Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Efecto de agroquímicos sobre el comportamiento de abejas jóvenes (Apis mellifera)

Mengoni Goñalons, Carolina

2017-03-21

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

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

Cita tipo APA:
Mengoni Goñalons, Carolina. (2017-03-21). Efecto de agroquímicos sobre el comportamiento de abejas jóvenes (Apis mellifera). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Mengoni Goñalons, Carolina. "Efecto de agroquímicos sobre el comportamiento de abejas jóvenes (Apis mellifera)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-21.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Efecto de agroquímicos sobre el comportamiento de abejas jóvenes (*Apis mellifera*)

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Carolina Mengoni Goñalons

Director de tesis y consejero de estudios: Dr. Walter M. Farina

Lugar de trabajo: Laboratorio de Insectos Sociales. IFIBYNE-CONICET. DBBE-FCEN-UBA.

Ciudad de Buenos Aires
Fecha de defensa: 21 de marzo de 2017

Efecto de agroquímicos sobre el comportamiento de abejas jóvenes (*Apis mellifera*)

Resumen

Los neonicotinoides son los insecticidas más utilizados globalmente en la agricultura, preferidos por su baja toxicidad para mamíferos y su actividad sistémica. El imidacloprid (IMI) es uno de los compuestos de esta familia y es conocido por tener efectos adversos sobre la abeja *Apis mellifera*, uno de los principales agentes polinizadores del sistema agrícola y que puede ser utilizada como bioindicador mediante el estudio de efectos subletales. Al estar presente en el polen y néctar, el IMI puede ser recolectado e ingresado por las abejas a la colmena. No obstante, se desconoce cómo el alimento contaminado afecta el comportamiento de abejas jóvenes. Estas abejas presentan una alta plasticidad, que se manifiesta no sólo en los cambios estructurales que ocurren en su sistema nervioso durante los primeros días de vida adulta, sino también en su capacidad de modular su fisiología y comportamiento de acuerdo con los requerimientos de la colonia. Por todo esto, este grupo es susceptible a estímulos que pueden modular su comportamiento y repercutir sobre el estado de la colonia. Dado que en los ecosistemas agrícolas las colmenas se encuentran expuestas a diversos agroquímicos, entre ellos el herbicida glifosato, las abejas jóvenes —que realizan todas sus actividades dentro de la colmena— resultan clave para detectar un efecto de interacción. Por todo esto, se decidió estudiar las consecuencias de la exposición a estos agroquímicos sobre el comportamiento de abejas pre-recolectoras. Por un lado, se evaluó el efecto de la exposición aguda al IMI sobre el comportamiento apetitivo y la percepción olfativa a nivel individual y sobre el comportamiento en un entorno social. Por el otro, se evaluó el efecto de la exposición crónica a ambos agroquímicos en conjunto sobre el comportamiento apetitivo. El IMI afectó negativamente la percepción gustativa y el aprendizaje olfativo, dependiendo de la edad de la abeja y el modo de exposición. El glifosato disminuyó la ingesta de solución de sacarosa durante la crianza y redujo la sensibilidad gustativa, pero no interfirió con el aprendizaje. Los resultados indican una sensibilidad diferencial de acuerdo con la edad. Ambos agroquímicos tuvieron efectos perniciosos sobre el comportamiento apetitivo de las abejas, lo cual podría repercutir en la distribución de alimento, la propagación de información y la coordinación de tareas dentro del nido.

Palabras clave: *Apis mellifera*, edad, imidacloprid, glifosato, aprendizaje, percepción quimiosensorial, interacción.

Effect of agrochemicals on young honey bee behaviour (*Apis mellifera*)

Abstract

Neonicotinoids are the most widespread insecticides in agriculture, preferred for their low toxicity to mammals and their systemic nature. Imidacloprid (IMI) is one of the compounds of this family and is known for its negative effects on the honey bee *Apis mellifera*, one of the most important pollinators in agroecosystems and that can be used as a bioindicator through the study of sublethal effects. Because it is present in pollen and nectar, IMI can be picked up by foragers and taken back to the hive. Nevertheless, we don't know how contaminated food affects the behaviour of young honey bees. These bees present high plasticity that is expressed in post-emergence structural changes in the nervous system and in their ability to modulate their phisiology and behaviour according to colony requirements. For all this, this group is susceptible to stimuli that can modulate their behaviour and impact on colony state. As honey bee hives are exposed to a wide range of agrochemicals in crop ecosystems, young honey bees —who perform all of their tasks inside the hive— are key to deteting any effects of interaction. For all this, we set out to study the consequences of exposing preforaging honey bees to these agrochemicals on their behaviour. On the one hand, we assessed the effect of acute exposure to IMI on individual appetitive behaviour and olfactory perception, and on social behaviour. On the other, we assessed the effect of joint chronic exposure to both agrochemicals on appetitive behaviour. IMI had a negative effect on gustatory perception and olfactory learning, depending on honeybee age and mode of exposure. Glyphosate reduced sucrose uptake during rearing and impaired sucrose responsiveness, but did not interfere with learning. Results indicate differential susceptibility according to honey bee age. Both agrochemicals had adverse effects on different aspects of honey bee appetitive behaviour, which could have repercussions on food distribution, propagation of olfactory information and task coordination within the nest.

Key words: *Apis mellifera*, age, imidacloprid, glyphosate, learning, chemosensory perception, interaction.

Tabla de contenido

Introducción general 1

1.1 Agroquímicos 1

1.2 La abeja *Apis mellifera* 15

1.2.1 Recolección de recursos y polinización 15

1.2.2 Organización de la colonia 19

1.3 Percepción y cognición 23

1.3.1 Percepción olfativa 23

1.3.2 Percepción gustativa 27

1.3.3 Aprendizaje 29

1.3.3.1 Aprendizaje no asociativo 29

1.3.3.2 Aprendizaje asociativo 30

1.4 Objetivos e hipótesis 33

Metodología general 35

2.1 Cría de abejas 35

2.2 Agroquímicos 39

2.3 Aprendizaje 41

2.3.1 Condicionamiento clásico absoluto 44

2.3.2 Condicionamiento clásico diferencial 45

2.4 Percepción gustativa 47

2.5 Detección olfativa 48

2.6 Comportamiento dentro de la colmena 51

Exposición aguda a imidacloprid 54

3.1 Comportamiento apetitivo 57

3.1.1 Introducción 57

3.1.2 Metodología 59

3.1.2.1 Series experimentales 59

3.1.2.2 Variables medidas 61

3.1.2.3 Análisis estadístico 61

3.1.3 Resultados 63

3.1.3.1 Aprendizaje olfativo 63

3.1.3.2 Percepción gustativa 67

3.1.3.3 Mortalidad y capacidad sensomotora 69

3.1.4 Discusión 71

3.2 Detección olfativa 75

3.2.1 Introducción 75

3.2.2 Metodología 79

3.2.2.1 Series experimentales 79

3.2.2.2 Registros electroantenográficos (EAG) 80

3.1.2.3 Análisis estadístico 80

3.2.3 Resultados 81

3.2.4 Discusión 83

3.3 Comportamiento dentro de la colmena 86

3.3.1 Introducción 86

3.3.2 Metodología 88

3.3.2.1 Series experimentales 88

3.3.2.2 Variables medidas 89

3.3.2.3 Análisis estadístico 89

3.3.3 Resultados 91

3.3.4 Discusión 96

Exposición crónica a imidacloprid y glifosato 100

4.1 Introducción 101

4.2 Metodología 103

4.2.1 Series experimentales 103

4.2.2 Variables medidas 104

4.2.3 Análisis estadístico 105

4.3 Resultados 107

4.3.1 Mortalidad e ingesta 107

4.3.2 Percepción gustativa 109

4.3.3 Aprendizaje olfativo 110

4.3.3.1 Condicionamiento absoluto 110

4.3.3.2 Condicionamiento diferencial 113

4.4 Discusión 115

Discusión general 123

Anexo estadístico 129

Referencias bibliográficas 142

1

Introducción general

1.1 Agroquímicos

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
CL_{50}	Concentración letal media
DL_{50}	Dosis letal media
IMI	Imidacloprid
GLI	Glifosato
nAChR	Receptor colinérgico nicotínico

La población humana actual es de 7300 millones y se proyecta que crecerá a 11200 millones para el año 2100 (United Nations 2015). El gran incremento de la población mundial es una tendencia que comenzó en los años ’60 y que, junto con el cambio en hábitos alimentarios —preferencia por carne, leche y trigo—, ha exigido una demanda creciente en la producción agrícola. En un ecosistema un cultivo representa un elemento nuevo, por lo que los componentes del primero se ajustan en respuesta a ese cambio. Por ende, los sistemas de producción agrícola han sido constantemente desafiados. La limitación de tierras aptas para el cultivo y de disponibilidad de agua ha puesto como objetivo principal conservar la productividad de los cultivos. Así, los sistemas agrícolas con manejo mejorado basados en el control de la genética de las semillas, de la fertilidad del suelo y de las plagas y malezas mediante pesticidas sintéticos

dieron el inicio a la Revolución Verde. A partir de la instauración de estos sistemas, se duplicó la producción mundial de alimentos. A fines del siglo XX los cultivos dominantes eran centeno, maíz, arroz y trigo, y ocupaban casi 600 millones de hectáreas, lo que representaba apróximadamente un 60 % de las tierras dedicadas al cultivo en el mundo (Tilman 1999).

Dentro del conjunto de variables que desafía constantemente a los sistemas agrícolas, las pestes —mayormente insectos, malezas y hongos— son un contrincante clave. El control de plagas y malezas incluye varios métodos, pero el uso de compuestos químicos suele ser la herramienta más plausible en términos económicos. Un pesticida es una sustancia o una mezcla de sustancias que tiene como fin prevenir, destruir, repeler o mitigar alguna peste. El fenómeno de agriculturización ha dado lugar a un creciente uso de los mismos (Hough 2014). En esta Tesis nos focalizaremos en el insecticida imidacloprid y en el herbicida glifosato.

Propiedades y clasificación de los neonicotinoides

En la segunda mitad del siglo XX, se desarrolló en profundidad la síntesis de pesticidas. En particular, se intensificó la investigación y la implementación de insecticidas. Ahora, su uso está ampliamente distribuido y es una rutina en los cultivos de alimentación básica (cereales, soja, maíz) y en los de frutas y vegetales (Ragsdale 1999). Entre ellos se encuentran los neonicotinoides, que representan algunos de los insecticidas más populares y ampliamente utilizados en el mundo. Además de la agricultura, son utilizados en la medicina veterinaria y en el paisajismo urbano, entre otras actividades.

Al igual que la nicotina, un insecticida natural, actúan como neurotóxicos porque perturban el sistema nervioso al actuar sobre los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) uniéndose al sitio de unión de la acetilcolina (ACh). En los insectos, la ACh es el neurotransmisor excitatorio más abundante y los nAChRs intervienen en la transmisión sináptica rápida. Los neonicotinoides imitan la acción de la ACh uniéndose a los nAChRs post-sinápticos de manera agonista. La activación sináptica generada por la ACh es finalizada por la acetilcolinesterasa (AChE). Sin embargo, los neonicotinoides y la nicotina son insensibles a la actividad de esta enzima (Figura 1). Como resultado, los nAChRs están permanentemente activados (Matsuda *et al.* 2001). La síntesis química ha

permitido que, dada la diferencia estructural entre los receptores de insectos y de mamíferos, los neonicotinoides se unan más fuertemente a los de los primeros (Figura 2). Además, sus propiedades físico-químicas en comparación conlas de la nicotina permiten una mejor translocación al sitio de acción en insectos (Yamamoto 1999). Por lo tanto, a diferencia de la nicotina, los compuestos de esta familia de insecticidas presentan toxicidad selectiva, alta para insectos y reducida para mamíferos, aspecto fundamental de su aceptación y popularidad (Tomizawa y Casida 2003).

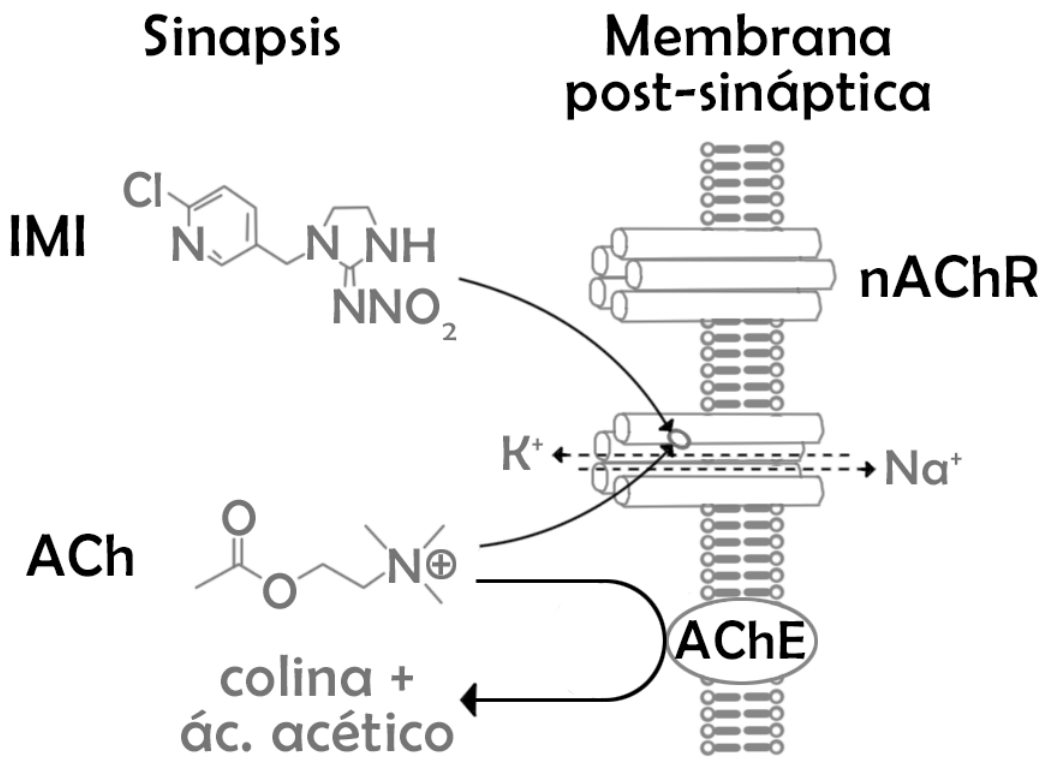

Figura 1. Neurotransmisión colinérgica mediada por el receptor nicotínico (nAChR) en la membrana post-sináptica. La acetilcolina (ACh) se une al nAChR y activa el canal, lo que da lugar a la entrada y salida de iones. Luego, es hidrolizada por la acetilcolinesterasa (AChE). El imidacloprid (IMI), un neonicotinoide, actúa de la misma manera sobre el nAChR, pero es insensible la acción de la AChE.

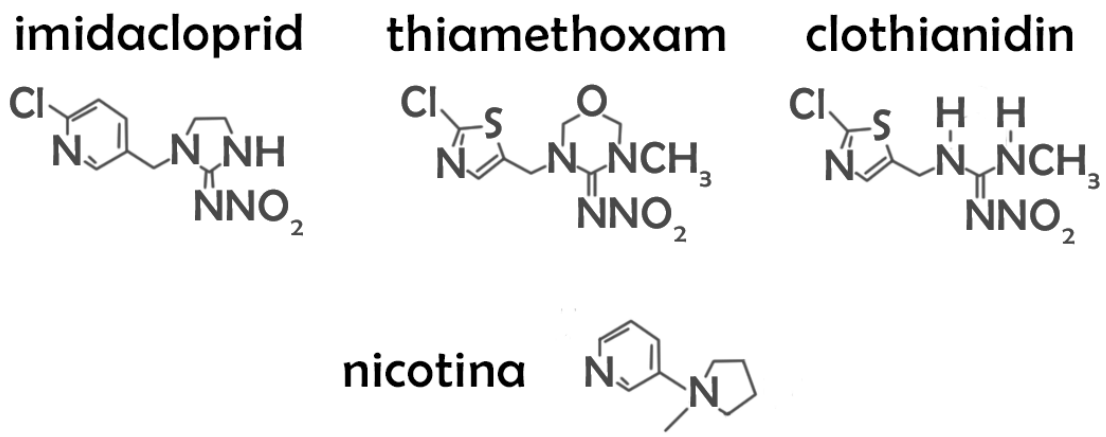

Figura 2. Estructuras químicas de neonicotinoides y la nicotina.

Otra característica clave que distingue esta familia de otros insecticidas es su naturaleza sistémica. Esto se debe a su alta solubilidad en agua y su permeabilidad cuticular, factor que está influenciado por la lipofilicidad, el coeficiente de disociación y la masa molecular de un compuesto (Baur *et al.* 1997, Trapp 2004). El compuesto se puede aplicar bañando las semillas, luego de lo cual la planta asimila el compuesto cuando germina y lo distribuye sistémicamente a medida que crece. El 60 % de los neonicotinoides son empleados de esta manera (Elbert *et al.* 2008). También se puede aplicar en el suelo y la planta lo asimila a través de sus raíces. Sus propiedades permiten una buena penetración a través de la membrana y una translocación translaminar y acropetal (Girolami *et al.* 2009). Así, se moviliza sistémicamente a los tejidos distales y jóvenes de la planta, lo que resulta en una protección total. Por lo tanto, no importa de qué parte de la planta se alimente una peste o un organismo no blanco, es altamente probable que se encuentre con estos compuestos.

