	<u>0,95</u>				
URA	0,06	0,27	0,15			
IDG	<u>-0,57</u>	-0,23	-0,38	0,4		
RCE	-0,14	-0,04	-0,06	0,28	0,39	



**Figura 5.8:** Distribución de las variables de la vibración y el aprendizaje de las abejas del grupo Sin Olor en el plano definido por los dos primeros factores del ACP. El factor 1 explica el 44,9% de la variabilidad de los datos mientras que el factor 2 explica el 28,2%. Los ejes marcan los valores de correlación de cada una de las variables con los factores. DP: duración del pulso; FP: frecuencia de pulsos; PV: proporción de vibraciones; URA: puntaje del umbral de respuesta al azúcar; IDG: índice de discriminación global en el condicionamiento diferencial; RCE: respuesta condicionada en la evaluación del condicionamiento diferencial.

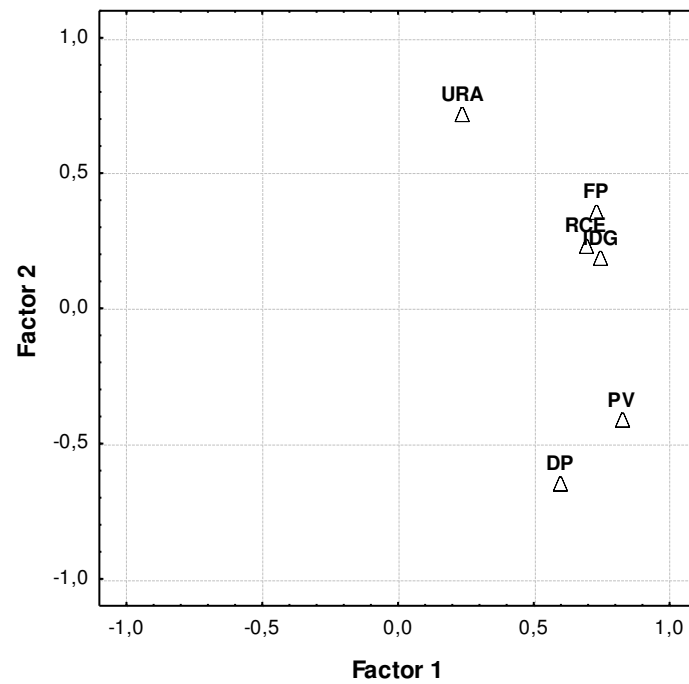
En la situación en que el alimento transferido durante la trofalaxia estaba aromatizado las variables de la vibración y del aprendizaje no aparecen tan claramente segregadas entre sí como en la situación Sin Olor. La tabla 5.2 muestra las correlaciones entre pares de variables en la situación Con Olor (Correlación múltiple). En lo que respecta a las variables de la vibración podemos ver que la proporción de vibraciones (PV) correlaciona de forma positiva tanto con la duración del pulso (DP) como con la frecuencia de pulsos (FP). En lo que respecta al aprendizaje se ve que existe una correlación positiva entre el aprendizaje durante el condicionamiento (IDG) con la respuesta condicionada en la evaluación (RCE). Lo que aparece además en estas correlaciones es la existencia de una correlación significativa entre el aprendizaje (IDG) y uno de los parámetros de la vibración (FP)

El ACP muestra una tendencia similar a lo observado en las correlaciones por pares. Los primeros dos factores son suficiente para explicar el 66,3% de la variaciones en los datos. De estos factores el primero, que explica el 44,3% de la variación, correlaciona de forma positiva tanto con los tres parámetros de las vibraciones como con dos de los parámetros asociados al aprendizaje (IDG y RCE) (Figura 5.9, factor 1). El segundo factor, que explica el 22% de la variación, por su parte correlaciona con la sensibilidad al azúcar (URA) de forma positiva y con la duración del pulso (DP) de forma negativa (Figura 5.9, factor 2). En la figura 9 no se ve como en el grupo Sin Olor una clara distinción entre los parámetros de las vibraciones con el aprendizaje, sino que en el plano generado por estos dos nuevos factores las variables de la vibración aparecen cercanas a las del aprendizaje, indicando una asociación entre ellas.



**Tabla 5.2:** Matriz de correlación múltiple (Pearson) entre las variables de la vibración y el aprendizaje de las abejas del grupo Olor. DP: duración del pulso; FP: frecuencia de pulsos; PV: proporción de vibraciones; URA: puntaje del umbral de respuesta al azúcar; IDG: índice de discriminación global en el condicionamiento diferencial; RCE: respuesta condicionada en la evaluación del condicionamiento diferencial. Las correlaciones marcadas con aquellas estadísticamente significativas con  $p < 0,05$ . N=20.

	DP	FP	PV	URA	IDG	RCE
DP						
FP	0,09					
PV	<u>0,73</u>	<u>0,62</u>				
URA	-0,05	0,39	-0,03			
IDG	0,21	<u>0,46</u>	0,38	0,05		
RCE	0,26	0,30	0,29	0,18	<u>0,66</u>	



**Figura 5.9:** Distribución de las variables de la vibración y el aprendizaje de las abejas del grupo Olor en el plano definido por los dos primeros factores del ACP. El factor 1 explica el 44,3% de la variabilidad de los datos mientras que el factor 2 explica el 22%. Los ejes marcan los valores de correlación de cada una de las variables con los factores. DP: duración del pulso; FP: frecuencia de pulsos; PV: proporción de vibraciones; URA: puntaje del umbral de respuesta al azúcar; IDG: índice de discriminación global en el condicionamiento diferencial; RCE: respuesta condicionada en la evaluación del condicionamiento diferencial

## Discusión

En este estudio pudimos analizar varios aspectos diferentes de la interacción trofaláctica en las abejas *M. quadrifasciata*. Se observó que al estar aromatizada la solución azucarada transferida, el despliegue de vibraciones del individuo dador de alimento aumentó significativamente. La presencia del olor sin embargo no produjo modificaciones en la propensión a responder a estímulos sensoriales de los individuos receptores como pudimos evidenciar por medio de sus URA. También pudimos observar que un único contacto trofaláctico en el que se transfiere solución aromatizada no pareciera ser suficiente como para aumentar el desempeño posterior de las abejas en el condicionamiento olfativo. Sin embargo, al tener en cuenta para cada uno de los individuos dentro de un grupo la influencia de las vibraciones en el establecimiento de la asociación olor-recompensa, observamos que en los casos específicos en que la solución transferida estaba aromatizada mayores cantidades de vibraciones se asociaron con mejores desempeños en el aprendizaje posterior.

### **Efecto del olor del alimento transferido en las vibraciones durante la trofalaxia**

En el presente trabajo observamos un claro aumento de las vibraciones emitidas durante la trofalaxia por parte del dador de alimento cuando la solución transferida estaba aromatizada con un olor floral. Trabajos previos con *M. quadrifasciata* demuestran que la emisión de vibraciones se ve afectada por la concentración de la solución azucarada que ha sido recolectada y está siendo transferida dentro de la colmena (Hrnir *et al.*, 2004b). En las abejas de la especie *Apis mellifera* también se han visto aumentos en las vibraciones emitidas durante la danza de reclutamiento dependiendo de la concentración de azúcar de la solución recolectada (Esch, 1963; Waddington y Kirchner, 1992) o la tasa de recompensa en términos de flujo de solución azucarada (Silva *et al.*, 2008). Estos hechos podría estar indicando que las vibraciones podrían estar codificando la intensidad del estímulo excitatorio representado por el alimento. El agregado de un olor a la solución azucarada también podría ser considerado como un aumento en la intensidad del estímulo excitatorio. En las abejas melíferas se sabe que el agregado de componentes presentes en forma de traza (minerales, aminoácidos, etc.) en el alimento recolectado modifica la ocurrencia de conductas relacionadas con la transferencia de información como la danza (Afik *et al.*, 2008). La presencia de un olor floral puntualmente aumenta el número de contactos trofalácticos (Ramírez *et al.*, 2010), lo cual fomentaría la transmisión de la información olfativa dentro de la colmena y también provoca un aumento en el número de individuos que salen de la colmena en búsqueda de alimento (von Frisch, 1967).

Más aun, la presencia de un olor diluido en la solución azucarada produce un decremento en el umbral de respuesta al azúcar (Ramírez *et al.*, 2010) que es un indicador de una propensión a responder a diferentes estímulos sensoriales (Scheiner, 2004; Erber *et al.*, 2006). Este fenómeno pareciera indicar un caso de sensibilización por el olor floral del mismo modo que la solución azucarada produce sensibilización (Hammer *et al.*, 1994; Hammer, 1997). En este contexto la presencia de olor en la solución transferida en la trofalaxia podría ser considerado como un aumento en la intensidad del estímulo excitatorio, que a su vez podría generar un estado de activación generalizada y como consecuencia provocar un aumento en la producción de vibraciones.

### **Efecto del olor del alimento transferido en el aprendizaje**

En nuestros experimentos con las abejas *M. quadrifasciata* no encontramos diferencias entre los URA de los individuos que recibieron solución sin olor o aromatizada. Existe evidencia en las abejas melíferas de que el contacto con una solución aromatizada puede modificar los umbrales de respuesta al azúcar (Ramírez *et al.*, 2010). De este modo si el olor en el alimento es una clave que aumenta el valor del estímulo excitatorio, y eso genera una mayor activación del individuo, al recibir solución aromatizada veríamos que su URA disminuye. Este no fue el caso en nuestros registros, donde ambos grupos de abejas presentaron puntajes URA similares. Podría ser que un único contacto trofaláctico, con una duración de segundos, o bien genera una activación de corto término que no es detectada 30 minutos más tarde o bien podría ser que fuera necesario un contacto de mayor duración con la solución aromatizada, como fue registrado en las abejas melíferas quienes bajaban sus URA luego de varias horas en contacto con solución aromatizada (Ramírez *et al.*, 2010).

En lo que respecta al aprendizaje olfativo luego de un contacto trofaláctico tampoco evidenciamos diferencias entre el grupo de las abejas que recibieron solución sin aromatizar y el de las que recibieron solución con olor. Ya de por sí esta especie de abeja presenta un menor desempeño que el de las abejas melíferas en el protocolo REP. La proporción de respuestas espontáneas, que es una medida utilizada con las abejas melíferas como indicador del aprendizaje previo (Gerber *et al.*, 1996; Sandoz *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2005; Grüter *et al.*, 2006; Arenas y Farina, 2008), fue extremadamente baja. En un intento de evidenciar los posibles efectos de ese contacto con el olor durante la trofalaxia, realizamos el protocolo de condicionamiento diferencial buscando diferencias en la dinámica de aprendizaje o la retención como indicador de las experiencias previas (Chandra *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2005; Fernández

*et al.*, 2009). Si bien en el tercer ensayo del condicionamiento pareciera haber una tendencia a una mayor proporción de respuestas condicionadas de los individuos que recibieron solución aromatizada, el análisis general del aprendizaje no mostró diferencias significativas entre los grupos. Podría ser que el contexto REP no sea el más indicado para evidenciar los efectos del contacto con el olor en la trofalaxia por la cantidad de manipulación que sufren los individuos. También es posible que las abejas *M. quadrifasciata* necesiten más de un contacto trofaláctico para aprender el olor del alimento transferido. Si bien existen registros en las abejas melíferas que un único contacto trofaláctico es suficiente para el establecimiento de una memoria olfativa de largo término (Gil y De Marco, 2005), la consolidación de dichas memorias requiere varias exposiciones a los estímulos a asociar (Menzel, 1999). También existen registros de que las abejas más jóvenes, de edades pre-recolectoras, al igual que las abejas melíponas, requieren más de un contacto para poder establecer asociaciones/memorias que puedan ser evocadas en el paradigma REP (Ramírez *et al.*, 2010). Hasta la fecha no se conocen descripciones de la cantidad de contactos trofalácticos que ocurren cuando una abeja recolectora *M. quadrifasciata* retorna a la colmena, ni si dicha cantidad cambia con la presencia de olores en la solución.

#### **Efecto de las vibraciones recibidas durante la trofalaxia en el aprendizaje**

El contacto trofaláctico le permite a la abeja receptora entrar en contacto con el alimento que frecuentemente puede estar aromatizado (néctar). Es decir que en ese contexto social el individuo receptor entra en contacto de modo contingente con el estímulo incondicionado (EI: azúcar) y el condicionado (EC: olor) del mismo modo que en el condicionamiento REP. Este contacto por lo tanto, permitiría el establecimiento de un vínculo, o asociación, entre ambos (EI-EC) que podría ser visualizado posteriormente en el contexto REP. Las abejas *M. quadrifasciata* modulan la producción de vibraciones dependiendo de la concentración de la solución azucarada (Hrnir *et al.*, 2004b). Resultaría esperable que esa variable modulada tuviera algún efecto en el establecimiento del vínculo EI-EC durante la trofalaxia, ya fuera facilitando u obstaculizándolo.

Si bien en el tema de las vibraciones producidas por las abejas sin aguijón al volver de un viaje de recolección existen diferentes interpretaciones sobre la información que pueden contener (distancia al nido: Esch *et al.*, 1965; Esch, 1967a; Nieh y Roubik, 1998; Aguilar y Briceño, 2002; Nieh *et al.*, 2003; altura sobre el nivel del suelo: Nieh y Roubik, 1998; Hrnir *et al.*, 2004a, concentración de la solución azucarada: Aguilar y Briceño, 2002; Hrnir *et al.*, 2002, 2004b, Nieh *et al.*, 2003), el factor común a la mayoría de esas interpretaciones pareciera ser que cuando

una abeja tiene un mayor nivel de excitación, producto de una mayor estimulación gustativa, lo manifiesta al llegar al nido con intensas vibraciones y este comportamiento traería como consecuencia una mayor congregación de individuos en su entorno (Lindauer y Kerr, 1958; Hrncir, 2006b). En cada uno de nuestros grupos experimentales si bien la concentración de la solución azucarada transferida fue constante observamos al igual que Hrncir y colaboradores (2004b) un amplio intervalo en la cantidad de vibraciones producidas. Utilizamos una concentración de azúcar de un valor crítico que permitía que la abeja dadora a veces no vibrara y a veces vibrara hasta el 60% del tiempo. Esto generó que las abejas receptoras de alimento durante la trofalaxia recibieran diferentes cantidades de vibración. Al tener en cuenta a cada individuo puntualmente, es decir conocer las vibraciones que recibió, cuál fue su sensibilidad gustativa y como se desempeño en el condicionamiento diferencial, podemos analizar individualmente el efecto que las vibraciones tuvieron en cada abeja. En lo que respecta al aprendizaje olfativo, al identificar a los individuos que recibieron diferentes cantidades de vibración y que a su vez presentaron diferentes IDG en el condicionamiento tenemos una amplia fuente de variación para ambos factores. Esto nos permitió analizar dentro de cada uno de los grupos (sin olor o con olor) la relación del aprendizaje de cada individuo con las vibraciones que recibió durante la trofalaxia. En vistas de que los URA no estaban asociados ni a las vibraciones ni al aprendizaje, podríamos suponer que si las vibraciones tuvieron un efecto inespecífico de aumentar la propensión a responder de las abejas, este efecto ya no era detectable 30 minutos mas tarde. Este hecho abre la hipótesis de que las diferencias en la fuerza del vínculo olor-recompensa establecido durante la trofalaxia estarían relacionadas con un efecto directo de las vibraciones en el establecimiento de dicho vínculo.

En la situación en que el alimento transferido no tenía un olor floral determinado, los parámetros de las vibraciones y los del aprendizaje aparecen segregados en el análisis ACP. Esto estaría indicando que el desempeño en el condicionamiento no tiene relación con las vibraciones ocurridas durante la trofalaxia. La única conexión entre los parámetros vibratorios y los del aprendizaje se puede ver en las correlaciones por pares de variables donde las abejas que recibieron pulsos vibratorios de mayor duración muestran luego un peor desempeño durante el condicionamiento (correlación negativa entre DP e IDG). Este fenómeno podría ser un indicador de que en aquellos contactos trofalácticos en los que se transmite solución sin aromatizar, mayores niveles de vibraciones podrían posteriormente interferir con el aprendizaje asociativo de un olor floral en el paradigma REP. Podría ser que al recibir una solución azucarada sin olor durante la trofalaxia las abejas establecieran la asociación alimento-solución sin olor. Dicha

asociación podría dificultar la posterior asociación de ese mismo alimento (solución azucarada sin olor) a un olor floral novedoso (Rescorla y Wagner, 1972; Couvillon *et al.*, 1997; Guerrieri *et al.*, 2005).