Los neonicotinoides se pueden clasificar según su farmacóforo como N-nitroguanidinas (imidacloprid, thiametoxam, clothianidin y dinotefuran), nitrometilenos (nitenpyram) y N-cyanoamidinas (acetamiprid y thiacloprid). Los farmacóforos [=N-NO_2], [=CH-NO_2] y [=N-CN] son los que confieren selectividad a los nAChRs de insectos en comparación con los de vertebrados. El imidacloprid fue el primer neonicotinoide en ser comercializado. La empresa Bayer CropScience lo introdujo al mercado 1990 bajo el nombre de Gaucho como un insecticida sistémico para tratar semillas. En los siguientes diez años se

lanzaron seis neonicotinoides más, patentados por diferentes empresas: acetamiprid (1995), nitempyram (1995), thiametoxam (1998), thiacloprid (2000), clothianidin (2001) y dinotefuran (2002) (Elbert *et al.* 2008). Además de diferir en sus propiedades químicas y físicas (masa molecular, solubilidad en agua, eficacia sistémica, toxicidad y selectividad) (Tomizawa y Casida 2005), los neonicotinoides han tenido diferente aceptación en el mercado de acuerdo con su uso. Las nitroguanidinas son la clase que domina el mercado ya que el imidacloprid, el thiametoxam y el clothianidin son los neonicotinoides más importantes en términos económicos, considerando la cantidad de cultivos en los que son utilizados. Este posicionamiento está relacionado con que estos compuestos son los más utilizados como baño de semilla, el método de aplicación más popular (Jeschke *et al.* 2011, Godfray *et al.* 2014).

El lanzamiento de nuevos compuestos por diferentes empresas ilustra los esfuerzos intensos y competitivos de investigación, los cuales resultaron en el desarrollo de esta familia química. Todo esto convirtió a los neonicotinoides en los insecticidas más importantes en el mercado desde el lanzamiento de los piretroides sintéticos.

Riesgos de los neonicotinoides

Sin embargo, en la última década han surgido inquietudes acerca del destino final en el ambiente y de los efectos de estos compuestos, las cuales sacaron a la luz potenciales peligros resultantes de su uso masivo (EuropeanComission 2013, Goulson 2013, Godfray *et al.* 2014, Bonmatin *et al.* 2015). Dado que un 35 % de la producción agrícola mundial destinada al consumo humano requiere de polinizadores, una de las mayores preocupaciones es acerca de los efectos adversos sobre insectos polinizadores domésticos y silvestres (Klein *et al.* 2007). Así, en el año 2013, la agencia de la Unión Europea encargada de evaluar los riesgos asociados con la seguridad de los alimentos impuso una restricción parcial sobre el uso del clothianidin, el imidacloprid y el thiametoxam (EuropeanComission 2013) (Figura 3). Ésta se basó en evaluaciones de riesgo para polinizadores benéficos que se focalizaron en tres rutas de exposición: residuos en néctar y polen en las flores de plantas tratadas, polvo producto de la aplicación de gránulos y del proceso de siembra de semillas tratada, residuos en líquido de gutación producido por plantas tratadas. Es valioso recalcar que

inquietudes como éstas también surgieron en la Argentina, donde se promovió una comisión evaluadora *ad hoc* del SENASA para la evaluación del imidacloprid (SENASA 1999).

Figura 3. Apicultorxs exigiendo una restricción a los neonicotinoides. Parlamento de Londres, Reino Unido, 26 de abril de 2013.

Abejas en entornos agrícolas

Uno de estos insectos polinizadores y benéficos es la abeja *Apis mellifera*, la cual es utilizada tanto por la obtención de miel, cera y otros productos como por el servicio de polinización. Este último consiste en que las colmenas de abejas sean colocadas próximas a cultivos que requieren —en mayor o menor grado— de la polinización para dar fruto (Figura 4). En los últimos 50 años se ha favorecido el sembrado de cultivos dependientes de polinización, lo que significa que la agricultura demanda una población constante y creciente de polinizadores. Paradójicamente, la intensificación de la agricultura y la expansión de la frontera agropecuaria ha dado lugar a la fragmentación de los ecosistemas y a la reducción del hábitat de polinizadores nativos (Klein *et al.* 2007, Aizen *et al.* 2008). Así, la abeja doméstica se ha convertido en el polinizador de cultivos más importante (vanEngelsdorp y Meixner 2010) y,

sobre todo en los Estados Unidos y Europa, es común ver colmenas al costado de un lote agrícola o siendo trasladadas entre diferentes cultivos (Figura 5).

Figura 4. Colmenas de abejas utilizadas como servicio de polinización del cultivo de girasol en Provincia de Buenos Aires. Crédito: Grupo INSSOC

Figura 5. Transporte de colmenas de *A. mellifera*. Crédito: Dennie Best.

Destino ambiental de los neonicotinoides

Se mencionó que la restricción parcial se basó en las rutas de exposición referidas a los residuos en polvo luego de siembra de semillas tratadas y a las trazas en néctar y polen y en el líquido de gutación de plantas tratadas.

Durante la siembra de un cultivo, la abrasión de las semillas en ocasiones genera que el baño de insecticida se separe de la semilla y que el compuesto sea liberado al ambiente a través de los extractores de la máquina de siembra. En consecuencia, se encuentran trazas en el aire en forma de nube alrededor de la máquina y en la vegetación que rodea el área recientemente sembrada (Girolami *et al.* 2012, Girolami *et al.* 2013). Así, los polinizadores que vuelan a través de estas nubes o que visitan plantas en donde se depositó el polvo pueden recoger residuos de insecticidas (Girolami *et al.* 2012, Tapparo *et al.* 2012). Los pelos que presenta la abeja en la superficie de su cuerpo favorecen la atracción y retención de pequeñas partículas dispersas en el aire (Vaknin *et al.* 2000), por lo que la probabilidad de captar los residuos de insecticidas es alta.

En cuanto al alimento, el grado de contaminación de la miel y del pan de polen depende de la presencia de residuos en las flores, pero también de la presencia de residuos encontrados y recogidos en el ambiente, como agua y polvo. Los residuos en el polen y el néctar pueden ser transformados y metabolizados por las abejas, adentro y afuera de la colmena. Además, puede existir contaminación cruzada entre matrices (abejas, polen, pan de abeja, néctar, miel, cera, propóleo, jalea real) (Rortais *et al.* 2005, Chauzat *et al.* 2006, Mullin *et al.* 2010). Según una revisión de estudios de trazas, parecería que el néctar y la miel están menos contaminados que el polen o el pan de abeja (Bonmatin *et al.* 2015).

La gutación es la exudación de líquido secretado por los hidátodos, estomas ubicadas a lo largo del margen de las hojas, en respuesta a un aumento de presión dentro del xilema en condiciones de exceso de agua. Ocurre en varias especies de plantas y, aunque el fenómeno se observa principalmente en las primeras horas de la mañana, no está restringido a esa franja horaria (Singh 2013). Las abejas pueden beber de las gotas de gutación, y se han detectado residuos de neonicotinoides en plantas germinadas de semillas tratadas (Girolami *et al.* 2009, Tapparo *et al.* 2011).

Figura 6. Abeja bebiendo de una gota de gutación. Fuente: buzzaboutbees.net.

Una ruta de exposición adicional se genera a partir de los descartes luego de una cosecha. Tallos y hojas son distribuidos y reutilizados para diferentes propósitos —por ejemplo, alimento de ganado— o abandonados al costado del área cultivada. Frutas y verduras que no son consideradas adecuadas para el consumo humano también son acumuladas al costado del cultivo (Bonmatin *et al.* 2015).

Abejas expuestas

Las abejas recolectoras pueden entrar en contacto con los neonicotinoides en sus viajes de recolección al volar a través de nubes de partículas contaminadas, al contactar plantas tratadas o cercanas a un cultivo tratado, o al colectar agua, néctar o polen con residuos de insecticidas. No obstante, la abeja *A. mellifera* es un insecto eusocial, por lo que la supervivencia de la colonia depende de las tareas colectivas de todos los individuos. Por lo tanto, es importante considerar también, y sobre todo, la exposición de las abejas dentro de la colmena. Una vez que una abeja recolectora retorna a la colmena, puede contaminar a sus compañeras a través de contactos corporales, al compartir la comida o al

depositar los recursos contaminados en las celdas de almacenamiento. Esto es posible porque una colonia de abejas muestra una alta conectividad entre sus individuos, tanto por la proximidad física casual entre individuos (Baracchi y Cini 2014) como por los contactos boca a boca intencionales para compartir alimento (Crailsheim 1998).

La transferencia de partículas puede darse por simple contacto entre individuos (DeGrandi-Hoffman y Martin 1993) o por vía oral. Cuando una abeja retorna de un viaje de recolección de néctar comúnmente realiza un despliegue estereotipado denominado danza de reclutamiento, durante y luego de la cual comparte el recurso con compañeras más jóvenes, preferentemente procesadoras de alimento. Éstas, a su vez, lo distribuyen a otras compañeras y/o lo almacenan en celdas (Pírez y Farina 2004, Grüter y Farina 2007). En periodos de necesidad de agua, algunos individuos se vuelven especialistas en la recolección de este recurso (Robinson *et al.* 1984). Éste también es compartido entre compañeras mediante contactos trofalácticos y depositado en celdas (Park 1925, von Frisch 1967). El polen recogido en las flores es compactado y llevado a la colmena, donde la recolectora misma lo deposita en las celdas correspondientes (Winston 1987).

Las obreras que realizan sus tareas dentro de la colmena presentan una dieta diferencial a las abejas recolectoras. A su vez, su dieta varía con la edad ya que las funciones que desempeñan dependen de su fisiología y ésta requiere de cierta cantidad y calidad de nutrientes. Sin tener en cuenta esta la variabilidad temporal, en resumen, una abeja pre-recolectora consume tanto néctar como polen (Rortais *et al.* 2005), recursos que obtiene de celdas de almacenamiento y, en el caso del primero, además, de sus compañeras. Por lo tanto, considerando además los contactos corporales entre compañeras, una abeja que permanece dentro de la colmena está expuesta a los insecticidas de muchas formas.

Surgimiento e impacto del imidacloprid

El imidacloprid (IMI) fue el primer neonicotinoide en ser comercializado, introducido al mercado en el año 1990 como un insecticida sistémico para tratar semillas. Desde entonces su uso aumentó vertiginosamente hasta ser el

neonicotinoide más importante, ocupando el 41 % de su mercado en los Estados Unidos en 2009 (Jeschke *et al.* 2011). Desde entonces, su predominancia en los países agricultores del primer mundo ha ido menguando (Goulson 2013). Sobre todo, a partir del año 2013 cuando se impuso una restricción parcial sobre su uso en la Unión Europea (EuropeanComission 2013) basada en evaluaciones de riesgo, que continuaron luego de la disposición (EFSA 2014, Ruhman *et al.* 2016). No obstante, el IMI mantiene niveles de comercialización elevados en países de Sudamérica. Esto sumado a que existen numerosos estudios acerca de su mecanismo de acción en insectos, su efecto sobre la biología de la abeja y su destino ambiental (Cresswell 2011, Alkassab y Kirchner 2016) motivó a elegirlo en esta Tesis como representante de la familia de neonicotinoides.

Trazas del imidacloprid

Según las rutas de exposición descritas anteriormente, pueden existir trazas de IMI en el ambiente y en partes vegetales consumidas por la abeja y, eventualmente, en sus productos. En un experimento de campo donde las semillas de girasol fueron bañadas con 1 mg de ^{14}C-IMI (Gaucho WS, 700 g/kg), no se encontró IMI ni sus metabolitos en néctar y polen, pero las hojas presentaron 7 µg/kg de imidacloprid y 5 µg/kg de su derivado hidroxi-metabolito (Schmuck *et al.* 2001). En otro estudio, el 58 % de las muestras de polen de girasol presentaron imidacloprid en un promedio de 3 µg/kg (1 – 11 µg/kg) y en el 80 % de las muestras de polen de maíz se encontró imidacloprid en una concentración promedio de 2 µg/kg (1 – 3 µg/kg) (Bonmatin *et al.* 2003), mientras que en otro estudio se encontró una concentración promedio de 3 µg/kg (Charvet *et al.* 2004). También se encontró que parte del IMI asimilado por plántulas de maíz puede eliminarse a través exudados de las hojas, pero éste fluido parece limitarse a las primeras tres semanas luego de la germinación (Girolami *et al.* 2009, Thompson 2010) y se ve afectado por la humedad, la temperatura, el estado de desarrollo, el estrés hídrico, la profundidad de las raíces y el potencial hídrico del suelo (Tapparo *et al.* 2011). Durante estas tres primeras semanas, las concentraciones de IMI pueden ser muy altas, en un rango de 47 a 83,9 mg/l (Girolami *et al.* 2009). En un estudio en Francia, se encontró IMI en el 40,5 % y el 21,8 % de muestras de polen y miel, respectivamente. También se encontró el metabolito ácido 6-

cloronicotínico (Chauzat *et al.* 2011). En general, las concentraciones encontradas en polen se encuentran entre 0,9 y 3,1 µg/kg, mientras que los niveles encontrados en miel y cerca suelen ser más bajos (Blacquière *et al.* 2012). También se han encontrado trazas en abejas, donde el 11,2 % de las muestras presentó IMI en una concentración promedio de 1,2 µg/kg. Además, se encontró el metabolito ácido 6-cloronicotínico en el 18,7 % de las muestras (Chauzat *et al.* 2011). También existen estudios donde no se encontraron trazas en ningún tipo de muestras (Blacquière *et al.* 2012). Un meta-análisis informó que el rango de dosis y concentraciones realistas a campo del IMI son 0,024-0,3 ng y 0,7-10 µg/l, respectivamente (Cresswell 2011).

Toxicidad del imidacloprid

La evaluación del riesgo potencial de los insecticidas sigue una serie de normas, a partir de las cuales normalmente se mide la toxicidad letal aguda o subcrónica. Ésta se realiza contando la cantidad de abejas muertas luego de 24 o 48 horas, a partir de lo cual se calcula la dosis o concentración letal media (DL_{50} y CL_{50}). No obstante, un compuesto a cierta concentración puede ser tóxico aunque no aumente la mortalidad si presenta efectos subletales sobre el organismo en cuestión. A largo plazo, éstos pueden ser muy perjudiciales para una especie social y recolectora de lugar central como *A. mellifera*. Por un lado, un efecto negativo sobre aspectos reproductivos puede ser muy perjudicial para la colonia (Decourtye y Devillers 2010). En el estudio de este campo, se han encontrado efectos adversos de la exposición al IMI sobre el desarrollo larval (Gregorc y Ellis 2011). Por otro lado, un efecto que interfiere con el fenómeno de recolección, la transferencia de información y la coordinación entre miembros de la colonia también puede ser muy importante. El efecto del IMI sobre la motricidad ha sido estudiado varias veces, pero los síntomas observados (volteo, temblores, movimientos no coordinados e hiperactividad) se evidencian luego de niveles de exposición muy altos (Lambin *et al.* 2001, Nauen *et al.* 2001, Suchail *et al.* 2001, Medrzycki *et al.* 2003). También se ha estudiado la respuesta de extensión de probóscide. Basándose en esta respuesta, se ha visto un efecto sobre la sensibilidad gustativa (Lambin *et al.* 2001, Eiri y Nieh 2012), la habituación (Guez *et al.* 2001, Lambin *et al.* 2001) y el aprendizaje asociativo (Decourtye *et al.* 2003, Decourtye *et al.* 2004, Williamson *et al.* 2013,

Williamson y Wright 2013). Se ha encontrado que el IMI puede interferir con la orientación y la navegación (Bortolotti *et al.* 2003, Ramirez-Romero *et al.* 2005, Decourtye y Devillers 2010). Aunque parece evidente que el IMI interfiere con estos procesos, estos estudios generalmente fallan al no utilizar condiciones de exposición que semejan situaciones realistas a campo (Cresswell 2011).

Mezclas de agroquímicos

Además del creciente uso de agroquímicos, lo que constituyó el llamado paradigma agroindustrial (Hough 2014), la instauración de los sistemas agrícolas con manejo mejorado se caracterizó por un aumento en el esfuerzo del control de la genética de las semillas (Tilman 1999). Éste se desarrolló con el objetivo de resistir enfermedades y condiciones climáticas desfavorables y aumentar el rinde. En la década de los 90 se evidenció una expansión de los cultivos genéticamente modificados con resistencia a insectos o tolerancia a herbicidas (Raney 2004). La combinación de estas dos tecnologías – pesticidas y transgénicos – significa que los ecosistemas agrícolas presentan una mezcla de compuestos químicos, a los cuales están expuestos los polinizadores nativos y la abeja doméstica *A. mellifera* (Wu *et al.* 2011, Krupke *et al.* 2012, Hladik *et al.* 2016, Traynor *et al.* 2016).