Por el contrario en la situación en que el alimento transferido estaba aromatizado observamos una correlación positiva entre la frecuencia de pulsos (FP) y el aprendizaje. Además en el Factor 1 del ACP se observa también una tendencia a la asociación entre el aprendizaje olfativo y las vibraciones recibidas durante el contacto trofaláctico. La trofalaxia es un contexto comportamental en el que el individuo receptor está motivado para adquirir información. Estos contactos permiten la transferencia de alimento y de información en forma simultánea. Durante la trofalaxia, el individuo receptor percibe estímulos de diferentes modalidades sensoriales (táctil, olfativo y gustativo, vibratorio por el sustrato, sonoro). En referencia a este punto, existen evidencias en humanos, monos, pájaros e insectos de que la integración de la información de múltiples modalidades sensoriales es crucial para lograr el nivel de atención necesaria para decodificar el mensaje durante la comunicación (Partan y Marler, 1999). Comúnmente la combinación de estímulos sensoriales lleva a respuestas aumentadas en el receptor o incluso puede provocar una respuesta completamente novedosa y diferente de las respuestas a cada uno de los estímulos de forma independiente (Partan y Marler, 1999). En este marco el contacto con la solución azucarada aromatizada durante la trofalaxia sería la vía que permitiría adquirir la información sobre el olor y productividad de la fuente de alimento que está siendo explotada. Este tipo de asociaciones son las mismas que se establecen en el laboratorio en el paradigma REP al asociar un olor con recompensa. Sin embargo durante la trofalaxia existen también estímulos vibratorios que como ya mencionamos se modulan con la productividad de la fuente de alimento explotada por la dadora. A partir de nuestros resultados pareciera posible que los diferentes niveles de vibración recibidos durante la trofalaxia, pudieran estar modulando el establecimiento de la contingencia EC-EI. En este proceso podrían entrar en juego procesos cognitivos como cambios en los niveles de atención (Klosterhalften *et al.*, 1978; Bouton y Moody, 2004). De este modo las vibraciones podrían estar generando que las abejas focalizaran su atención en la adquisición de un tipo específico de información, como pueden ser las claves quimiosensoriales del alimento, ignorando otras.

## Conclusiones Generales

### *Las abejas sin aguijón pueden discriminar en el paradigma REP*

Por primera vez se ha podido utilizar el protocolo de la respuesta de extensión de probóscide (REP) para evaluar el aprendizaje asociativo en abejas sin aguijón. Los niveles de discriminación alcanzados por estas abejas en este protocolo fueron siempre menores al compararlos con los niveles que pueden alcanzar las abejas melíferas (Bitterman *et al.*, 1983; Menzel, 1999). Sin embargo las abejas del género *Melipona* (*M. quadrifasciata* y *M. scutellaris*) mostraron respondieron diferencialmente a los olores recompensados y no-recompensados. Al evaluar las memorias olfativas de corto término observamos que las abejas *M. quadrifasciata* mostraban una clara retención de las asociaciones establecidas durante el condicionamiento. Sin embargo, en las abejas de la especie *M. scutellaris* mostraron una caída de la retención, a pesar de su buen desempeño en el condicionamiento. Es posible que esta especie de abeja sin aguijón no sea capaz de establecer durante el condicionamiento las memorias necesarias para mantener la discriminación al terminar el protocolo. En el caso de las abejas de las especies *Scaptorigona aff. depilis* y *Tetragonisca angustula* el desempeño en el condicionamiento diferencial fue extremadamente bajo, evidenciando solo algunas respuestas aisladas al olor recompensado.

Los bajos niveles de respuesta de las abejas sin aguijón en el protocolo de condicionamiento REP pueden deberse a dos causas principales: que el protocolo no sea el adecuado para el trabajo con abejas sin aguijón o a diferencias intrínsecas de cada especie en sus capacidades de establecer una asociación olor-recompensa relacionadas con sus estrategias de recolección.

### *Conveniencia del uso del protocolo REP para abejas sin aguijón*

En nuestro trabajo realizamos ensayos con una estimulación de 12 segundos (en vez del estándar de 6 segundos). Este aumento no mejoró la discriminación de las abejas *M. quadrifasciata*, que parecieran haber llegado a un nivel de desempeño máximo en éste protocolo. El estímulo de mayor duración les permitió a las abejas *A. aff. depilis* mostrar una pequeña proporción de RC a uno de los olores en el punto medio del condicionamiento aunque dicha mejora no fue significativa a lo largo del protocolo ni se percibió en la evaluación. En lo que respecta a las abejas *T. angustula*, aun con una estimulación olfativa más larga de lo usual, no fueron capaces de discriminar entre el olor recompensado y el que no lo estaba en este protocolo de aprendizaje. Sin embargo, cuando los individuos habían tenido contacto con una



solución azucarada aromatizada dentro de la colmena, aunque su nivel de discriminación fue muy bajo (alrededor del 20%), observamos niveles significativos de discriminación. Estas pequeñas mejorías en el desempeño de *S. aff depilis* o *T. angustula* sugieren que sería posible ajustar el protocolo del condicionamiento con el fin de mejorar su desempeño en el paradigma REP y por lo tanto re-analizar cuantitativamente las habilidades de aprendizaje de ésta y otras especies de trigonas en el futuro.

#### *Efecto de la estrategia de recolección en las habilidades de aprendizaje*

Una explicación posible de las diferencias en el aprendizaje entre las especies de abejas podría estar relacionada con diferencias intrínsecas en sus habilidades cognitivas como consecuencia de sus disímiles estrategias de recolección y reclutamiento. El aroma de la flor pareciera jugar un papel importante en la aproximación final a la fuente de alimento, induciendo a la abeja a aterrizar en la flor (von Frisch, 1914). El olor de una fuente de alimento es quizás la información más comúnmente utilizada por las abejas recolectoras. Entre las abejas sin aguijón las diferentes especies utilizan esta información junto con muchas otras claves dando lugar a diferentes estrategias de recolección. Para cualquier abeja, *Melipona* o melífera, que va por primera vez en la búsqueda de alimento, los estímulos visuales son especialmente relevantes para encontrar los parches florales a distancia (von Frisch, 1967; Wehner, 1981). Al retornar a la colmena sin embargo, las diferencias entre especies se hacen evidentes. Las abejas melíferas cuando retornan a una fuente de alimento, o son reclutadas a una nueva fuente, utilizan la información de distancia y dirección adquiridas en sus experiencias previas o al seguir las danzas de reclutamiento de sus compañeras en la colmena. Al llegar a la fuente el olor floral se torna relevante al indicar cuál es la flor que estaba buscando (von Frisch, 1967). En ese contexto el aprendizaje del olor del alimento sería muy relevante. Las abejas *Melipona* en cambio poseen un sistema de reclutamiento basado en una alerta general con muy poca información de la dirección o distancia de la fuente de alimento (Jarau *et al.*, 2000). Las abejas alertadas dentro de la colmena salen en búsquedas aleatorias y si bien al aproximarse al alimento el olor floral gana relevancia, cuentan con marcas de feromonas en la fuente que indican la ubicación exacta (Nieh, 1998b), por lo que el aprendizaje del olor floral podría no ser tan importante. Las abejas *Scaptotrigona* al depositar un sendero de feromonas todo a lo largo del camino (Lindauer y Kerr, 1958) pueden seguir el camino de las marcas de feromonas directamente desde la entrada de la colmena e incluso existen marcas especiales indicando el punto final del camino en la fuente de alimento (Schmidt *et al.*, 2003). Con esa estrategia de recolección y reclutamiento podría ser que aprender el olor del alimento podría no ser muy relevante. Finalmente las abejas *T.*

*angustula* son recolectoras solitarias (Johnson, 1983) que no muestran un reclutamiento eficiente (Aguilar *et al.*, 2005) y que depositan fuertes marcas de feromonas en las fuentes de alimento que fomentan la elección de las abejas, incluso si eso contradice la experiencia previa individual con el color de la fuente (Villa y Weiss, 1990). En este sentido es posible que el olor del alimento no sea particularmente relevante para esta especie de abejas sociales

Un modo de continuar el análisis del uso de la información del alimento en las abejas sin aguijón sería desarrollando nuevos experimentos como por ejemplo de elección de alimento en un contexto operante. En ese contexto en el que los individuos pueden moverse con mayor libertad observamos que las abejas *T. angustula* pueden sesgar sus preferencias alimenticias basándose en la información adquirida durante viajes de recolección previos. Este hecho establece que las abejas de esta especie, si bien a priori no muestran un buen desempeño en el condicionamiento REP, sí son capaces de establecer memorias olfativas. Este tipo de procedimientos serían útiles como aproximación al uso de información olfativa durante la recolección de recursos.

#### *Efecto de la OA en el aprendizaje asociativo*

La administración de OA por vía oral a las abejas *M. scutellaris* permitió registrar aumentos significativos en su sensibilidad al azúcar. Durante el condicionamiento diferencial, si bien observamos cierta tendencia de las abejas tratadas con OA a presentar mayor proporción de respuestas REP, no observamos una diferencia significativa en su discriminación comparada con la de los individuos control. Sin embargo pudimos observar que el grupo de abejas que habían ingerido OA presentaron una clara retención del aprendizaje al mantener el nivel de respuesta adquirido durante el condicionamiento en la etapa de evaluación, 15 minutos más tarde. En ese sentido la OA podría estar facilitando la formación de una memoria de corto término más estable que en las abejas sin tratar que no muestran este tipo de memorias. Esta influencia de la OA en el establecimiento de memorias está en sintonía a lo encontrado en abejas melíferas (Farooqui *et al.*, 2003). Si bien nuestros resultados no son conclusivos respecto al efecto de la OA como facilitadora del aprendizaje asociativo en las abejas *M. scutellaris*, la disminución de su URA y la facilitación de la memoria de corto término observada en la retención de lo aprendido en el condicionamiento parecieran apuntar en esa dirección.

#### *Efecto del contacto con alimento aromatizado dentro de la colmena*

En los experimentos con las abejas *T. angustula* sólo observamos niveles significativos de discriminación en el protocolo REP al aromatizar el alimento colocado dentro de la colmena.

Este hecho nos sugiere que las experiencias olfativas previas en un contexto social pueden ayudar a las abejas *T. angustula* a resolver la tarea de discriminación en el contexto REP. Al plantear un experimento similar con las abejas *M. quadrifasciata*, se observó que la circulación de alimento aromatizado dentro de la colmena mejoró el desempeño de las abejas en el condicionamiento REP. Los aumentos en la discriminación como efecto de los estímulos olfativos previos fueron específicos para el olor expuesto. Esto nos permite plantear la hipótesis de que el efecto de la estimulación con alimento aromatizado permitió el establecimiento de un aprendizaje asociativo específico con ese olor.

#### *Transferencia de información/alimento dentro de la colmena*

Tanto las abejas *T. angustula* como *M. quadrifasciata* mostraron cambios en sus dinámicas de aprendizaje luego del contacto con alimento aromatizado dentro del nido. Este hecho estaría indicando que estas especies de abejas son capaces de procesos de transferencia de información entre diferentes contextos: lo aprendido dentro de la colmena puede ser posteriormente evocado en el paradigma REP. Sin embargo el uso que pudieran hacer durante la recolección de recursos de esa información; es decir, si pueden sesgar sus elecciones alimenticias como fue visto en las abejas melíferas (von Frisch, 1967; Wenner *et al.*, 1969; Arenas *et al.*, 2007) o en los abejorros (Dornhaus y Chittka, 1999), no resulta claro. Por lo menos para las abejas *T. angustula* la circulación de alimento aromatizado dentro de la colmena no provocó sesgos significativos en sus elecciones entre alimentadores. Experiencias similares con las abejas *M. quadrifasciata* podrían ayudar a resolver esa pregunta.

#### *Efecto de la presencia de olor en el alimento transferido durante interacciones sociales*

En una primera aproximación evaluamos si las abejas *M. quadrifasciata* al ser reclutadas a una fuente de alimento aromatizada mostraban modificaciones de su dinámica de aprendizaje en el protocolo REP. Si bien no podemos asegurar que ocurrieron contactos trofalácticos durante el reclutamiento porque no hicimos observaciones dentro de la colmena, resulta claro que los individuos que fueron reclutados a una solución aromatizada mostraron mejores desempeños en el condicionamiento (bien con mayores niveles finales de discriminación o aprendiendo la discriminación más rápido). Este hecho nos da la pauta de que existió transferencia de información olfativa durante el reclutamiento y que las abejas *M. quadrifasciata* son capaces de evocar luego esa información en el paradigma REP.

En un experimento mas especifico, analizamos el desempeño en el condicionamiento REP de abejas que habían sido capturadas luego de un único contacto trofaláctico. En esta situación sin embargo no evidenciamos diferencias entre el grupo de las abejas que recibieron solución sin aromatizar y el de las que recibieron solución con olor. Las abejas *M. quadrifasciata* presentan un desempeño relativamente bajo en el protocolo REP por lo que este contexto podría no ser el más indicado para evidenciar los efectos del contacto con el olor en la trofalaxia. También es posible que las abejas de esta especie necesiten mas de un contacto trofaláctico para aprender el olor del alimento transferido. Hasta la fecha no se conocen descripciones de la cantidad de contactos trofalácticos que ocurren cuando una abeja recolectora *M. quadrifasciata* retorna a la colmena, ni si dicha cantidad cambia con la presencia de olores en la solución.

Un efecto muy claro de la presencia de olor durante la trofalaxia fue el aumento de las vibraciones emitidas durante la misma cuando la solución transferida estaba aromatizada. El agregado de un olor a la solución azucarada también podría ser considerado como un aumento en la intensidad del estímulo excitatorio, que a su vez podría generar un estado de activación generalizada y como consecuencia provocar un aumento en la producción de vibraciones.

#### *Efecto de las vibraciones recibidas durante la trofalaxia en el aprendizaje*

Durante una interaccion trofaláctica convergen estímulos de varias modalidades sensoriales en las abejas *M. quadrifasciata* como información quimiosensorial, táctil y vibratoria (Hrnair *et al.*, 2004b). El agregado de olor al alimento promovió un incremento de las vibraciones producidas por el individuo dador. Esto parece tener un efecto sobre la adquisición de la información olfativa durante la transferencia, dado que cuando el alimento transferido no presentó un olor floral determinado, el desempeño en el condicionamiento no mostró ningún vínculo con la experiencia previa en término de las vibraciones recibidas durante la trofalaxia. En cambio en la situación en que el alimento transferido estaba aromatizado, la modulación de los niveles de vibración de la abeja dadora mejoró el establecimiento del vínculo olor-recompensa. Una explicación posible sería que las vibraciones podrían haber (i) generado cambios de corta duración en el estado de activación (arousal) de la abeja receptora durante la trofalaxia o (ii) un mayor nivel de atención selectiva hacia la clave olfativa asociada al alimento situación que pudo haber facilitado el establecimiento de la contingencia.