Propiedades, modos de aplicación y destino ambiental del glifosato

El glifosato (GLI), un herbicida de amplio espectro utilizado por ser muy efectivo y de bajo costo de producción, es protagonista en este escenario ya que es principalmente utilizado en cultivos tolerantes. Fue comercializado por primera vez en el año 1974 como principio activo del formulado Roundup (Dill 2005, Powles 2008). Desde entonces, su uso ha aumentando considerablemente y en Argentina es el agroquímico de mayor comercialización desde 1997 (KleffmannGroup 2012).

El GLI (N-fosfonometil-glicina) actúa como inhibidor competitivo de la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa, la cual es necesaria para la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales. La inhibición de esta enzima resulta en la cesación de la síntesis proteica y, eventualmente, en la disrupción celular y la muerte. Esta vía metabólica está presente en plantas, microorganismos y hongos, pero no en animales (Amrhein *et al.* 1980). No

obstante, se han estudiado y encontrado efectos adversos sobre diferentes modelos, como peces, anfibios, lombrices de tierra y caracoles (Tate *et al.* 1997, Relyea 2005, Correia y Moreira 2010, Claudinei *et al.* 2016). Por lo tanto, preocupa qué efecto puede tener sobre un insecto benéfico que cohabita los ecosistemas agrícolas, la abeja *A. mellifera*.

El principal modo de aplicación es por rociado mediante pulverizadores terrestres o aéreos (Giesy *et al.* 2000). Se aplica mayormente durante la preparación de las tierras a ser cultivadas o de manera generalizada en cultivos transgénicos tolerantes (Dill 2005, Powles 2008). El empleo de estos métodos resulta en la deriva potencial del herbicida hacia masas de aire, suelos y cuerpos de agua aledaños a los cultivos (Matthews 2008). Por lo tanto, es altamente probable que sus trazas coexistan con las del IMI, ya que éste es de uso popular en los cultivos (Ragsdale 1999). Además, el uso del glifosato se ha extendido más allá de la agricultura. Se utiliza en jardines particulares y también institucionalmente en ingeniería forestal, el control de plantaciones ilegales y vías de transporte público (Giesy *et al.* 2000). Además de ser incorporado por las plantas transgénicas y malezas resistentes (Arregui *et al.* 2003, Nandula *et al.* 2005), tiene acción residual ya que los tejidos vegetales muertos presentan trazas del herbicida (Feng y Thompson 1990). También puede estar presente en néctar y polen de plantas tratadas (Thompson *et al.* 2014).

Riesgo del glifosato

En la abeja, la DL_{50} oral y por contacto es de 100 µg y > 100 µg de GLI por abeja, respectivamente. No se han llevado a cabo evaluaciones crónicas debido a que, basándose en un cociente de daño, se categorizó al GLI como “bajo riesgo” (Giesy *et al.* 2000). No obstante, es importante estudiar los efectos subletales, que a largo plazo pueden ser muy perjudiciales para una especie social como *A. mellifera*. Se evaluó el efecto de 2,5 mg/l de GLI en el alimento administrado de manera crónica y aguda, concentración que resultó subletal. Esta cantidad reduce las capacidades de aprendizaje asociativo y la sensibilidad gustativa de abejas recolectoras. No se detectaron alteraciones en el comportamiento de recolección de recursos (Herbert *et al.* 2014). Por esto último, podría existir una entrada continua de néctar con trazas del herbicida, el cual será distribuido a los miembros de la colonia y eventualmente almacenado. En este sentido, se indagó

acerca de su efecto sobre las larvas y se encontró que las mismas no lo rechazan cuando está presente en el alimento. El GLI incorporado de esta manera retrasa el desarrollo y reduce la actividad motora (Vázquez 2015). También se encontró que el GLI induce apoptosis en larvas expuestas al herbicida (Gregorc y Ellis 2011).

1.2 La abeja *Apis mellifera*

1.2.1 Recolección de recursos y polinización

El alto grado de adaptación que presentan las abejas melíferas a los ambientes se debe en gran medida a sus estrategias individuales y colectivas para obtener recursos (Núñez 1982, Seeley 1995). Las abejas recolectan néctar, polen, agua y resinas del ambiente que rodea al nido. Para ello, recorren largas distancias: hasta 3,7 km en paisajes agrícolas y 6 km en entornos naturales (Winston 1987, Seeley 1995). El néctar es una fuente de hidratos de carbono y el polen lo es de proteínas, aunque también puede contener lípidos, vitaminas y minerales (Baker y Baker 1975). Estos recursos son colectados mayormente de las flores y almacenados en el interior del nido para ser consumidos durante el otoño y el invierno, periodo durante el cual la oferta floral es muy baja o nula (Figuras 7 y 8).

Figura 7. Almacenamiento de néctar. Cuadro de colmena comercial con miel operculada. Crédito: Corwin Bell.

Figura 8. Almacenamiento de polen. Celdas conteniendo polen de diferentes fuentes (diferentes colores), adultas obreras y celdas con larvas. Crédito: Waugsberg.

Esta notable capacidad de acopio de productos de origen vegetal motivó en el hombre la domesticación de este insecto desde tiempos muy lejanos (Crane 1992). En la Argentina la apicultura ocupa un lugar destacado en la producción agropecuaria y la ha convertido en el segundo exportador de miel (SENASA 2014). Los productos de la colmena son sin lugar a dudas beneficiosos para la alimentación saludable del hombre, pero de un valor sustancialmente menor que el rol que cumple *A. mellifera* como agente polinizador para muchos ecosistemas agrícolas. Un tercio de la producción agrícola mundial dedicada al consumo humano requiere de agentes polinizadores (Klein *et al.* 2007). El sistema agrícola actual significa el uso en aumento de cultivos dependientes de polinización y la fragmentación del hábitat (Aizen *et al.* 2008), que pone en riesgo a polinizadores nativos. Por lo tanto, la abeja doméstica se ha convertido en el polinizador de cultivos más importante (vanEngelsdorp y Meixner 2010).

La búsqueda y recolección de alimento es un proceso altamente coordinado que precisa de la transferencia de información entre los miembros de la colonia para que resulte eficiente. En este sentido, las claves olfativas juegan un papel muy importante durante la recolección. Durante los vuelos que realizan las recolectoras, éstas aprenden claves olfativas de las flores visitadas, lo cual les permite orientarse y encontrar el recurso en los próximos vuelos de recolección (von Frisch 1923, Lindauer 1971b, Seeley 1995) (Figura 9).

Figura 9. Abeja recolectora de polen. Fuente: beesweetnaturals.com.

No obstante, esta información no es utilizada exclusivamente por las recolectoras que están en contacto con las flores. Las compañeras de nido que permanecen dentro de la colmena pueden percibir estos olores cuando las recolectoras regresan a descargar el alimento recolectado. Así, otras abejas pueden aprender el olor presente en el néctar que reciben a través de un contacto boca a boca (Farina *et al.* 2007) (Figura 10). Dentro de la colonia, el néctar se distribuye rápidamente y alcanza a obreras muy jóvenes e incluso a las larvas (Nixon y Ribbands 1952). De esta manera, a pesar del confinamiento, los individuos que no están en contacto directo con el exterior pueden recibir e intercambiar recursos e información con aquellos que sí lo tienen. En consecuencia, las experiencias vividas por las abejas dentro del nido podrían afectar las tareas que realicen a futuro dentro y fuera del mismo. Es así que la colonia se comporta como un centro de información en donde los individuos comparten y comparan las características de las distintas fuentes de alimento que están siendo explotadas en ese momento.

Figura 10. Contacto boca a boca entre dos abejas. La abeja de la izquierda comparte néctar —exponiendo una gota entre sus mandíbulas abiertas— con la abeja de la derecha. Crédito: Helga Heilmann.

1.2.2 Organización de la colonia

La abeja *A. mellifera* es un insecto eusocial. Es decir, presenta división reproductiva del trabajo, cuidado cooperativo de la cría y solapamiento de distintas generaciones capaces de contribuir en la labor social (Wilson 1971). En la colonia conviven todos los estadios. Por lo tanto, larvas y adultos comparten el mismo nicho (Figura 11). La colonia se encuentra contenida en un nido o colmena.

Figura 11. Obreras adultas y larvas. Fuente: Getty Images.

En cuanto a la división del trabajo, en una colonia de insectos eusociales se distinguen castas, originalmente definidas como "cualquier conjunto de individuos de un tipo morfológico o grupo de edad, o ambos, que lleva a cabo una labor especializada en la colonia" (Wilson 1971). La división del trabajo reproductivo se da entre dos castas reproductivas y una casta no reproductiva. La reina, hembra provista de ovarios altamente desarrollados, es el único individuo de la colonia capaz de poner huevos fecundados. Además de tener la capacidad de poner miles de huevos por día, es la principal responsable de mantener la cohesión de la colonia gracias a sus potentes feromonas. Los zánganos, machos, tienen como única función el aparearse con la reina, luego de

lo cual mueren. Una típica colonia de abejas melíferas presenta una única reina y desde ningún a cientos de zánganos, según a la época del año (Winston 1987). Las obreras, todas hembras, constituyen la casta no reproductiva y la más numerosa de la colonia ya que pueden haber entre 10 y 40 mil (Figura 12).

Figura 12. Castas reproductivas de *A. mellifera*. Reina (izquierda), zángano (medio) y obrera (derecha). Crédito: Alexander Wild.

Las obreras muestran un alto grado de coordinación y, a su vez, de descentralización en la realización de tareas dentro y fuera del nido. Las obreras realizan diferentes actividades organizadas según su edad. A este fenómeno se lo llama polietismo etario (Lindauer 1952, Seeley 1982, Winston 1987). Debido a este fenómeno, las obreras progresan en una serie de tareas programadas acorde avanzan en edad, la cual comprende castas temporales o subcastas (Lindauer 1952, Seeley 1982). La abeja obrera comienza realizando tareas dentro del nido y, finalmente, se desempeña en el exterior de la colmena.

Durante los primeros días de vida adulta, la obrera se dedica a limpiar y pulir celdas de cría recientemente liberadas. Cuando alcanza los 3 días de edad, además de atender a la reina, sellar celdas y acicalar y alimentar a compañeras de nido, se desempeña como nodriza al alimentar y cuidar a la cría, las larvas. Este patrón de comportamiento continúa durante los siguientes 11 días. En este punto, la obrera se moviliza hacia la periferia del nido y comienza a involucrarse en actividades relacionadas principalmente con el procesamiento del alimento. Allí, recibe néctar de las abejas recolectoras que ingresan al nido, lo convierte en miel y la deposita en las celdas de reserva de alimento. Además, coloca el polen en las celdas correspondientes, ventila la colmena agitando las alas, colabora con las guardianas en la entrada de la colmena y continúa alimentando y acicalando a sus compañeras de nido. Finalmente, a partir de los 17 días de edad y hasta el final de su vida, la obrera realiza tareas en el exterior: recolecta recursos y defiende el nido (Lindauer 1952, Seeley 1982) (Figura 13).

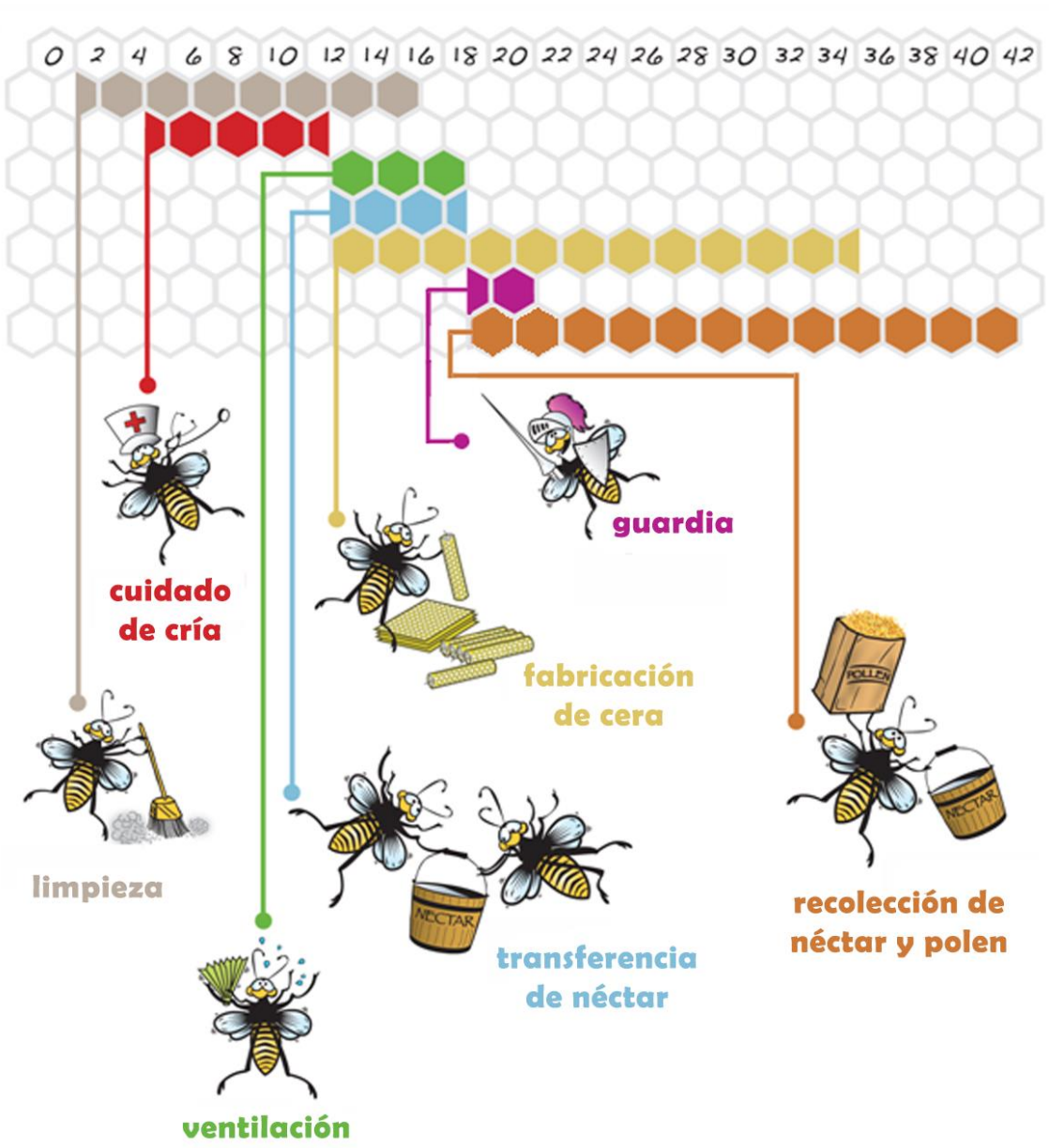

Figura 13. Poletismo etario. Tareas realizadas por una abeja obrera a lo largo de su vida adulta. Crédito: Grupo INSSOC.

A cada subcasta (castas temporales de las obreras) subyacen especializaciones fisiológicas y anatómicas que le son características. Las nodrizas presentan una hipertrofia de las glándulas hipofaríngeas, vinculada con la secreción de sustancias nutritivas con las que se alimenta a las larvas (Figura 14). Luego estas glándulas colapsan y las glándulas de cera, ubicadas entre los segmentos abdominales 2 y 4, comienzan su crecimiento. En este momento, la abeja puede especializarse en tareas de construcción y refacción del nido (Figura 15). Poco después, las glándulas cerígenas se reducen y el

individuo se dedica a la tarea de procesamiento de alimento. Finalmente, las recolectoras presentan una atrofia total de ambos tipos de glándulas (Winston 1987). Antes de su salida al exterior en vuelos de recolección, se verifican cambios en el sistema nervioso (Fahrbach y Robinson 1996).

Figura 14. Abejas nodrizas alimentando a las larvas. Fuente: ecobugdoctor.files.wordpress.com.

Figura 15. Abeja con escamas de cera producidas por glándulas cereras. Fuente: hobos.de.

Por lo tanto, la edad fisiológica impone restricciones sobre la tarea a realizar por un individuo. Sin embargo, es importante subrayar que éste no es el único factor que controla la división del trabajo, sino que las actividades se ajustan de acuerdo con los requerimientos de la colonia, y éstos varían según las condiciones tanto dentro como fuera del nido (Lindauer 1952, Ribbands 1955, Robinson 1992, Seeley 1995). Por ejemplo, la remoción experimental de las recolectoras induce una aceleración de la edad de inicio de recolección entre los individuos que llevaban a cabo tareas dentro del nido. Del mismo modo, la remoción de la cría y de los adultos más jóvenes ocasiona una reversión de las recolectoras (Huang y Robinson 1996). En todos los casos, algunos individuos de otros grupos abandonan sus tareas y reemplazan a las obreras faltantes. Pero este cambio no es inmediato, sino que se verifica en tiempos fisiológicos (Calderone 1998, Johnson 2010b), lo que demora incluso varios días.