#### *Las abejas Meliponas como nuevo modelo de estudio*

El objetivo general de este trabajo de tesis fue realizar estudios de aprendizaje individual y social utilizando diferentes especies de abejas sociales nativas, tomando como marco de referencia lo conocido hasta la fecha en la abeja melífera. Esta última ha resultado un modelo de estudio extremadamente provechoso en muchos aspectos y particularmente en lo que concierne a temáticas de aprendizaje y comunicación. Al igual que otros modelos de invertebrados, estas abejas presentan sistemas nerviosos relativamente simples que permiten la búsqueda de sustratos neuronales para procesos cognitivos (Giurfa, 2007). Al ser insectos con alta sociabilidad presentan un tipo de organización sumamente compleja que se reflejan en el repertorio de comportamientos utilizadas así como en sus canales de comunicación. Si bien hace aproximadamente cincuenta años (Lindauer y Kerr, 1958) comenzaron las descripciones de la capacidad de comunicación de las abejas melíponas, es solo recientemente que han ido ganando importancia los estudios de las mismas. La gran diversidad de comportamientos de recolección y comunicación que presentan estas casi 400 especies de abejas sociales las posicionan como candidatos ideales para la realización de estudios comparados. La incorporación de estas abejas como modelos de estudio de procesos de aprendizaje, aun los que incluyen la mediación de un congénere (aprendizaje social), permite poner a prueba teorías sobre la fisiología del aprendizaje en insectos. Además abre la posibilidad de abordar cuestiones en un marco ecológico de interacción entre especies emparentadas y de cuestiones evolutivas como surgimiento de estrategias de comunicación de alta complejidad como es la danza de reclutamiento de las abejas melíferas (Kerr 1960). En lo que respecta a estudios de comunicación las abejas melíponas permiten también el estudio de cuestiones relacionadas con la integración de información de diferentes modalidades sensoriales y así evaluar la influencia de procesos plásticos como el aprendizaje en el modulado de dichas vías de comunicación. El establecimiento del protocolo de aprendizaje olfativo utilizando la REP en las abejas sin aguijón permitió un abordaje inicial bajo condiciones controladas de este tipo de preguntas.

## Referencias

- Abramson CI, Aquino IS (2002) Behavioral studies of learning in the Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.). *Brain Behav Evol* 59:68-86.
- Abramson CI, Aquino IS, Maurizete CS, Price JM (1997) Learning in the Africanized Honey Bee: *Apis mellifera* L. *Physiol & Behav* 3:657-674.
- Abramson CI, Aquino IS, Stone SM (1999) Failure to find proboscis conditioning in one-day old africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) and in adult urucu honey bees (*Melipona scutellaris*). *Int J Comp Psychol* 12:242-262.
- Afik O, Dag A, Shafir S (2008) Honeybee, *Apis mellifera*, round dance is influenced by trace components of floral nectar. *Animal Behaviour* 75:371-377.
- Aguilar I (2004) Communication and recruitment for the collection of food in stingless bees: a behavioral approach, dissertation. PhD- dissertation, Utrecht University..
- Aguilar I, Briceño D (2002) Sounds in *Melipona costaricensis* (Apidae: Meliponini): effect of sugar concentration and nectar source distance. *Apidologie* 33:375-388.
- Aguilar I, Fonseca A, Beismeyer C (2005) Recruitment and communication of food source location in three species of stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Apidologie* 36: 313-324.
- Arenas A, Farina WM (2008) Age and rearing environment interact in the retention of early olfactory memories in honeybees. *J. Comp. Physiol. A* 194:629-640.
- Arenas A, Fernández VM, Farina WM (2007) Floral odor learning within the hive affects honeybees' foraging decisions. *Naturwissenschaften* 94: 218-222.
- Balsam, PD (1985) The function of context in learning and performances. In: *Context and Learning* (Ed by PD Balsam and A Tomie), pp. 1–22. L Erlbaum, New Jersey.
- Barron AB, Maleszka J, Vander Meer RK, Robinson GE, Maleszka R (2007) Comparing injection, feeding and topical application methods for treatment of honeybees with octopamine. *Journal of insect physiology* 53:187-94.
- Barron AB, Schulz DJ, Robinson GE (2002) Octopamine modulates responsiveness to foraging-related stimuli in honey bees (*Apis mellifera*). *J Comp Physiol A* 188:603-610.
- Barth FG, Hrncir M, Jarau S (2008) Signals and cues in the recruitment behavior of stingless bees (Meliponini). *J Comp Physiol A* 194: 313-327.
- Bhagavan S, Smith BH (1997) Olfactory conditioning in the honey bee, *Apis mellifera*: Effects of odor intensity *Physiology and Behavior* 61:107-117.
- Biesmeijer JC, Emmers MC (1999) Social foraging in stingless bees: how colonies of *Melipona fasciata* choose among nectar sources. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 46:129-140.
- Biesmeijer JC, Slaa EJ (2004) Information flow and organization of stingless bee foraging. *Apidologie* 35: 143–157.
- Biesmeijer JC, Slaa JE (2006) The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. *Apidologie* 37:240-258.
- Biesmeijer JC, van Nieuwstadt MGL, Lukacs S, Sommeijer MJ (1998) The role of internal and external information in foraging decisions of *Melipona* workers (Hymenoptera: Meliponinae) *Behav Ecol Sociobiol* 42:107-116.
- Bitterman ME (1988) Vertebrate-invertebrate comparisons. *NATO ASI Series-Intell. Evol Biol* 17:251-275.
- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A, Schäfer S (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*) *J Comp Psychol* 97:107-19.
- Blatt J, Roces F (2001) HAEMOLYMPH SUGAR LEVELS IN FORAGING HONEYBEES ( *APIS MELLIFERA CARNICA* ): DEPENDENCE ON METABOLIC RATE AND IN VIVO MEASUREMENT OF MAXIMAL RATES OF TREHALOSE SYNTHESIS. *The Journal of Experimental Biology* 204:2709-2716.
- Bouton ME, Moody EW (2004) Memory processes in classical conditioning.(Special issue: Neurobiology of Cognition in Laboratory Animals: Challenges and Opportunities) *Neurosci Biobehav Rev* 28:663-674.
- Brandes C, Frisch B, Menzel R (1988) Timecourse of memory formation differs in honey bee lines selected for good and poor learning. *Anim Behav* 36:981-985.
- Camargo JMF, Pedro SRM (1992) Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie* 23:509-522.
- Cao TT, Hyland KM, Malechuk A, Lewis LA, Schneider SS (2007) The influence of the vibration signal on

- worker interactions with the nest and nest mates in established and newly founded colonies of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insectes Sociaux* 54:144-149.
- Carew TJ (2000) *Behavioral Neurobiology: the cellular organization of natural behavior*. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Chaffiol A, Laloï D, Pham-Delègue M (2005) Prior classical olfactory conditioning improves odour-cued flight orientation of honey bees in a wind tunnel. *J Exp Biol* 208:3731-3737.
- Chandra SBC, Hosler JS, Smith BH (2000) Heritable variation for latent inhibition and its correlation with reversal learning in Honeybees (*Apis mellifera*) *J Comp Psychol* 114: 86-97.
- Chittka L, Thomson JD, Waser NM (1999) Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften* 86:361-377.
- Cnaani J, Schmidt JO, Papaj DR (2003) The effect of octopamine on behavioral responses of free-foraging bumblebees to a change in food source profitability. *Naturwissenschaften* 90:185-8.
- Couvillon PA, Arakaki L, Bitterman ME (1997) Intramodal blocking in honeybees. *Anim. Learn. Behav.* 25:277-282.
- Dall SRX, Giraldeau LA, Olsson O, McNamara JM, Stephens DW (2005) Information and its use by animals in evolutionary ecology. *TREE* 20:187-193.
- Danchin E, Giraldeau LA, Valone TJ, Wagner RH (2004) Public Information: From Nosy neighbors to Cultural Evolution. *Science* 305:487-491.
- Davis M (1974) Sensitization of the rat startle response by noise. *Journal of Comparative Physiology and Psychology* 87:571-581.
- De Marco R, Farina WM (2003) Trophallaxis in forager honeybees (*Apis mellifera*): resource uncertainty enhances begging contacts? *J Comp Physiol A* 189:125-134.
- Dethier VG, Solomon RL, Turner LH (1965) Sensory input and central excitation and inhibition in the blow fly. *Journal of Comparative Physiology and Psychology* 60:303-313.
- Dornhaus A, Chittka L (1999) Evolutionary origins of bee dances. *Nature* 401: 38.
- Dornhaus A, Chittka L (2005) Bumble bees store both food and information in honeypots. *Behav Ecol* 16: 661-666.
- Dudai Y (1989) *The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends*. New York: Oxford Univ. Press.
- Erber J, Hoormann J, Scheiner R (2006) Phototactic behaviour correlates with gustatory responsiveness in honey bees (*Apis mellifera* L.) *Behav Brain Res* 174:174-180.
- 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.
- Esch H (1963) Über die Auswirkung der Futterplatzqualität auf die Schallerzeugung im Werbetanz der Honigbiene (*Apis mellifica*) *Zoolog Anzeiger (Suppl. 26)*: 302-309.
- Esch H (1967a) The evolution of the bee language. *Scientific American*, 216: 96-104.
- Esch H, Esch I, Kerr WE (1965) Sound: an element common to communication of stingless bees and to dances of the honeybee. *Science* 149:320-321.
- Farina WM (1996) Food-exchange by foragers in the hive - a means of communication among honey bees? *Behav Ecol Sociobiol* 38: 59-64.
- Farina WM, Grüter C (2009) Trophallaxis: a mechanism of information transfer. In *Food exploitation by social insects: Ecological, behavioral, and theoretical approaches* (Jarau, S. and Hrcir, M., eds.), pp. 173-187, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Farina WM, Grüter C, Acosta LE, Mc Cabe SI (2007) Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive. *Naturwissenschaften* 94: 55-60.
- Farina WM, Grüter C, Díaz PC (2005) Social learning of floral odours inside the honeybee hive. *Proc R Soc B* 272:1923-1928.
- Farooqui T, Robinson K, Vaessin H, Smith BH (2003) Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *The journal of Neuroscience* 23:5370-5380.
- Fernández VM, Arenas A, Farina WM (2009) Volatile exposure within the honeybee hive and its effect on olfactory discrimination. *J Comp Physiol A* 95: 759-68.
- Ferreira Grosso A, Bego LR (2002) Labor division, average life span, survival curve, and nest architecture of *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) *Sociobiology* 40:615-637.
- Free JB (1969) Influence of the odour of a honeybee colony's food stores on the behaviour of its foragers. *Nature* 222:778.