1.3 Percepción y cognición

Abreviaturas

EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
GSE	Ganglio subesofágico
LA	Lóbulo antenal
MB	Cuerpo pedunculado
NRO	Neurona receptora olfativa
PUO	Proteína de unión a odorantes
REP	Respuesta de extensión de probóscide
RC	Respuesta condicionada
RI	Respuesta incondicionada
RO	Receptor olfativo

1.3.1 Percepción olfativa

En los insectos, los olores ocupan un lugar muy importante en su mundo perceptual ya que están involucrados en muchas actividades de su vida como la búsqueda de alimento, de pareja o de un sitio para la oviposición. Dada la

relevancia de los olores para este grupo, su sistema olfativo está muy desarrollado (Hildebrand y Shepherd 1997).

El olfato es un sentido químico que actúa cuando partículas volátiles contactan con los receptores olfativos. En los insectos, éstos se encuentran dentro de cavidades o pelos sensoriales llamadas sensilias (Goodman 2003) (Figura 16). Las sensilias olfativas presentan poros, que interrumpen la continuidad de la cutícula y permiten el paso de las moléculas a través de ella. Éstas se encuentran principalmente en las antenas, aunque también pueden estar en partes bucales o en patas (Snodgrass 1984, Chapman 1998). Las sensilias antenales vinculadas con el sentido del olfato son del tipo placoideas, chaeticas, basicónicas y tricoideas, entre otras. Las placoideas son las sensilias olfativas principales. Tienen forma de plato ovalado y numerosos poros invervados por entre 5 y 35 neuronas receptoras olfativas (NRO), bañadas en hemolinfa (Esslen y Kaissling 1976). Las moléculas odoríferas llegan a las dendritas de las NROs luego de difundir a través de la hemolinfa, a veces ayudadas por proteínas de unión a odorantes (PUO). Allí, interactúan con proteínas receptoras olfativas (RO), las cuales son producto de la expresión de 163 genes diferentes (Robertson y Wanner 2006). Los axones de las NROs forman el nervio antenal y llegan a los lóbulos antenales (LA), centro olfatorio primario del cerebro de un insecto.

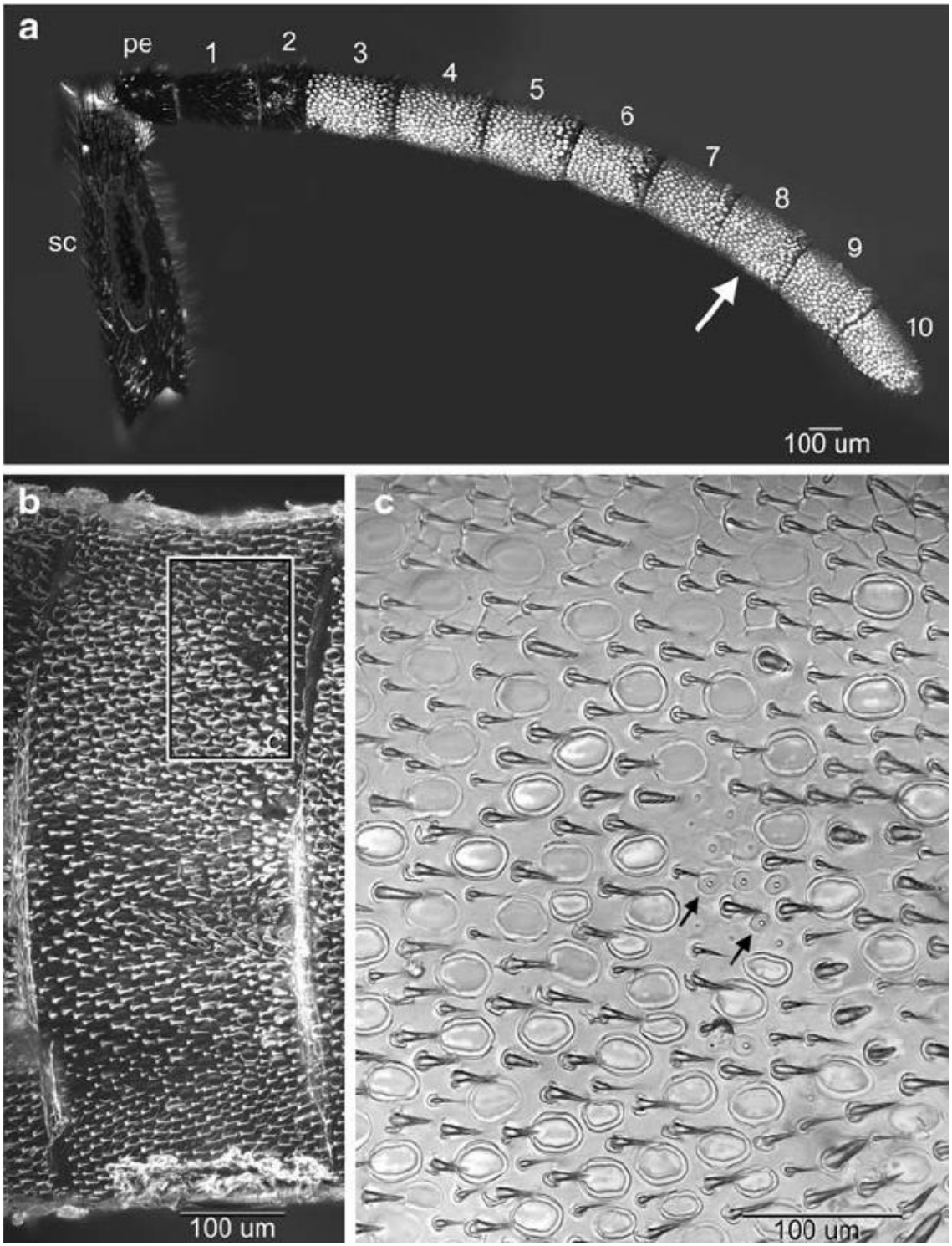

Figura 16. Las sensilias antenales de *A. mellifera*. a: Antena con autoflorescencia de sensilias placoideas en segmentos del flagelo. b y c: Detalle del octavo flagelómero que muestra los diferentes tipos de sensilias. Fuente: (Riveros y Gronenberg 2010).

En todos los sistemas olfativos existe un proceso de transducción, que convierte la señal de un olor en actividad eléctrica. Los impulsos nerviosos generados en la antena de los insectos son conducidos a lo largo del nervio

antenal, formado por los axones de las NROs, hasta los LAs. Los Las son estructuras pares está compartimentalizado en subunidades anatómicas y funcionales llamadas glomérulos, que resultan de la convergencia de NROs, de neuronas de proyección y de interneuronas locales (Hildebrand y Shepherd 1997). Los LAs de *A. mellifera* presentan 165 glomérulos cada uno y se conectan con centros de procesamiento superior: el protocerebro lateral y los cuerpos pedunculados (MB por *mushroom bodies*). Allí converge la información proveniente de distintas modalidades que incluyen la olfativa, la visual y la táctil. Los MBs son neuropilos pares del protocerebro que reciben información sensorial procesada desde regiones olfativas y visuales del cerebro y, además, información mecanosensorial y gustativa de la cabeza y antenas (Figura 17). Este centro de procesamiento se ha vinculado con el aprendizaje olfativo y con la formación de memorias olfativas (Erber *et al.* 1980, Davis 1993, Mizunami *et al.* 1993, De Belle y Heisenberg 1994, Hammer y Menzel 1995).

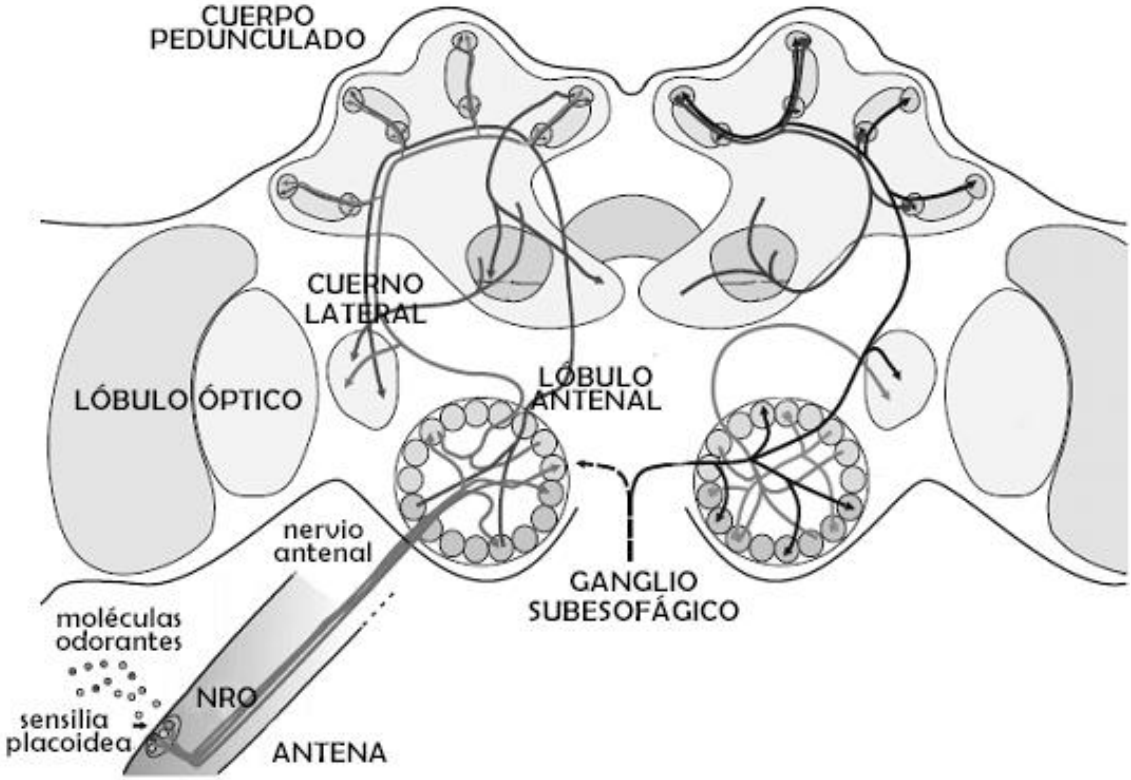

Figura 17. El cerebro y la vía olfativa de *A. mellifera*.

La abeja *A. mellifera* es un insecto holometábolo. Es decir, la transición de larva a adulto ocurre durante un estadio pupal intermedio (Figura 18). La metamorfosis implica una reconstrucción masiva de los tejidos luego de la

histólisis y fagocitosis de ciertos tejidos larvales y la reestructuración del sistema nervioso. El cerebro aumenta considerablemente, principalmente debido al desarrollo de los lóbulos antenal y óptico. También se fusionan ciertos ganglios ventrales (Chapman 1998). Si bien los circuitos del adulto se establecen durante la metamorfosis, existe evidencia de que podría modificarse aun luego de la eclosión del adulto (Strambi *et al.* 1999). Al evaluar la respuesta de antenas frente a estímulos olfativos en un electroantenograma, los niveles máximos de respuesta se alcanzan recién a los 4 días de vida del adulto (Masson y Arnold 1987). Además de la maduración de respuestas de las NROs, también se desarrolla la identificación de la feromona de la reina y las sensilias evolucionan estructuralmente. También, la maduración antenal depende de claves sociales ya que las antenas de abejas criadas en aislamiento presentan una respuesta disminuida (Masson y Arnold 1984). También, los patrones de actividad glomerular son más tenues, en términos de intensidad y número de glomérulos reclutados, en abejas de 1 o 2 días de edad (Wang *et al.* 2005).

Figura 18. Ciclo de vida de una abeja obrera.

1.3.2 Percepción gustativa

La quimiorrecepción por contacto o gusto es una modalidad muy importante en los insectos dado que les permite seleccionar su alimento con cuidado. Al colectar néctar, polen, agua y resinas, las abejas se encuentran con diferentes tipos de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), ácidos orgánicos, lípidos, minerales, vitaminas, compuestos aromáticos, aminoácidos, enzimas, compuestos fenólicos y sales (Harborne 1982). Por lo tanto, es esperable que este sentido sea crucial para una abeja recolectora. Además, estos recursos son transportados de vuelta a la colmena, y procesados por abejas más jóvenes. Por

lo tanto, a pesar de que estas abejas permanecen dentro del nido, se encuentran en contacto con todos los compuestos mencionados.

En *A. mellifera*, los órganos quimiosensoriales principales son las antenas, las piezas bucales y los segmentos distales del primer par de patas. Como en el caso del olfato, los receptores gustativos se encuentran dentro de sensilias. La diferencia es que éstas tienen forma de pelo (sensilia tricoidea) o clavija (sensilia basicónica) y presentan un único poro en su ápice. Ambos tipos de sensilias se encuentran en las piezas bucales y los tarsos, pero la antena sólo presenta sensilias tricoideas. Las sensilias gustativas alojan de 3 a 5 neuronas receptoras gustativas, bañadas en hemolinfa, cuyas dendritas se proyectan por el eje del pelo o la clavija hasta el ápice (Whitehead y Larsen 1976a). En la mayoría de los casos, la sensilia además aloja en su base un mecanoreceptor.

Se ha visto que las sensilias antenales responden a la estimulación con sacarosa, incluso más que las ubicadas en la probóscide y los tarsos (Whitehead y Larsen 1976b, de Brito Sanchez *et al.* 2008). Esto destaca el rol fundamental que tienen las antenas como órganos gustativos al momento de evaluar una potencial fuente de alimento. En cuanto a la diversidad de neuronas receptoras gustativas, se han encontrado sólo 10 genes que expresan receptores de esta modalidad (Robertson y Wanner 2006), lo cual se interpreta como reflejo de un repertorio limitado. Como en otros insectos, las neuronas gustativas y mecanosensoriales de las sensilias de las piezas bucales y las antenas proyectan al ganglio subesofágico (GSE).

La estimulación de los órganos gustativos —antenas, tarsos o piezas bucales— con sacarosa genera una respuesta comportamental refleja en la abeja y otros insectos succionadores, la extensión de su probóscide (REP) (Frings y Frings 1949). Poco se conoce acerca de las bases neurales de la ejecución de esta respuesta, en cuanto a la conexión que existe entre las vías sensorial y motora (Rehder 1989). No obstante, se ha estudiado el procesamiento del estímulo de sacarosa como refuerzo apetitivo en el contexto del aprendizaje asociativo. La neurona VUMmx1 proyecta desde el GSE al cerebro y converge con la vía olfativa en los LAs, los cálices de los MBs y los cuernos laterales. Media la función de refuerzo durante un condicionamiento olfativo y se ha descubierto que su depolarización es suficiente para proveer la señal de refuerzo apetitivo al

cerebro. También aumenta la respuesta del músculo principal de la probóscide M17 frente al olor aprendido en la fase de evaluación. Sin embargo, la actividad por sí sola de la VUMmx1 no genera la REP, lo que sugiere un procesamiento paralelo de la evocación de esta respuesta por parte de la sacarosa (Hammer 1993).

1.3.3 Aprendizaje

Los animales se desarrollan en ambientes donde los estímulos sensoriales abundan y, por lo tanto, deben ser capaces de reconocer los importantes para su supervivencia. Es por ello que son cruciales las experiencias previas que les permitirán diferenciar aquellos estímulos relevantes de los que no lo son. El aprendizaje es una capacidad que se encuentra en casi todos los animales y que les permite extraer reglas y estructuras para anticiparse a los eventos relevantes del mundo en que viven. Se define como el proceso que genera un cambio en el comportamiento debido a una experiencia comportamental (Pavlov 1927, Kandel *et al.* 1991, Carew 2000). En el marco de la teoría del aprendizaje se hace referencia a dos grandes categorías de fenómenos. Por un lado, se define al aprendizaje no asociativo como aquel que depende solamente de las propiedades de un estímulo (Squire y Kandel 2000). Por el otro, se denomina aprendizaje asociativo a aquel que surge al establecerse una asociación entre dos o más estímulos. Este tipo de asociación permite establecer relaciones predictivas entre eventos que coexisten en el medio ambiente y de este modo reducen la incertidumbre del animal (Mackintosh 2013).

1.3.3.1 Aprendizaje no asociativo

Éste es el tipo más elemental de aprendizaje ya que se genera como resultado de la experiencia repetida de un único estímulo (Squire y Kandel 2000). La sensibilización es un tipo de aprendizaje asociativo que se expresa en un aumento de la respuesta comportamental generada por la presentación previa de un estímulo de gran intensidad. Este proceso es inespecífico ya que el animal queda sensibilizado a otros estímulos diferentes del que lo generaron (Kandel *et al.* 1991). En el caso de la habituación, el individuo exhibe una disminución

paulatina en la probabilidad o la intensidad de su respuesta comportamental ante la sucesiva presentación de un estímulo. Este es uno de los procesos más comunes que se dan en la naturaleza y es estímulo-específico (Carew 2000).