- Frings H (1944) The loci of olfactory end-organs in the honeybee, *Apis mellifera* Linn. *J Exp Zool* 97: 123-134.
- Frisch K von (1914) Der Farbensinn und Formensinn der Biene. *Zool Jahrb Phys* 37:1-238.
- Frisch K von (1967) *The Dance Language and Orientation of Bees*. Harvard University Press, Cambridge.
- 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.
- Gerber B, Stocker RF (2007) The *Drosophila* Larva as a Model for Studying Chemosensation and Chemosensory Learning : A Review. *Chemical senses*, 65-89.
- Gil M, De Marco RJ (2005) Olfactory learning by means of trophallaxis in *Apis mellifera*. *J Exp Biol* 208: 671-680.
- Giurfa M (1996) Movement patterns of honeybee foragers: motivation and decision rules dependent on the rate of reward. *Behaviour* 133:579-596.
- Giurfa M (2003) Cognitive neuroethology: Dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr Opin Neurobiol* 13:726-735.
- Giurfa M (2006) Associative Learning: The instructive Function of Biogenic Amines. *Current biology* 16:892-895.
- Giurfa M (2007) Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J Comp Physiol A* 193:801-824.
- Giurfa M, Zhang S, Jenett A, Menzel R, Srinivasan MV (2001) The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. *Nature* 410:930-3.
- Goyret J, Farina WM (2003) Descriptive study of the antennation during unloading by forager honeybees. *Insectes Sociaux* 50:274-278.
- Goyret J, Farina WM (2005) Trophallactic chains in honeybees: a quantitative approach of the nectar circulation amongst workers. *Apidologie* 36:595-600.
- Greggers U, Menzel R (1993) Memory dynamics and foraging strategies of honeybees. *Behavioral ecology and Sociobiology* 32:17-29.
- Groves PM, Lee D, Thompson RF (1969) Effects of stimulus frequency and intensity on habituation and sensitization in acute spinal cat. *Physiology and Behavior* 4: 383-388.
- Grüter C, Acosta LE, Farina WM (2006) Propagation of olfactory information within the honeybee hive. *Behav Ecol Sociobiol* 60:707-715.
- Grüter C, Balbuena MS, Farina WM (2008) Informational conflicts created by the waggle dance. *Proc R Soc B* 275:1321-1327.
- Guerrieri F, Schubert M, Sandoz JC, Giurfa M (2005) Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol* 3: e60.
- Hall M, Halliday T (1998) *Behaviour and evolution*. In: *Biology: Brain and behaviour series*. Springer, Berlin.
- Hammer M (1993) An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366:59-63.
- Hammer M (1997) The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci* 20:245-252.
- Hammer M, Braun G, Mauelshagen J (1994) Food-induced arousal and nonassociative learning in honeybees: Dependence of sensitization on the application site and duration of food stimulation. *Behavioral and Neural Biology* 62:210-223.
- Hammer M, Menzel R (1995) Learning and memory in the honeybee. *J. Neurosci.* 15:1617-1630.
- 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.
- Harrison JF, Fewell JH, Anderson KE, Loper GM (2006) Environmental physiology of the invasion of the Americas by Africanized honeybees. *Integrative and Comparative Biology* 46:1110-1122.
- Heyes CM (1994) Social Learning in Animals: Categories and mechanisms. *Biol Rev* 69: 207-231.
- Hrnčir M, Barth FG, Tautz J (2006b) Vibratory and Airborne-Sound Signals in Bee communication (Hymenoptera) In *Insect sounds and communication. Physiology, Behaviour, Ecology and Evolution*. Edited by S Drosopoulous and MF Claridge. CRC Press.
- Hrnčir M, Gravel A, Schorkopf DL, Schmidt VM, Zucchi R, Barth F G (2008a) Thoracic vibrations in stingless bees (*Melipona seminigra*): resonances of the thorax influence vibrations associated with



- flight but not those associated with sound production. *The Journal of experimental biology* 211:678-85.
- Hrnčir M, Jarau S, Zucchi R, Barth FG (2000) Recruitment behavior in stingless bees, *Melipona scutellaris* and *M. quadrifasciata*. II. Possible mechanisms of communication. *Apidologie* 31:93-113.
- Hrnčir M, Jarau S, Zucchi R, Barth FG (2004a) Thorax vibrations of a stingless bee (*Melipona seminigra*) I. No influence of visual flow. *J Comp Physiol A* 190: 539–548.
- Hrnčir M, Jarau S, Zucchi R, Barth FG (2004b) Thorax vibrations of a stingless bee (*Melipona seminigra*) II. Dependence on sugar concentration. *J Comp Physiol A* 190:549-560.
- Hrnčir M, Schmidt VM, Schorkopf DL, Jarau S, Zucchi R, Barth FG (2006a) Vibrating the food receivers: a direct way of signal transmission in stingless bees (*Melipona seminigra*) *Journal of Comparative Physiology A* 192:879-887.
- Hrnčir M, Schorkopf DL, Schmidt VM, Zucchi R, Barth FG (2008b) The sound field generated by tethered stingless bees (*Melipona scutellaris*): inferences on its potential as a recruitment mechanism inside the hive. *The Journal of Experimental Biology* 211:686-698.
- Huber R (2005) Amines and motivated behaviors: a simpler systems approach to complex behavioral phenomena. *Journal of Comparative Physiology A* 191:231-239.
- Jandt JM, Jeanne RL (2005) German Yellowjacket (*Vespula germanica*) Foragers use odors inside the nest to find carbohydrate food sources. *Ethology* 111:641-651.
- Jarau S, Hrncir M, Schmidt VM, Zucchi R, Barth FG (2003) Effectiveness of recruitment behavior in stingless bees (*Apidae*, *Meliponini*) *Insectes Sociaux* 50:365-374.
- Jarau S, Hrncir M, Zucchi R, Barth FG (2000) Recruitment behavior in stingless bees, *Melipona scutellaris* and *M. quadrifasciata*. I. Foraging at food sources differing in direction and distance. *Apidologie* 31:81-91.
- Johnson LK (1983) Foraging strategies and the structure of stingless bee communities in Costa Rica, in: Jaisson P. (Ed.), *Social insects in the tropics*, Vol. 2, Paris, Univ. Paris Nord, pp. 31–58.
- Johnson LK (1987) Communication of food source location by the stingless bee *Trigona fulviventris*, in: Eder J., Rembold H. (Eds.), *Chemistry and biology of social insects*, Verlag J. Peperny, München, pp. 698-699.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1992) *Principles of neural science*. New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier.
- Kerr WE (1960) Evolution of the communication in bees and its role in speciation. *Evolution* 14:386-387.
- Kerr WE (1969) Some aspects of the evolution of social bees. *Evol Biol* 3: 119-175.
- Kerr WE (1994) Communication among *Melipona* workers (Hymenoptera: Apidae), *J. Insect Behav.* 7:123-128.
- Klosterhalfen S, Fischer W, Bitterman ME (1978) Modification of Attention in Honey Bees. *Science* 201:1241-1243.
- Knudsen JT, Tollsten L, Bergström LG (1993) Floral scents. A checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* 33:253-280.
- Krasne FB, Glanzman DL (1986) Sensitization of the crayfish lateral giant escape reaction. *J. Neurosci.* 6:1013-1020.
- Kreissl S, Eichmüller S, Bicker G, Rapus J, Eckert M (1994) Octopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology* 348:583-595.
- Kuwabara M (1957) Bildung des bedingten ReXexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, *Apis mellifera*. *J Fac Hokkaido Univ Serv VI Zool* 13:458-464.
- Laloi D, Pham-Delegue MH (2004) Bumble bees show asymmetrical discrimination between two odors in a classical conditioning procedure. *J Insect Behav* 17: 385-396.
- Laloi D, Sandoz JC, Picard-Nizou AL, Pham-Delègue MH (1999) Olfactory conditioning of the proboscis extension reflex in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Ann Soc Entomol France* 35: 154-158.
- Leadbeater E, Chittka L (2007) *Social Learning in Insects — From Miniature Brains to Consensus Building*. *Curr Biol* 17: 703-713.
- Lindauer M (1948) Über die Einwirkung von Duft- und Geschmacksstoffen sowie anderer Faktoren auf die Tänze der Bienen. *Z vergl Physiol* 31:348-412.
- Lindauer M (1956) Über die Verständigung bei indischen Bienen. *Z vergl Physiol* 38: 521-557.
- Lindauer M (1963) *Allgemeine Sinnesphysiologie. Orientierung im Raum*. *Fortschr Zool* 16:58-140.