1.3.3.2 Aprendizaje asociativo

El aprendizaje asociativo es aquel en el que un individuo forma una relación entre dos o más eventos, es decir que depende de los parámetros de más de un estímulo. El estudio de este tipo de aprendizaje ha sido estudiado en el marco de paradigmas comportamentales: el condicionamiento instrumental u operante y el condicionamiento clásico.

El primero es aquel mediante el cual el individuo aprende a asociar un estímulo con un comportamiento propio. La mejor ilustración de este condicionamiento es el experimento en la "caja de Skinner", donde una rata debe accionar una palanca (respuesta operante) para obtener alimento (refuerzo). Luego de sucesivos eventos, el animal es capaz de establecer un vínculo entre ambos sucesos (Figura 19). Se dice que en este paradigma el animal aprende la consecuencia de sus actos. El refuerzo puede tener un valor positivo o negativo (Skinner 1938).

Figura 19. Humor gráfico sobre el experimento de la "caja de Skinner". Crédito: Adam Chensy.

El segundo es aquel mediante el cual el individuo aprende a asociar un estímulo que inicialmente carece de significado con un estímulo biológicamente relevante, el cual genera una respuesta conspicua y generalmente refleja. En términos técnicos se dice entonces que la presentación del estímulo condicionado (EC, el estímulo neutro) próxima y previa a la presentación del estímulo incondicionado (EI, el estímulo relevante o refuerzo) constituye la contingencia de los estímulos. El EI es seguido necesariamente por la respuesta incondicionada (RI). Si la contingencia EC-EI se repite con determinada frecuencia, se forma un vínculo directo entre el EC y la respuesta. El aprendizaje se evidencia cuando el animal exhibe la respuesta con la sola presencia del EC, por lo que pasa a denominarse respuesta condicionada (RC).

El primero en determinar las propiedades de este tipo de aprendizaje fue Iván Pavlov (Figura 20). En este paradigma, a un perro se le presenta el sonido de una campana, el cual carece de relevancia para el animal, y pocos segundos después se le ofrece comida, lo que genera una respuesta de salivación. La repetición de esta secuencia lleva a que en cierto momento el perro comience a salivar luego del sonido de la campana, pero antes de la presentación del

alimento. Es decir, la campana anticipa la llegada de la comida (Pavlov 1927) (Figura 21).

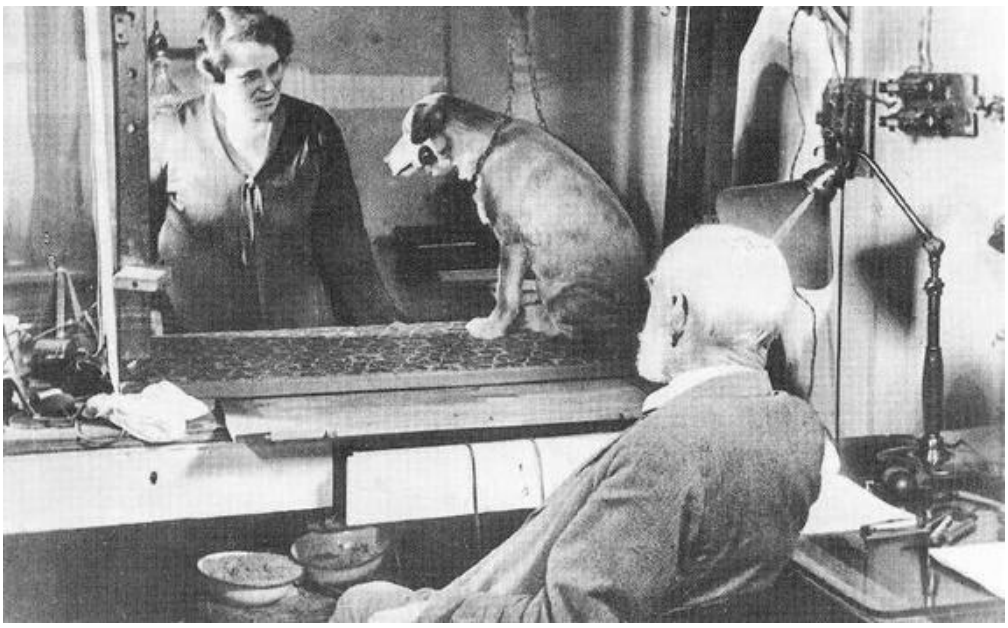

Figura 20. Dispositivo de Iván Pavlov para el estudio del condicionamiento clásico. Iván Pavlov junto con su colaboradora y el perro utilizado como sujeto experimental.

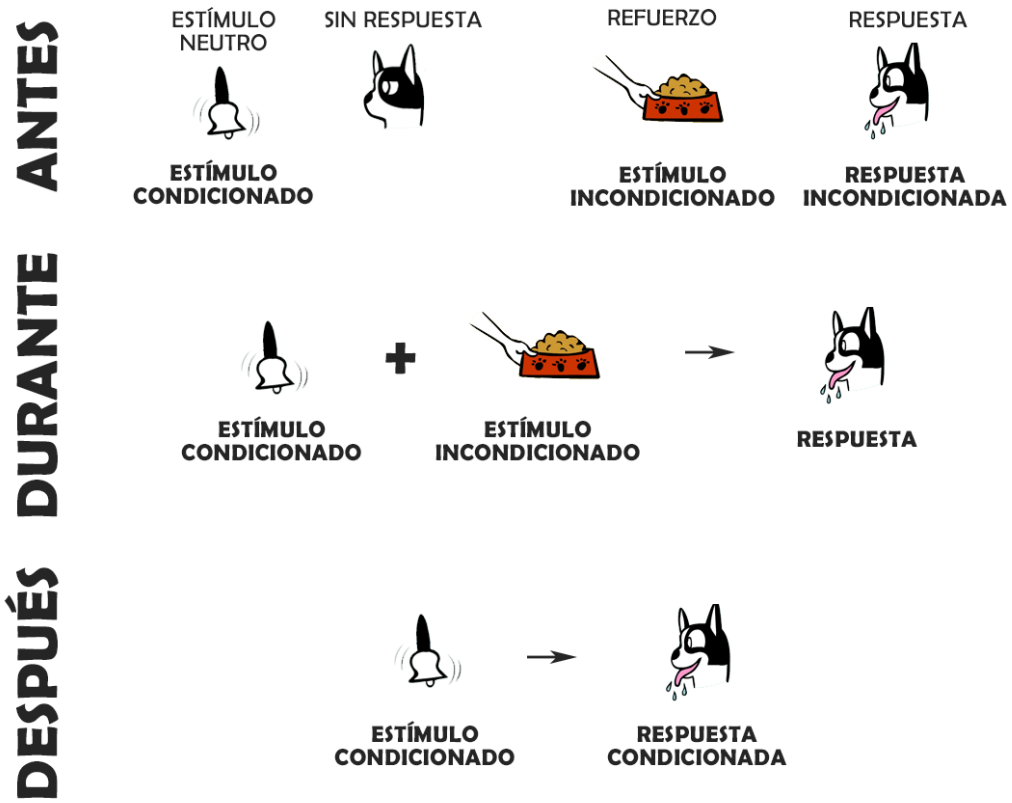

Figura 21. Propiedades de un condicionamiento clásico. El paradigma muestra las fases antes, durante y después del condicionamiento utilizando como ejemplo el experimento de Pavlov. Ilustraciones: Lily Chin.

La contingencia EC-EI es independiente de la intervención del animal. Éste simplemente la descubre o detecta y así el EC pasa de ser un estímulo neutro a ser uno con poder significante o señalizador. Para ello, debe haber una contigüidad temporal entre ambos estímulos y el EC debe preceder al EI. Así, el intervalo entre EC-EI y el orden en el que son presentados ambos estímulos son variables importantes (Carew 2000). Es oportuno destacar que el EI puede ser apetitivo o aversivo. Mientras que el primero tiene un valor positivo para el animal y genera una respuesta de aceptación —por ejemplo, comida—, el segundo tiene un valor negativo y genera una respuesta de rechazo o evitación —por ejemplo, un depredador— (Hall y Halliday 1998).

1.4 Objetivos e hipótesis

El objetivo general de esta Tesis es evaluar el efecto de la exposición a agroquímicos, específicamente algunos pesticidas de uso masivo, sobre el comportamiento de abejas jóvenes.

Los objetivos e hipótesis particulares son:

1. Una abeja que realiza sus tareas dentro de la colmena puede estar expuesta al neonicotinoide imidacloprid cuando contacta con una compañera que presenta partículas en su superficie, cuando recibe néctar contaminado o cuando se alimenta de recursos almacenados en la colmena que contienen trazas del insecticida. En principio, esta exposición por contacto u oral podría ser un evento único. Por lo tanto, se plantea evaluar el efecto de la exposición aguda al imidaclopird sobre el comportamiento apetitivo – percepción gustativa y aprendizaje olfativo – en abejas jóvenes de diferente edad, conocidas como pre-recolectoras. Dado que el imidacloprid actúa como neurotóxico y que el sistema nervioso se sigue desarrollando durante la vida adulta de una abeja, se espera que los efectos encontrados sean dependientes de la edad de exposición.

2. El aprendizaje apetitivo olfativo requiere de la asociación entre estímulos de dos modalidades diferentes. Así, depende de la percepción gustativa y de la olfativa. Un déficit en la capacidad de aprendizaje puede deberse a una falla en la contingencia de ambas vías en el cerebro y/o a la percepción quimiosensorial

de una u otra modalidad. Por lo tanto, se plantea evaluar el efecto de la exposición aguda al imidacloprid sobre la detección olfativa evaluada a través de la respuesta electrofisiológica de las antenas de abejas jóvenes de diferente edad. Dado que el imidacloprid actúa como neurotóxico y que el sistema olfativo se sigue desarrollando durante la vida adulta de una abeja, se espera que los efectos encontrados sean dependientes de la edad de exposición.

3. Dado que la organización de la colmena es plástica y que las actividades de las obreras deben ajustarse de acuerdo con las necesidades de la colonia y las condiciones ambientales, resulta pertinente realizar estudios de comportamiento en un contexto natural de colmena donde las tareas que se realizan influyen sobre la organización general de la colonia. Nuevamente, nos focalizaremos en abejas menores de 20 días de vida adulta, periodo en el que realizan tareas dentro de la colmena. Estas tareas consisten en limpiar y sellar celdas, alimentar a la cría, atender a la reina, acicalar a sus compañeras de nido, procesar el alimento recibido de las abejas recolectoras y ventilar la colmena. Por lo tanto, se desea evaluar el efecto de la exposición oral aguda al imidacloprid sobre comportamientos relacionados con el mantenimiento individual y la interacción entre individuos. Dado que el insecticida puede ingresar a las colmenas junto con el alimento recolectado, se plantea evaluar el efecto de la exposición oral aguda al imidacloprid sobre el comportamiento de abejas pre-recolectoras pertenecientes a dos subcastas.

4. Las trazas de diferentes pesticidas pueden persistir en el ecosistema agrícola y las colmenas permanecen un tiempo considerable en el cultivo. Por lo tanto, se plantea evaluar el efecto de la exposición crónica y combinada a dos de los pesticidas más ampliamente utilizados en entornos agrícolas, el insecticida imidacloprid y el herbicida glifosato sobre la percepción gustativa y el aprendizaje olfativo de abejas jóvenes de diferentes edades, que corresponderán a diferentes periodos de exposición. Dado que ambos agroquímicos tendrían diferentes sitios de acción, se postula que existe una interacción entre ambos, donde el efecto de la exposición dual es diferente de la adición de los efectos de las exposiciones simples.

2

Metodología general

Abreviaturas

DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Estímulo condicionado
EC+	Estímulo condicionado recompensado
EC-	Estímulo condicionado no recompensado
EI	Estímulo incondicionado
ID	Índice de discriminación
IMI	Imidacloprid
GLI	Glifosato
NRO	Neurona receptora olfativa
RC	Respuesta condicionada
REP	Respuesta de extensión de probóscide
RI	Respuesta incondicionada

2.1 Cría de abejas

Obtención de adultos de edad conocida

Los experimentos se realizaron en las temporadas de verano y otoño de los años 2012 a 2016 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34º 32’ S, 58º 26’ O). El mismo cuenta con un apiario de alrededor de 20 colmenas comerciales tipo Langstroth del cual se obtuvieron los sujetos experimentales (Figura 22).

Figura 22. Apiario experimental. Ubicado en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria. Crédito: Grupo INSSOC.

Dado que era necesario conocer la edad de las abejas adultas, se utilizaron individuos que hubieran emergido como adultos en el laboratorio. Para ello, se seleccionaron cuadros con adultos emergiendo en ese momento o con cría operculada en desarrollo pupal avanzado. Esto se podía verificar al retirar un opérculo y observar que la pupa tuviera los ojos negros y el cuerpo oscuro (Figura 23). Dado que la reina desova en celdas contiguas, una misma área presenta individuos en similar estado de desarrollo. El cuadro seleccionado era trasladado al laboratorio y colocado en una incubadora artificial con temperatura y humedad reguladas (32 ºC y 55 % humedad relativa) (Figura 24).

Cada 24 h, los adultos emergidos, todos de casta obrera, eran colocados en grupo dentro de cajas de madera (10 cm x 10 cm x 10 cm). Las mismas presentaban una cara con una malla plástica y otra con una puerta de acceso. De esta manera, los individuos no tenían más de un día de edad al momento de ser introducidos en las jaulas. La fecha de emergencia era registrada.

Figura 23. Desarrollo pupal avanzado. Pupas en estado avanzado con ojos negros (arriba) y con el cuerpo oscuro (abajo). El individuo de la derecha es un adulto a punto de emerger. Fuente: archive.org.

Figura 24. Obtención de adultos recién emergidos. Se selecciona un cuadro de alguna colmena comercial ubicada en el apiario de la Facultad y se traslada al laboratorio, donde se coloca en una incubadora con temperatura y humedad controladas para que emerjan los adultos. Crédito: Grupo INSSOC.

Adultos criados en el laboratorio

Las abejas confinadas fueron alimentadas *ad libitum* con solución de sacarosa de concentración conocida y polen (Figura 25). Las cajas eran revisadas cada 1 o 2 días. Se reemplazó alimento y se retiraron las abejas muertas siempre que fuera necesario. Las cajas de madera se colocaron en otra incubadora artificial (31 ºC, 55 % humedad relativa, oscuridad) hasta el momento de los ensayos.

Figura 25. Jaula de madera utilizada para criar abejas adultas en el laboratorio. Presenta una cara con malla metálica y otra con puerta corrediza de plástico. Se ofrece solución de sacarosa en un tubo plástico de 10 ml con un orificio en la punta y polen en una jeringa de 10 ml cortada por la mitad. Crédito: Grupo INSSOC.

Adultos criados en un entorno natural

Las abejas fueron criadas en una colmena de observación. Los adultos emergidos en el laboratorio en un mismo día eran identificados con un mismo color. Para ello, se las pintaba en el tórax o en el abdomen con un marcador de reinas comercial. Luego, las abejas eran colocadas en las cajas de madera y trasladadas a una colmena de observación. Con esta metodología, fue factible conocer la edad de los individuos una vez incorporados a la colmena. La colmena de observación constó de dos cuadros tomados de una colmena comercial. Los mismos se ubicaron uno encima del otro y fueron sujetados por un marco de madera y contenidos por dos paneles de acrílico. La única abertura permanente fue un orificio que funcionó como entrada y salida de obreras. Para el acceso al interior de la colmena, se podían retirar los paneles de acrílico fácilmente. La colonia reducida contó con cría, alrededor de 4000 obreras, una reina fecundada y reserva de alimento (miel y polen). La colmena se ubicó en el

exterior debajo de un tinglado y se tapaba con mantas para proveer oscuridad y minimizar las fluctuaciones de temperatura (Figura 26). La caja con los adultos era conectada a la colmena de observación a través de un orificio en el borde superior del marco. Las abejas recién emergidas ingresaban por sí solas a la colmena y eran aceptadas en poco tiempo. Luego de unos días, se podía observar que la colmena albergaba obreras de diferentes colores.

Figura 26. Incorporación de obreras de edad conocida a una colmena de observación. Se marca con un mismo color a las obreras emergidas en el mismo día para identificar su edad. Se las coloca en una jaula, la cual se conecta a la colmena de observación para que las abejas ingresen por sí solas. Crédito: Grupo INSSOC.

2.2 Agroquímicos

En el capítulo 1 se desarrollaron las rutas por las cuales las abejas pre-recolectoras pueden estar expuestas a agroquímicos. Las recolectoras pueden recoger los pesticidas al recolectar néctar, polen o agua con trazas o al contactar residuos en forma de polvo. Por un lado, al retornar a la colmena pueden transferir las partículas a las abejas pre-recolectoras de manera directa por contacto corporal o por vía oral mediante contactos trofalácticos. Estos eventos constituirían situaciones de exposición aguda. Por otro lado, los recursos recolectados son depositados en celdas y almacenados por un tiempo considerable. Éstos son fuente de alimento constante, sobre todo en momentos de escasez de fuentes externas. Por lo tanto, las abejas pre-recolectoras además estarían expuestas de manera crónica a las trazas de agroquímicos.