- Lindauer M, Kerr WE (1958) Die gegenseitige Verständigung bei den stachellosen Bienen. *Z Vergl Physiol* 41:405-434.
- Lunney GH (1970) Using analysis of variance with dichotomous dependent variable: an empirical study. *Jour Educ measurement* 7: 263-269.
- Mackintosh NJ (1994) *Animal learning and cognition*. Academic Press, London, UK.
- Marcus EA, Nolen TG, Rankin CH, Carew TJ (1988) Behavioral dissociation of dishabituation, sensitization, and inhibition of *Aplysia*. *Science* 241: 210-213.
- Martínez A, Farina WM (2008) Honeybees modify gustatory responsiveness after receiving nectar from foragers within the hive. *Behav Ecol Sociobiol* 62:529-535.
- Mauelshagen J, Greggers U (1993) Experimental access to associative learning in honeybees. *Apidologie* 249-266.
- Mc Cabe S, Farina WM, Josens RB (2006) Antennation of nectarreceivers encodes colony needs and food-source profitability in the ant *Camponotus mus*. *Insect. Soc.* 53: 356-361.
- Menzel R (1984) Short-term memory in bees. In D.L. Alkon and I. Farley (eds): *Primary neural substrates of learning and behavioral change*. Cambridge: Cambridge Univ.Press.
- Menzel R (1990) Learning, memory and cognition in honey bees. *Neurobiology of Comparative Cognition*. Erlbaum Inc, Hillsdale, NJ, 237-292.
- Menzel R (1992) Invertebrate learning: associative learning in bees. In L.R. Squire (ed): *Encyclopedia of learning and memory*. New York, Toronto: Macmillan Publishing company.
- Menzel R (1993) Associative learning in honey bees. *Apidologie* 24: 157-168.
- Menzel R (1999) Memory dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A* 185: 323-340.
- Menzel R, Erber J, Masuhr T (1974) Learning and memory in the honeybee. *Experimental Analysis of Insect Behaviour*, 195-217.
- Menzel R, Giurfa M (2001) Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends in Cognitive Sciences* 5:62-71.
- Menzel R, Greggers U (1992) Temporal dynamics and foraging behaviour in honeybees. In J. Billen (ed): *Biology and Evolution of Social Insects*. Leuven: Leuven University Press.
- Menzel R, Müller U (1996) Learning and memory in honeybees: From behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci* 19:379-404.
- Mercer AR, Menzel R (1982) The effects of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honeybee, *Apis mellifera*. *J.Comp.Physiol.* 145:363-368.
- Michelsen A (2003) Signals and flexibility in the dance communication of honeybees. *Journal Of Comparative Physiology A* 189:165-174.
- Michener CD (1969) Comparative social behavior of bees. *Ann Rev Ent* 14: 299-342.
- Michener CD (2000) *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore London.
- Molet M, Chittka L, Raine NE (2009) How floral odours are learned inside the bumblebee (*Bombus terrestris*) nest. *Naturwissenschaften* 96:213-219.
- Moore J (2001) *A neuroscientist's guide to classical conditioning*. Springer.
- Moure JS (2008) Moure's bee catalogue. <http://moure.cria.org.br/index>
- Nieh JC (1998a) The role of a scent beacon in the communication of food location by the stingless bee, *Melipona panamica*. *Behav Ecol Sociobiol* 43:47-58.
- Nieh JC (1998b) The food recruitment dance of the stingless bee, *Melipona panamica*. *Behav Ecol Sociobiol* 43:133-145.
- Nieh JC (2004) Recruitment communication in stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) *Apidologie* 35:159-182.
- Nieh JC, Contrera FA, Nogueira-neto P (2003) Pulsed mass recruitment by a stingless bee , *Trigona hyalinata*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 2191-2196.
- Nieh JC, Contrera FAL, Rangel J, Imperatriz-Fonseca VL (2003) Effect of food location and quality on recruitment sounds and success in two stingless bees, *Melipona mandacaia* and *Melipona bicolor*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55: 87-94.
- Nieh JC, Roubick DW (1998) Potential mechanisms for the communication of height and distance by a stingless bee , *Melipona panamica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 387-399.
- Page RE, Erber J (2002) Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften* 89:91-106.