El imidacloprid (IMI) (99,9 % pureza, Pestanal®, Sigma-Aldrich) fue diluido en dimetilsulfóxido (DMSO) o en agua destilada. El DMSO fue utilizado para

facilitar la penetración cuticular del IMI en la exposición por contacto. Las soluciones madre se conservaron en droguero a temperatura ambiente y oscuridad. Las soluciones finales eran descartadas luego de 7 días.

Para la series experimentales "Exposición aguda a imidacloprid sobre el comportamiento apetitivo y la detección olfativa" (Subcapítulos 3.1 y 3.2), las dosis de IMI administradas fueron de 0,25 y 0,50 ng por abeja. Estas son subletales y la primera realista a campo (Cresswell 2011). Se preparó una solución madre de IMI en DMSO con una concentración de 50 µg/ml. En el caso de administración topicada, la solución madre fue diluida en DMSO y se obtuvieron dos soluciones finales con concentraciones de 0,25 y 0,50 µg/ml. Como se colocó una gota de 1 µl de la solución final en el tórax de la abeja con una micropipeta, las dosis administradas fueron de 0,25 y 0,50 ng por abeja, respectivamente. En el caso de administración oral, la solución madre fue diluida en solución de sacarosa 16 % m/m y se obtuvieron dos soluciones finales con concentraciones de imidacloprid de 0,83 y 1,67 µg/ml y de DMSO de 0,33 % v/v (se agregó DMSO a la solución final de la dosis más baja para obtener la misma concentración del solvente en solución de sacarosa). Como se alimentó a las abejas con 3 µl de la solución final, las dosis administradas fueron de 0,25 y 0,50 ng por abeja. El uso de DMSO no es necesario en una administración oral. Sin embargo, se utilizó con el fin de poder comparar los efectos de ambos tipos de exposición.

Para la serie experimental "Exposición aguda a imidacloprid sobre el comportamiento dentro de la colmena" (Subcapítulo 3.3), se preparó una solución madre de IMI en agua destilada con una concentración de 25 µg/ml. La solución madre fue diluida en solución de sacarosa 50 % m/m y se obtuvo una solución final de 0,83 µg/ml. Como se alimentó a las abejas con 3 µl de la solución final, la dosis administrada fue de 0,25 ng por abeja.

Para la serie experimental "Exposición crónica a imidacloprid y glifosato" (Capítulo 4), se preparó una solución madre de IMI en agua destilada con una concentración de 4 mg/l. La solución madre fue diluida en solución de sacarosa 50 % m/m y se obtuvo una solución final con concentración de 1 µg/l, la cual es subletal y realista a campo (Cresswell 2011). Para fines de comparación con

otros trabajos, se proveen los valores de concentración equivalentes en diferentes unidades (Tabla 1).

Tabla 1. Equivalencias entre unidades de concentración para el imidacloprid. Valores calculados considerando una masa molar de 255,66 g.

Unidades físicas (masa/volumen)		Unidad química: molaridad
1 µg/l	1 ppb	3,9 nM

El glifosato (GLI) se aplica en formulados los cuales además contienen coadyuvantes que facilitan el ingreso del herbicida a la planta y agua como solvente (CONICET 2009). Debido a la diversidad de composiciones de los formulados, se trabajó solamente con el principio activo. El GLI (99,7 % pureza, forma ácida, Pestanal®, Sigma-Aldrich) fue diluido en agua destilada y se obtuvo una solución madre de concentración de 100 mg/l. La misma se preparaba continuamente, conservada en heladera, ya que era descartada luego de 7 días. La solución madre fue diluida en solución de sacarosa 50 % m/m y se obtuvo una solución final con concentración de 2,5 mg/l.

La preparación de las soluciones de agroquímicos se realizó bajo campana utilizando guantes descartables, guardapolvos, protector respiratorio y anteojos de seguridad. Tanto el sobrante de las soluciones como el agua de lavado de material fueron descartados en bidones provistos por el Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad.

Las soluciones de sacarosa fueron preparadas con azúcar comercial. Eran conservadas en heladera y se descartaban luego de 7 días. Una vez colocadas en los alimentadores de las cajas de madera, eran renovadas cada 2 o 3 días.

2.3 Aprendizaje

En la naturaleza, las abejas realizan asociaciones entre diferentes estímulos. En el laboratorio, es posible recrear esta situación de manera controlada mediante un condicionamiento clásico. En el caso de un condicionamiento olfativo en contexto apetitivo, este ensayo consiste en la presentación conjunta de un volátil (estímulo condicionado, EC) y de solución de sacarosa (estímulo

incondicionado, EI). Este último estímulo genera una respuesta refleja en la abeja y otros insectos succionadores (Frings y Frings 1949). Esta respuesta de extensión de probóscide (REP) ocurre en la naturaleza cuando una abeja visita una flor y contacta el néctar que ofrece (Figura 27).

Figura 27. Abeja recolectora libando néctar de una flor. La abeja extiende su probóscide para succionar el néctar. Fuente: Dancetrokes.

Las abejas fueron capturadas individualmente, anestesiadas en frío (−4 ºC) y amarradas en puntas plásticas de pipeta automática de 1000 µl (cepos) de manera tal que permanecieran inmovilizadas, pero que sus piezas bucales y antenas quedaran libres (Takeda 1961, Bitterman *et al.* 1983) (Figura 28). Luego, se las mantuvo en una incubadora artificial (31 ºC, 55 % humedad relativa, oscuridad) por un tiempo determinado con el fin de reducir el estrés producido por la manipulación. Sólo se utilizaron aquellas abejas que extendieron su probóscide ante la presentación de solución de sacarosa 50 % m/m (respuesta incondicionada, RI, ante el EI).

Figura 28. Abeja restringida en un cepo. Crédito: Grupo INSSOC.

Durante el condicionamiento, se ubicó a la abeja amarrada entre un dispositivo que producía un flujo de aire constante (2,5 ml/s) y un extractor de aire que removía los olores liberados. El dispositivo dirigía el aire a las antenas de la abeja a una distancia de 2 cm (Figura 29). Se descartó a aquellos individuos que extendieron su probóscide al estímulo mecánico de aire.

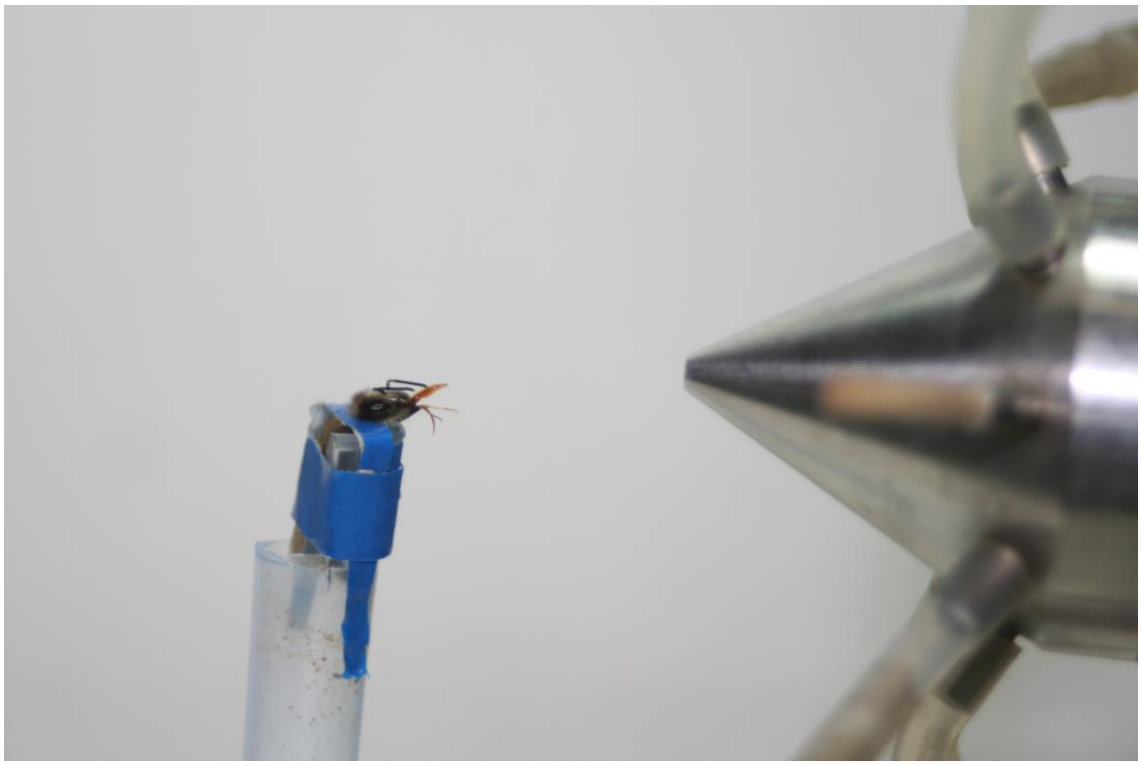

Figura 29. Dispositivo eléctrico de liberación de olores. Crédito: Grupo INSSOC.

2.3.1 Condicionamiento clásico absoluto

El condicionamiento clásico absoluto consistió en la presentación conjunta de un olor con la recompensa. Durante la fase de entrenamiento, se presentó un olor puro (1-hexanol) junto con solución de sacarosa 50 % m/m. El olor era liberado cuando, mediante una válvula eléctrica, el flujo de aire se redirigía para pasar a través de una jeringa que contenía un papel de filtro de 30 mm x 3 mm impregnado con 4 µl de olor. El olor se presentó durante 6 s y la recompensa se ofreció durante los últimos 3 s de este periodo al tocar las antenas con la solución de sacarosa y luego alimentar a la abeja. Se computó una respuesta condicionada (RC) si la abeja extendió su probóscide durante los primeros 3 s de presentación de olor. Cada ensayo duró 39 s y se compuso por 16 s de aire limpio, 6 s de olor y 17 s de aire limpio. El entrenamiento consistió de cinco ensayos separados por 15 minutos. Las abejas que extendieron su probóscide en el primer ensayo (respuesta espontánea) no fueron consideradas para el análisis. Se mantuvo un tiempo de 20 minutos entre el último ensayo y la fase de evaluación, la cual consistió en una única presentación no recompensada del olor condicionado y la presentación de un olor novedoso (nonanal). En esta fase, el orden de presentación fue alternado entre abejas. Al final del experimento, se verificó la RI de las abejas y aquellas que no la presentaron fueron descartadas del análisis (Figura 30). Se utilizaron alrededor de 20 individuos por sesión.

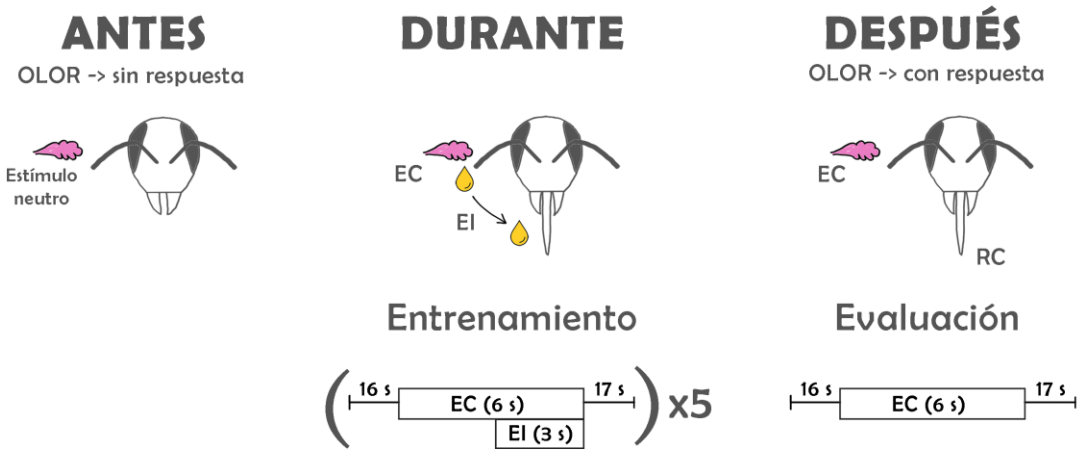

Figura 30. Condicionamiento clásico absoluto en *A. mellifera*. En este caso, es de tipo apetitivo y olfativo. El condicionamiento consiste en una etapa de entrenamiento y una de evaluación. En la primera, se presenta el olor (EC) junto con la solución de sacarosa (EI) en cinco ocasiones. La estimulación apetitiva se logra tocando las antenas de la abeja y luego alimentándola. En la segunda, se presenta el EC en ausencia del EI. Se evalúa la REP durante el entrenamiento y en la evaluación.

2.3.2 Condicionamiento clásico diferencial

La capacidad de asociar un olor con una posible fuente de alimento es esencial. Sin embargo, dado que los estímulos olfativos que ingresan a la colmena son numerosos y fluctuantes, es importante que una abeja sea capaz de discriminar entre olores, dependiendo del valor que se le asigne a cada uno. Es posible estudiar esta habilidad mediante un condicionamiento diferencial.

En este caso, la fase de entrenamiento consistió en la presentación de un olor puro (1-hexanol) junto con solución de sacarosa 50 % m/m (estímulo condicionado recompensado, EC+) y en la presentación de otro olor puro (nonanal) en ausencia de tal recompensa (estímulo condicionado no recompensado, EC-). Los olores eran liberados de la misma manera que se describió en la sección anterior, con la particularidad de que cada uno estaba contenido en una jeringa diferente y que la redirección del flujo a través de cada una era controlada por una válvula eléctrica específica. La duración y la estructura de cada ensayo fueron las mismas que en el condicionamiento absoluto. El entrenamiento consistió de diez ensayos separados por 15 minutos.

Los mismos correspondieron a cinco ensayos recompensados y cinco ensayos no recompensados. El orden de los ensayos se realizó de una manera pseudo-aleatoria (EC-, EC+, EC+, EC-, EC-, EC+, EC-, EC+, EC+, EC-) y fue siempre el mismo. Las abejas que extendieron su probóscide en los primeros dos ensayos (respuesta espontánea) no fueron consideradas para el análisis. Se mantuvo un tiempo de 20 minutos entre el último ensayo y la fase de evaluación. Ésta consistió en la presentación sucesiva de ambos olores condicionados sin recompensarlos. En esta fase, el orden de presentación fue alternado entre abejas. Al final del experimento, se verificó la respuesta incondicionada de las abejas y aquellas que no la presentaron fueron descartadas del análisis (Figura 31). Se utilizaron alrededor de 20 individuos por sesión.

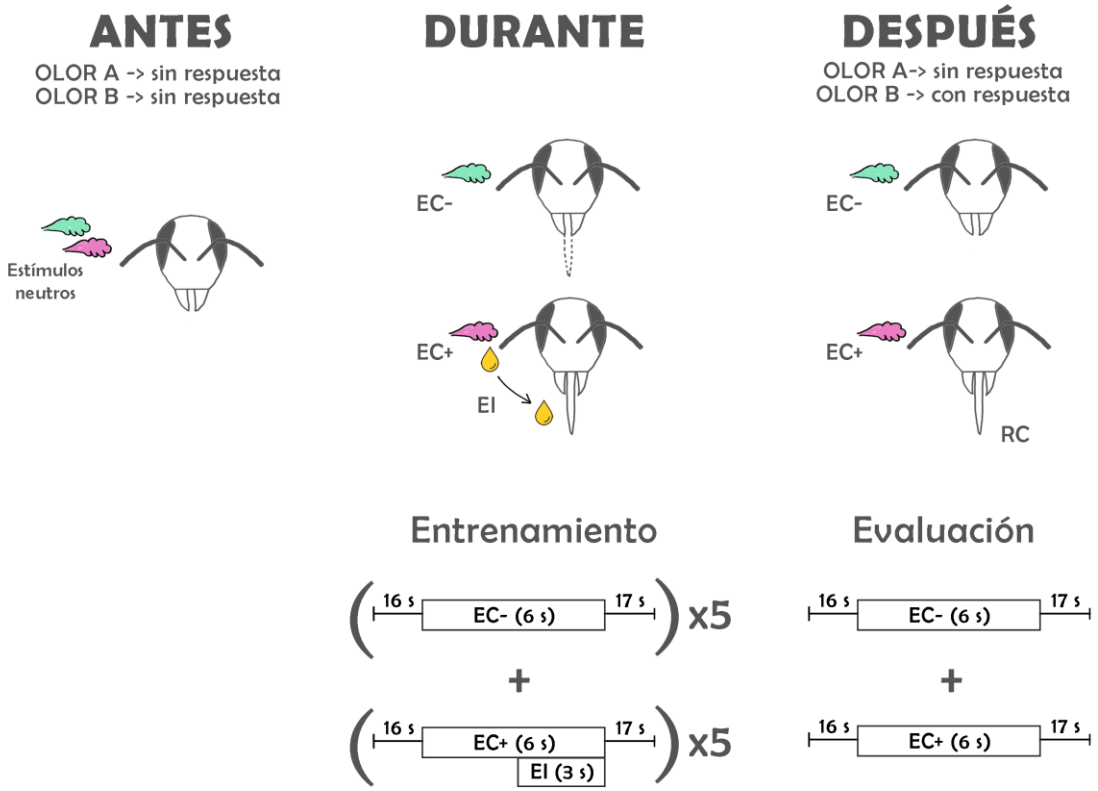

Figura 31. Condicionamiento clásico diferencial en *A. mellifera*. En este caso, es de tipo apetitivo y olfativo. El condicionamiento consiste en una etapa de entrenamiento y una de evaluación. En la primera, se presenta un olor (EC+) junto con la solución de sacarosa (EI) en cinco ocasiones y otro olor (EC-) solo en cinco ocasiones. El orden de las presentaciones es peudoaleaterio. La estimulación apetitiva se logra tocando las antenas de la abeja y luego alimentándola. En la segunda, se presenta el EC+ y el EC- en ausencia del EI. Se evalúa la REP durante el entrenamiento y en la evaluación.

Se definió un índice de discriminación (ID) para cada abeja como la diferencia entre las respuestas ante el EC+ (1-hexanol) y las respuestas ante el

EC- (nonanal). Con el fin de evaluar la dinámica durante la fase de entrenamiento, se calculó un ID para cada par de ensayos (ID_n) como la diferencia entre el valor de la respuesta ante el EC+ y el valor de la respuesta ante el EC- dentro de un mismo par de ensayos (los valores incluían del -1 al 1). Además, se definió un ID global como la diferencia entre el total de respuestas ante el EC+ y el total de respuestas ante el EC- a lo largo de la fase de entrenamiento (los valores incluían del -4 al 4).

2.4 Percepción gustativa

La extensión de probóscide de las abejas ocurre en la naturaleza cuando una recolectora visita una flor que ofrece néctar o cuando una abeja recibe néctar de otra durante la trofalaxia. Sin embargo, existe una variación individual en términos de sensibilidad gustativa. Ésta puede ser estimada a través de un ensayo donde al mismo sujeto se le presentan soluciones de sacarosa de concentración creciente. Se interpreta como umbral de respuesta a la sacarosa a la mínima concentración de sacarosa ante la cual la abeja extiende su probóscide (Page *et al.* 1998). Se infiere que, en este punto, la abeja es capaz de distinguir la sacarosa del agua y la interpreta como un estímulo gustativo excitatorio, lo cual desencadena la respuesta refleja.

Las abejas fueron anestesiadas en frío (−4 ºC) y amarradas en los cepos descriptos en la sección 2.3. Luego, se las mantuvo en una incubadora artificial (31 ºC, 55 % humedad relativa, oscuridad) por un tiempo determinado con el fin de reducir el estrés producido por la manipulación.

Las abejas fueron estimuladas con soluciones de sacarosa de concentración creciente (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 y 50 % m/m) al tocar sus antenas con un palillo de madera embebido. Antes de cada presentación de solución de sacarosa, se ofreció agua a las abejas. Esto controló el efecto potencial de la presentación repetida de sacarosa que podía derivar en sensibilización o habituación, y aseguró que la extensión de la probóscide no se debiera a sed. A aquellas abejas que respondieron al agua, se les permitió beber hasta saciarse. La presentación de una solución se realizaba secuencialmente a las abejas y, luego, se continuaba

realizando lo mismo con los estímulos siguientes. Se utilizaron entre 30 y 40 individuos por sesión. El intervalo entre estímulos fue de 4 minutos aproximadamente (Figura 32).

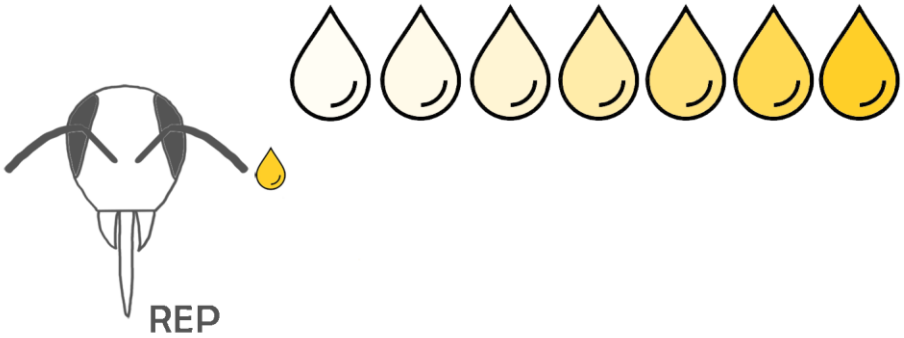

Figura 32. Medición de sensibilidad a la sacarosa en *A. mellifera*. El protocolo consiste en la presentación de soluciones de sacarosa de concentraciones crecientes y evaluación de REP en cada una. La estimulación se realiza tocando las antenas de la abeja con la solución de sacarosa.

Al final del ensayo, se obtuvo un puntaje para cada abeja. Éste se basó en la cantidad de soluciones ante las cuales la abeja extendió su probóscide. De esta manera, los valores que tomó fueron números enteros de 1 a 7, donde un puntaje de 1 representó a una abeja que sólo había respondido a la solución más concentrada (50 % m/m) y un puntaje de 7 significó que esa abeja había respondido a todas las soluciones de sacarosa. Si una abeja que había respondido a soluciones diluidas no extendió su probóscide a una solución intermedia, pero sí lo hizo a concentraciones más altas, se consideró que esta 'no respuesta' fue un error circunstancial y se contabilizó como positiva. Tanto las abejas que no respondieron a ninguna solución (puntaje hipotético igual a 0) como las que respondieron reiteradamente al agua no fueron consideradas en el análisis.

2.5 Detección olfativa

El olfato es un sentido sumamente importante para los insectos. En las abejas, la mayoría de las células olfativas se encuentra en las antenas. Cuando una partícula volátil se une a una neurona receptora olfativa (NRO), ésta se depolariza. Una antena presenta terminales dendríticas de miles de NROs por lo

se genera una diferencia de potencial entre la hemolinfa y la superficie cuticular que puede ser medida a través de una técnica electrofisiológica llamada electroantenografía. De la misma se obtiene un electroantenograma, el cual cuantifica la suma de los potenciales de las NRO de una antena aislada que se encuentran en la vecindad del electrodo de registro. De esta manera, se evalúa la respuesta fisiológica periférica ante la presentación de un olor y se separa de la respuesta mediada por el sistema nervioso central.

Con el objeto de evaluar el efecto de la exposición oral al IMI sobre la sensibilidad olfativa, se midió la respuesta de antenas de abejas que habían ingerido solución tratamiento. Las abejas utilizadas tenían 2, 5 o 9 días de edad. Las abejas fueron capturadas individualmente en jaulas redondas de plástico (ruleros) y alimentadas con 3 µl de solución de sacarosa 16 % m/m de solución de sacarosa sola (Control DMSO), con DMSO (Control IMI) o la última más 0,25 ng de IMI. La concentración de DMSO en la solución de sacarosa fue de 0,33 % v/v. Luego de consumir la totalidad de la solución tratamiento, los ruleros con las abejas se colocaron en la cámara de cría, ubicados cercanos entre sí y a la jaula de origen, aunque a una distancia que evitó que realizaran trofalaxia. Se evaluó la respuesta de las antenas 1 o 24 horas luego de la administración del tratamiento de IMI con el fin de estudiar si el IMI tiene un efecto a largo plazo. En el último caso, se agregó un tubo perforado tipo eppendorf de 0,6 ml con solución 16 % m/m en el rulero.

Las abejas fueron anestesiadas a –4 ºC para facilitar la manipulación. Sólo se usó la antena derecha dado que existe evidencia de lateralización antenal (Frasnelli *et al.* 2010). La misma se removió de la cabeza a la altura del escapo utilizando una microtijera. Luego se podó la punta del segmento más distal del flagelo con un bisturí. Inmediatamente luego de la disección, la antena se suspendió entre dos electrodos con una gota de gel conductor (Spectra 360), de manera que cada extremo, pero no el resto de la antena, estuviera inmerso en el gel (Figura 33). Así se aseguró que la hemolinfa estuviera en contacto con el gel y que el circuito estuviera cerrado. Los electrodos estaban conectados a un controlador de adquisición de datos (IDAC-2, Syntech), que a su vez estaba conectado a un ordenador. Esta interfase amplifica señales de baja frecuencia y las convierte a formato digital. Las señales se registraron y analizaron utilizado

el programa Autospike (Syntech). El dispositivo de liberación de olor se colocó a 1 cm de la antena. El mismo producía un flujo de aire constante (2,5 ml/s), limpio y húmedo ya que entre la bomba de aire y el dispositivo se colocó una columna con carbón activado y otra con agua destilada. Un extractor de aire removía los olores liberados.

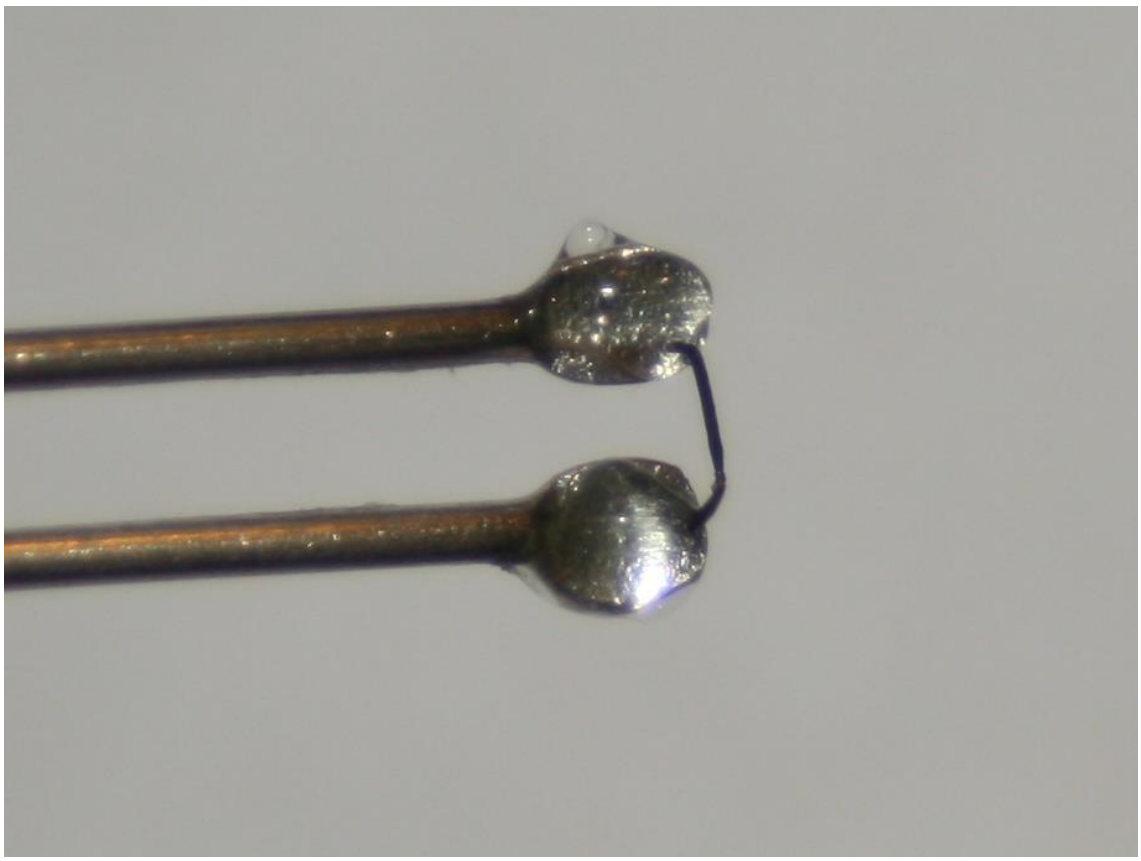

Figura 33. Antena de abeja colocada entre dos electrodos. Crédito: Grupo INSSOC.

Se estimuló cada antena con concentraciones crecientes de 1-hexanol en agua destilada (1:100, 1:10, 1:1). Las presentaciones de olor duraron 1 s. El olor se liberaba cuando, mediante una válvula eléctrica, el flujo de aire se redirigía para pasar a través de una jeringa que contenía un papel de filtro de 30 mm x 3 mm impregnado con 4 µl de solución de olor. Antes de cada presentación de olor, se registró la respuesta al estímulo de aire solo para tener en cuenta la estimulación mecánica. Cada registro duraba 12 s y el olor era presentado al segundo 6. Cada solución de olor se presentó dos veces seguidas. El intervalo entre estímulos fue de 1 minutos y 12 segundos. Cada registro consistió en la diferencia de voltaje medida en función del tiempo. Se calculó una respuesta pico como la diferencia en voltaje inmediatamente antes de la estimulación y el

valor más extremo registrado durante el periodo de presentación de olor. Se promediaron las respuestas pico a una misma concentración de olor.

2.6 Comportamiento dentro de la colmena

La colonia de abejas es un sistema auto-organizado donde cada individuo recoge información local y realiza comportamientos acorde en paralelo (Gordon 2007). Las abejas que permanecen dentro de la colmena cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la colonia y tienen un repertorio comportamental muy amplio. Con el fin de evaluar el efecto de la exposición al IMI sobre el comportamiento de abejas pre-recolectoras en un contexto natural, se utilizó una colmena de observación en la que se agregaron abejas adultas recién emergidas. Las mismas fueron identificadas según su fecha de emergencia marcándolas con color en el tórax con un marcador de reinas comercial.

La colmena de observación fue colocada bajo un tinglado para que estuviera resguardada de la lluvia. Además, con el fin de conservar el calor generado por las obreras, fue cubierta con mantas de tela polar que se retiraron solo durante el día al momento de realizar las observaciones. Cada día, se registró las variables climáticas y el estado general de la colmena. Este último incluyó datos referentes a la recolección y el almacenamiento de recursos y al nivel de actividad dentro del nido. Además, se determinaron zonas arbitrarias que dividieron cada cara de un cuadro en 6 cuadrados. Por lo tanto, una abeja podía estar ubicada en cualquier de las 24 zonas de la colmena, 12 de cada lado (Figura 34). Se revisó el contenido de las celdas de cada zona con el fin de caracterizarla. Esto se realizó periódicamente a lo largo del experimento.

Figura 34. Colmena de observación con delimitación de zonas.

Se realizaron marcas adicionales en las abejas de edad conocida con el fin de identificarlas individualmente. Para esto, también se utilizaron marcadores de reina. Para evitar confusiones acerca de la fecha de emergencia del individuo, las marcas adicionales se realizaron sólo con colores correspondientes a fechas de emergencia posterior y con uno adicional que no había sido utilizado. Es decir, teniendo en cuenta el orden diario de colores (rojo, amarillo, verde y azul), las abejas rojas se marcaron con los cuatro colores y blanco y las abejas azules se pintaron sólo con azul y blanco. Las marcas difirieron en forma, tamaño y ubicación (Figura 35). Este proceso se realizó cierto tiempo antes del las observaciones dado que una obrera recientemente pintada puede permanecer un tiempo considerable acicalándose.

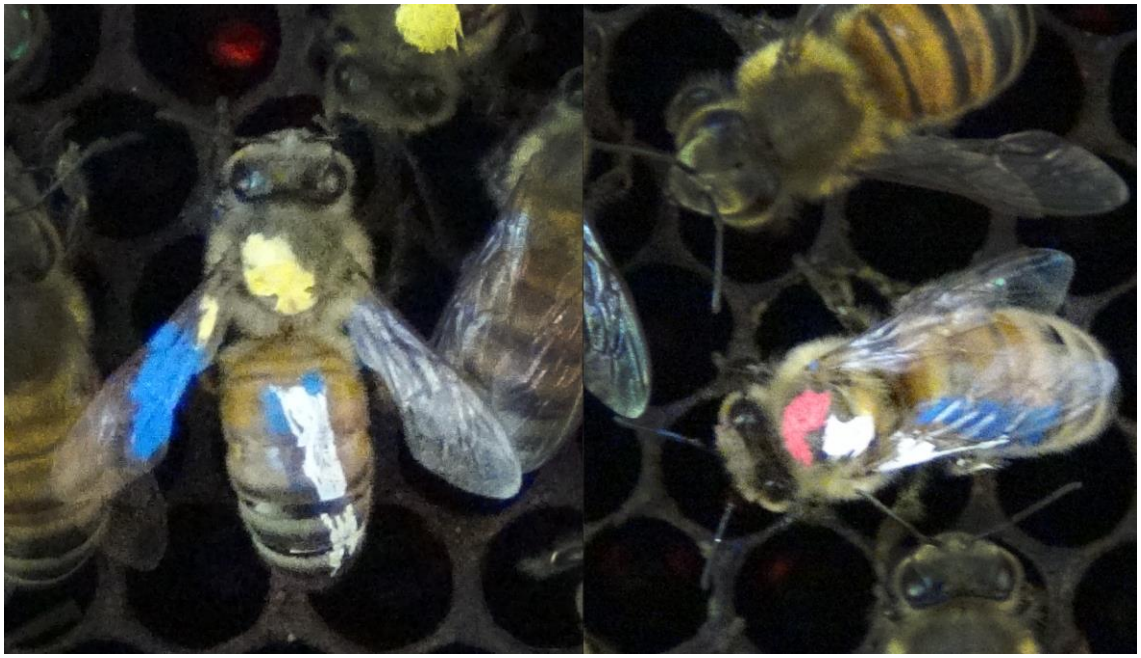

Figura 35. Abejas en una colmena de observación con marcas de color distintivas. Crédito: Grupo INSSOC.

Los registros se realizaron con una cámara filmadora digital Sony HDR-XR260VE. La misma fue colocada en el extremo de un brazo móvil adosado a un pie universal. De esta manera, fue posible ubicar la cámara en el sitio de interés sin necesidad de sostenerla con la mano. Se realizó una observación (pre-tratamiento) de las abejas de edad de interés candidatas a ser expuestas. Se registró la zona y la actividad de la misma. Luego se procedió a ofrecer la solución a las abejas de interés tocando sus antenas con una micropipeta. La abeja experimental fue la primera que hubiera extendido su probóscide y consumido la totalidad de la solución ofrecida. Se esperó diez minutos para realizar la observación (post-tratamiento) de dicha abeja. Durante este intervalo, se siguió a la abeja para no perderla de vista y se registró su comportamiento general mediante notas escritas. Para minimizar la distribución de IMI mediante trofalaxia o por almacenaje en una celda, se capturó a la abeja al final del experimento.

3

Exposición aguda a imidacloprid

Abreviaturas

IMI	Imidacloprid
nAChR	Receptor colinérgico nicotínico

El IMI es un insecticida neonicotinoide que actúa como neurotóxico al alterar el sistema nervioso de insectos, activando agonísticamente los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) (Matsuda *et al.* 2001, Tomizawa y Casida 2003). El modo de aplicación más común en la agricultura es bañando las semillas, de tal manera que la planta asimila la sustancia cuando germina y lo distribuye sistémicamente a medida que crece (Girolami *et al.* 2009). Los insecticidas sistémicos están potencialmente presentes en el néctar o el polen de las plantas tratadas (Schmuck *et al.* 2001, Bonmatin *et al.* 2005, Rortais *et al.* 2005, Girolami *et al.* 2009, Cresswell 2011). De hecho, se han encontrado trazas de IMI en el alimento almacenado (Mullin *et al.* 2010, Wu *et al.* 2011). Se presume que las abejas melíferas recogen accidentalmente el compuesto al colectar recursos como polen y néctar, los cuales son transportados a la colmena y almacenados (Cresswell 2011, Schneider *et al.* 2012). La comida entrante se distribuye rápidamente dentro de la colonia (Nixon y Ribbands 1952, DeGrandi-Hoffman y Hagler 2000) y alcanza a las abejas jóvenes y a las larvas.

Estas abejas obreras, que permanecen dentro de la colmena, pueden obtener información del ambiente al recibir alimento recientemente recolectado (Nixon y Ribbands 1952, Grüter y Farina 2007) o al alimentarse de recursos almacenados dentro de la colmena (Winston 1987). Estos estímulos son mayormente de modalidad quimiosensorial, como el gusto y el olfato (Farina *et al.* 2007, Martinez y Farina 2008). Durante los primeros días de la etapa adulta de una obrera, su sistema nervioso central se sigue desarrollando para completar su maduración. En este proceso, el sistema olfativo es muy importante (Masson y Arnold 1987). Además, las experiencias vividas durante este periodo pueden modular el comportamiento futuro de una abeja. Por ejemplo, abejas jóvenes son capaces de adquirir y retener información olfativa de manera asociativa (Arenas y Farina 2008, Behrends y Scheiner 2009). Este proceso induce cambios a largo plazo en los lóbulos antenales, el centro primario de procesamiento de información olfativa, lo que afecta tanto la adquisición como la consolidación de la memoria olfativa (Faber *et al.* 1999, Daly *et al.* 2004, Arenas *et al.* 2009, Arenas *et al.* 2012). Más aun, las experiencias advertidas dentro de la colmena pueden aumentar la eficiencia de las tareas relacionadas con la recolección de recursos (Goyret y Farina 2005, Balbuena *et al.* 2012). Por lo tanto, los cambios inducidos en abejas jóvenes facilitan la evocación de información adquirida en etapas tempranas y en etapas tardías de la vida de una obrera, tanto a una escala individual como social (Arenas *et al.* 2013).

Los nAChRs se encuentran en los lóbulos ópticos, específicamente en la médula, y en los glomérulos de los lóbulos antenales. En estos últimos es donde las vías aferentes de las antenas hacen sinapsis con neuronas locales y de proyección que luego envían la información olfativa a los cuerpos pedunculados. Éstos son estructuras del protocerebro de carácter integrativo ya que reciben información de diferentes modalidades. Dentro de los cuerpos pedunculados, los nAChRs se localizan en los cálices, región a dónde llegan vías provenientes de los lóbulos antenales, y en los lóbulos α de los pedúnculos, región formada por los axones de las neuronas intrínsecas de los cuerpos pedunculados. Aunque menos, también hay nAChRs en el ganglio subesofágico, estructura que aloja las motoneuronas que dirigen los movimientos de las piezas bucales (Figura 36)

(Gauthier 2010). En resumen, los nAChRs están expresados en regiones del cerebro asociadas con el procesamiento de información visual, olfativa y mecanosensorial, y con el aprendizaje y la memoria.

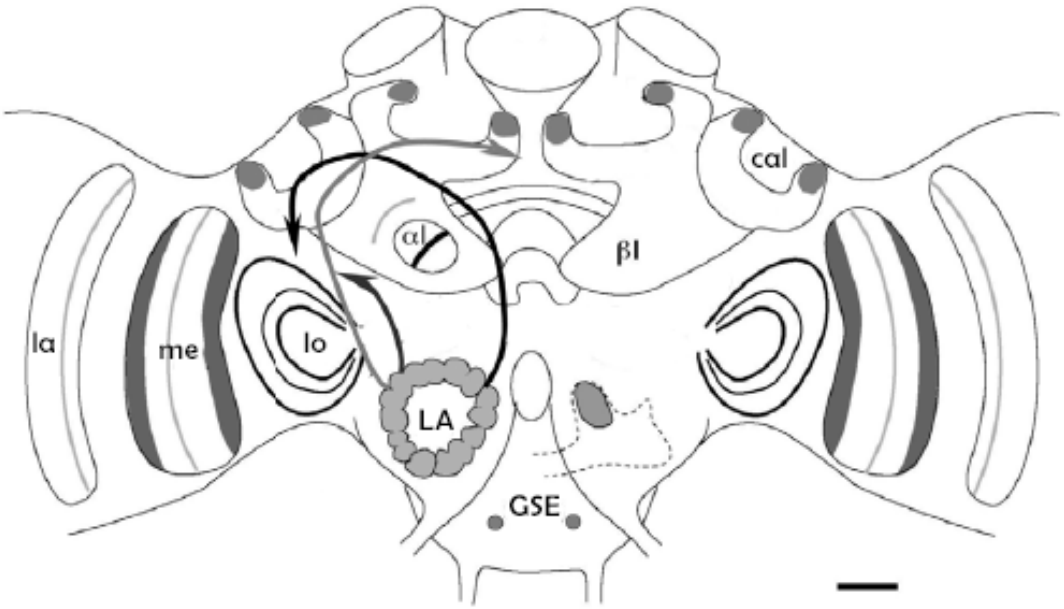

Figura 36. Esquema de localización de los nAChRs en el cerebro de *A. mellifera*. Las áreas grises indican presencia de nAChRs. Lóbulos ópticos: lámina (la), médula (me) y lóbula (lo). Lóbulos antenales (LA) con glomérulos. Cuerpos pedunculados: cálices (cal) y lóbulos α y β (αl y βl). Ganglio subesofágico (GSE). Escala = 100 µm. Figura tomada de (Gauthier 2010).

Dada la cohesión que existe entre individuos de una colonia, las abejas de todas las edades de la colonia son potencialmente susceptibles a los efectos del IMI. Este escenario junto con la plasticidad que presentan las abejas jóvenes frente a estímulos externos, motivó estudiar los efectos del IMI, que actúa como neurotóxico, sobre el comportamiento de abejas pre-recolectoras.

3.1 Comportamiento apetitivo

Abreviaturas

AIC	Criterio de información de Akaike
DMSO	Dimetil sulfóxido
GLM	Modelo lineal generalizado
GLMM	Modelo lineal generalizado mixto
IA	Índice de aprendizaje
IMI	Imidacloprid
MMA	Modelo mínimo adecuado
nAChR	Receptor colinérgico nicotínico
RC	Respuesta condicionada
RE	Respuesta espontánea
REP	Respuesta de extensión de probóscide
RI	Respuesta incondicionada

3.1.1 Introducción

Una abeja que pre-recolectora puede captar el IMI al recibir alimento de compañeras que realizan tareas fuera del nido, ya sea por contacto o por vía oral, o por alimentarse directamente de celdas. Dado que este insecticida es un neurotóxico cuyo blanco son los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs), receptores presentes en regiones del cerebro dedicadas al procesamiento de información, se espera que los procesos de aprendizaje y formación de memoria se vean afectados. Teniendo en cuenta que el cerebro de las abejas obreras sigue madurando durante los primeros días de vida, se consideraron abejas de diferentes edades al momento de evaluar la acción de este compuesto sobre el comportamiento apetitivo de *A. mellifera*. Un componente clave de este aprendizaje es la sensibilidad gustativa. Esta variable no sólo es importante en el establecimiento una asociación entre estímulos olor y néctar (Ramírez *et al.*

2010), sino que además influye sobre su comportamiento recolector y la distribución de néctar dentro del nido (Pankiw *et al.* 2004).

El IMI afecta el aprendizaje olfativo, tanto en la etapa de adquisición como de retención de la memoria (Decourtye *et al.* 2003, Decourtye *et al.* 2004, Williamson *et al.* 2013, Williamson y Wright 2013). Este efecto se evidencia en el adulto aun cuando la exposición ocurrió en el estadio de larva (Yang *et al.* 2012). Esto está relacionado con su acción en y efecto sobre estructuras cerebrales involucradas en este fenómeno (Déglise *et al.* 2002, Palmer *et al.* 2013). Además, afecta la habituación de la respuesta extensión de probóscide (REP), un tipo de aprendizaje no asociativo (Guez *et al.* 2001, Lambin *et al.* 2001). En relación con esta respuesta, también se ha visto que afecta la sensibilidad gustativa (Lambin *et al.* 2001, Eiri y Nieh 2012). Estos trabajos han variado en metodología en cuanto a modo de administración y dosis. Sobre todo, la mayoría evaluó el efecto sobre abejas de edad recolectora. Interesantemente, los que utilizaron abejas de edad pre-recolectora han mostrado efectos contrastantes según la edad de los individuos (Guez *et al.* 2001, Guez *et al.* 2003). El IMI genera un aumento de la cantidad de ensayos necesarios para que las abejas de 7 días logren habituar, mientras que genera una disminución en las abejas de 8 días. Esto profundiza aún más el hecho de que el cerebro de la obrera sigue madurando luego de emergida como adulta, fenómeno que se evidencia en las diferentes tasas de adquisición de aprendizajes del tipo no asociativo (Guez *et al.* 2001) y asociativo (Ray y Ferneyhough 1997).

Por lo tanto, se evaluó el efecto de la exposición aguda al IMI sobre el comportamiento apetitivo de abejas jóvenes de diferente edad. Se utilizaron dosis subletales —la menor, además, es realista a campo (Cresswell 2011)— evaluadas sobre abejas pre-recolectoras y se consideraron dos modos de exposición, por contacto y de manera oral.

3.1.2 Metodología

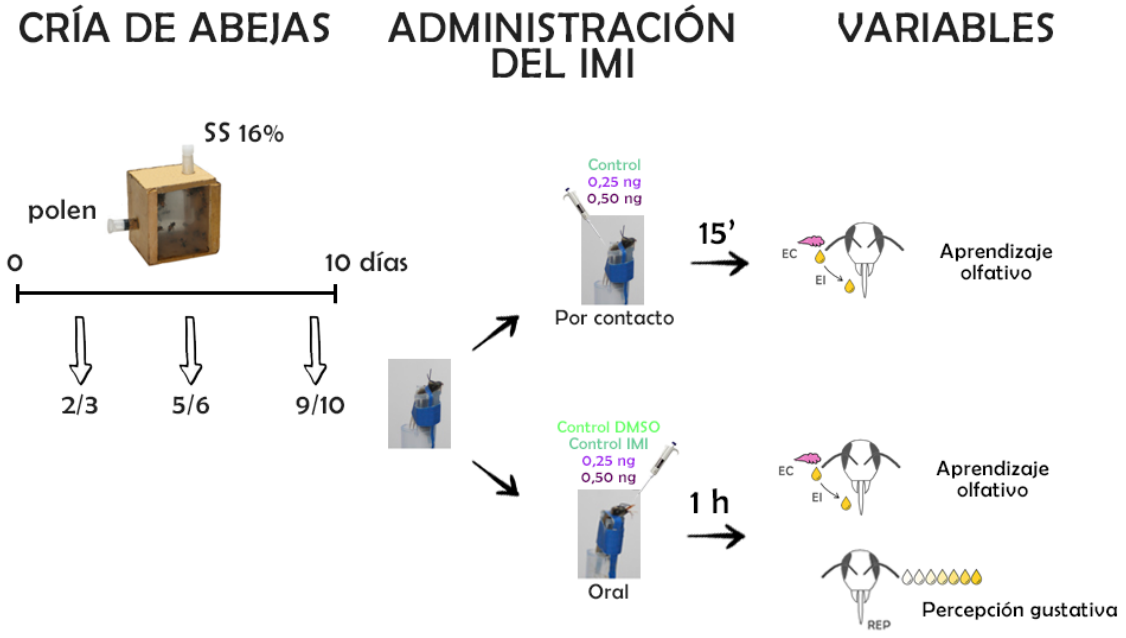

Figura 37. Esquema de procedimiento experimental para evaluar el efecto de la exposición aguda al IMI sobre el comportamiento apetitivo.

3.1.2.1 Series experimentales

Los experimentos se realizaron en las temporadas de verano y otoño de los años 2012, 2013 y 2014. Las abejas adultas emergidas dentro de una incubadora artificial en el laboratorio fueron colocadas en cajas de madera. Este proceso se realizaba cada 24 h, por lo que las 60 a 100 abejas de una misma jaula no tenían más de un día de edad. Las abejas fueron alimentadas *ad libitum* con solución de sacarosa 16 % m/m y polen durante todo el periodo de cría. Las abejas fueron evaluadas a los 2/3, 5/6 o 9/10 días de edad. Al momento del ensayo experimental, cada abeja fue amarrada en los cepos descriptos en la sección 2.3 con la particularidad de que además se aseguró que su tórax quedara expuesto. Luego se las colocó en la incubadora por un tiempo determinado para disminuir el estrés causado por la manipulación.

Cuando la administración del IMI fue topicada, las abejas amarradas fueron retiradas de la incubadora luego de tres horas y divididas en tres grupos experimentales. Se colocó una gota de 1 µl de DMSO solo, o con 0,25 ó 0,50 ng

de IMI en el tórax de cada individuo. El condicionamiento olfativo comenzó quince minutos luego de la administración del IMI.

Cuando la administración del IMI fue oral, las abejas amarradas fueron retiradas de la incubadora luego de dos horas y quince minutos y fueron divididas en cuatro grupos experimentales. Se alimentó a cada abeja con 3 µl de solución de sacarosa 16 % m/m. Un grupo recibió solución de sacarosa sola (Control DMSO), otro recibió solución de sacarosa con DMSO 0,33 % v/v (Control IMI) y los grupos restantes recibieron la última solución más 0,25 ó 0,50 ng de IMI. En esta serie, se agregó un grupo experimental (Control DMSO) para verificar que ingerir el solvente no interfiera con la sensibilidad gustativa de la abeja (Figura 38). El condicionamiento olfativo y la medición de la sensibilidad gustativa comenzaron una hora luego de la administración.

La diferencia de tiempos entre la administración del insecticida y el ensayo experimental según el tipo de administración se debió a que alimentar a la abeja quince minutos antes de los ensayos habría interferido con la motivación del individuo. Por lo tanto, se decidió alimentar a la abeja una hora antes de los ensayos y mantener el tiempo desde que fue amarrada hasta que fue evaluada. Luego del condicionamiento olfativo, las abejas amarradas fueron mantenidas en una incubadora con el fin de evaluar la supervivencia de las mismas.