- Page RE, Erber J, Fondrk MK (1998) The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.) *J Comp Physiol A* 182:489-500.
- Pankiw T, Nelson M, Page RE, Fondrk MK (2004) The communal crop: modulation of sucrose response thresholds of pre-foraging honey bees with incoming nectar quality. *Behav Ecol Sociobiol* 55:286-292.
- Pankiw T, Page RE (1999) The effects of genotype, age, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees. *J Comp Physiol A* 185:207-213.
- Pankiw T, Page RE (2000) Response threshold to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. *Behav Ecol Sociobiol* 47:265-267.
- Pankiw T, Page RE (2003) Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.) *Journal of comparative physiology. A*, 189: 675-84.
- Pankiw T, Waddington KD, Page RE (2001) Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera* L.): influence of genotype, feeding, and foraging experience. *J. Comp. Physiol. A* 187: 293-301.
- Partan S, Marler P (2008) Communication Goes Multimodal. *Science* 283:1272-1273.
- Pavlov IP (1927) *Lectures on conditioned reflexes*. International publishers, New York.
- Pessotti I (1981) Aprendizagem Em Abelhas Vi:Discriminacao Condicional Em *Melipona Rufi-Ventris*. *Revista de Psicologia Normal e Patológica*, v. 41, n. 4, p. 681-693.
- Pessotti I, Gomes MJ (1981) Aprendizagem Em Abelhas Iii-Discriminacao Com Tres Tipos de Estimulos Visuais. *REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA*, v. 41, n. 3, p. 667-672.
- Pessotti I, Sénéchal AM (1981) Aprendizagem em abelhas. I – Discriminação simples em onze espécies. *Acta Amazonica* 11: 653-658.
- Pinsker H, Hening W, Carew TJ, Kandel ER (1973) Long-term sensitization of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 182: 1039.
- Provecho Y, Josens R (2009) Olfactory memory established during trophallaxis affects food search behaviour in ants. *Journal of Experimental Biology* 3221-3227.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC (2004) *Neuroscience*. Fourth edition. Published by Sinauer Associates, Inc.
- Ramírez G, Martínez A, Fernández V, Corti Bielsa G, Farina WM (2010) The influence of honeybee gustatory responsiveness on in-hive social interactions. *PLoS ONE* 5(10): e13498. doi:10.1371/journal.pone.0013498
- Rescorla RA (1988) Pavlovian conditioning: It's not what you think it is. *American Psychologist*, 43, 151-160.
- Rescorla RA, Durlach PJ, Grau JW (1985) Context learning in Pavlovian conditioning. In: *Context and Learning* (Ed by PD Balsam and A Tomie), pp. 23–56. L Erlbaum, New Jersey.
- Rescorla RA, Wagner AR (1972) A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement, *Classical Conditioning II*, A. H. Black and W. F. Prokasy, Eds.
- Roces F (1990) Olfactory conditioning during the recruitment process in leaf-cutting ants. *Oecol* 83:261-262.
- Roeder T (1999) Octopamine in Invertebrates. *Progress in Neurobiology* 59:533-561.
- Roubik DW (1978) Competitive interactions between Africanized honeybees and native neotropical pollinators. *Science* 201:1030-1032.
- Roubik DW (1992) *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. Cambridge University press, New York.
- Sandoz JC, Laloï D, Odoux JF, Pham-Delègue MH (2000) Olfactory information transfer in the honeybee: Compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Anim Behav* 59: 1025-1034.
- Sandoz JC, Pham-Delègue MH, Renou M, Wadhams LJ (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 JC, Roger B, Pham-Delègue MH (1995) Olfactory learning and memory in the honeybee: comparison of different classical conditioning procedures of the proboscis extension response. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Sciences de la Vie* 318:749-755.
- Schacter DL, Buckner RL (1998) Priming and the brain. *Neuron* 20:185-195.
- Scheiner R, Barnert M, Erber J (2003) Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bees. *Apidologie* 34:67-72.

- Scheiner R, Baumann A, Blenau W (2006) Aminergic control and Modulation of Honeybee behaviour. *Current Neuropharmacology* 4:259-276.
- Scheiner R, Erber J, Page RE (1999) Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.) *Journal of Comparative Physiology A* 185:1-10.
- Scheiner R, Page RE, Erber J (2001a) Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains. *Behav. Brain Res.* 120: 67-73.
- Scheiner R, Page RE, Erber J (2001b) 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.
- Scheiner R, Page RE, Erber J (2004) Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*) *Apidologie* 35: 133–142.
- Scheiner R, Plückhahn S, Oney B, Blenau W, Erber J (2002) Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Behavioural brain research* 136:545-53.
- Schilman PE, Roces F (2008) Haemolymph sugar levels in a nectar-feeding ant: dependence on metabolic expenditure and carbohydrate deprivation. *Journal of comparative physiology B* 178:157-65.
- Schmidt VM, Zucchi R, Barth FG (2003) A stingless bee marks the feeding site in addition to the scent path (*Scaptotrigona aff. deplis*) *Apidologie* 34:237-248.
- Schmidt VM, Zucchi R, Barth FG (2005) Scent marks left by *Nannotrigona testaceicornis* at the feeding site : cues rather than signals. *Apidologie* 36:285-291.
- Schneider SS, Lewis LA (2004) The vibration signal, modulatory communication and the organization of labor in honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie* 35: 117-131.
- Schorkopf DLP, Jarau S, Francke W, Twele R, Zucchi R, Hrncir M, Schmidt VM, Ayasse M, Barth FG (2007) Spitting out information: *Trigona* bees deposit saliva to signal resource locations. *Proc R Soc B* 274:895-898.
- Schroll C, Riemensperger T, Bucher D, Ehmer J, Voller T, Erbguth K, Gerber B, Hendel T, Nagel G, Buchner E, Fiala A (2006) Light-Induced Activation of Distinct Modulatory Neurons Triggers Appetitive or Aversive Learning in *Drosophila* Larvae. *Current Biology* 16:1741-1747.
- Schröter U, Malun D, Menzel R (2006) Innervation pattern of suboesophageal ventral unpaired median neurones in the honeybee brain. *Cell and tissue research* 327, 647-67.
- Schulz DJ, Robinson GE (2001) Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *Journal Of Comparative Physiology A* 53-61.
- Schwarz HF (1938) The stingless bees (*Meliponidae*) of British Guiana and some related form. *Bull Am Museum Nat History Vol LXXIV, art. VII: 437-508.*
- Sheppard WS (1989) A history of the introduction of honey bee races into the United States: Part I. *Am. Bee J.* 129: 617-619.
- Silva CM, Hrncir M, Farina WM (2008) Influencia do fluxo alimentar nos sinais de recrutamento (dança e vibrações torácicas) em *Apis mellifera*. *Riberao Preto, Brasil. Resumen. Congreso. VIII Encontro sobre abelhas.*
- Skinner BF (1938) *The behavior of organisms.* Appleton, New York.
- Slaa EJ, Sanchez Chaves LA, Malagodi-Braga K, Hofstede F (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* 37:293-315.
- Slaa EJ, Tack AJM, Sommeijer MJ (2003a) The effect of intrinsic and extrinsic factors on flower constancy in stingless bees *Apidologie* 34:457-468.
- Slaa EJ, Wassenberg J, Beismeyer JC (2003b) The use of field-based social information in eusocial foragers: local enhancement among nestmates and heterospecifics in stingless bees. *Ecol Entomol* 28: 369-379.
- Smith BH (1991) The Olfactory Memory of the Honeybee. *Journal of experimental Biology* 382:367-382.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.* 3rd ed. W. H. Freeman and Co, New York.
- Squierre J, Kandel ER (1999) *Memory: from mind to molecules.* Scientific American Library.
- Takeda K (1961) Classical conditioned response in the honey bee. *J Insect Physiol* 6: 168–179.
- Toda NRT, Song J, Nieh JC (2009) Bumblebees exhibit the memory spacing effect. *Naturwissenschaften* 96: 1185–1191.
- Villa JD, Weiss MR (1990) Observations on the use of visual and olfactory cues by *Trigona* spp foragers. *Apidologie* 21:541-545.

- Waddington KD, Kirchner WH (1992) Acoustical and Behavioral correlates of profitability of food sources in honey bee round dances, *Ethology* 92:1–6.
- Walters ET (1987) Multiple sensory neuronal correlates of site-specific sensitization in *Aplysia*. *Journal of Neuroscience* 7:408-417.
- Wehner R (1981) Spatial vision in arthropods. In *Handbook of Sensory Physiology*, vol. VIc (ed. H. J. Autrum), pp. 287-616. Berlin: Springer
- Wenner AM, Wells PH, Johnson DL (1969) Honey bee recruitment to food sources: Olfaction or language? *Science* 164: 84-86.
- Whitfield, CW, Behura,SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard, WS, Smith DR, Suarez, AV, Weaver D, Tsutsui ND (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* 314: 642-645.
- Wille A (1983) Biology of the stingless bees. *Annu. Rev. Entomol.* 28:41-64.
- Wilms W, Imperatriz-Fonseca VL, Engels W (1996) Resource partitioning between highly eusocial bees and possible impact of the introduced Africanized honey bee on native stingless bees in the Brazilian Atlantic rainforest. *Stud Neotrop Fauna Environ* 31:137-151.
- Wilms W, Wiechers B (1997) Floral resource partitioning between native *Melipona* bees and the introduced Africanized honey bee in the Brazilian Atlantic rainforest. *Apidologie* 28: 339-355.
- Wilson EO (1971) *The insect societies*. Belknap Press of Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts.
- Yáñez-Ordóñez O, Trujano Ortega M, Llorente Bousquets J (2008) Patrones de distribución de las especies de la tribu meliponini (Hymenoptera: Apoidea: Apidae) en México. *Interciencia* 33:41-45.
- Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey.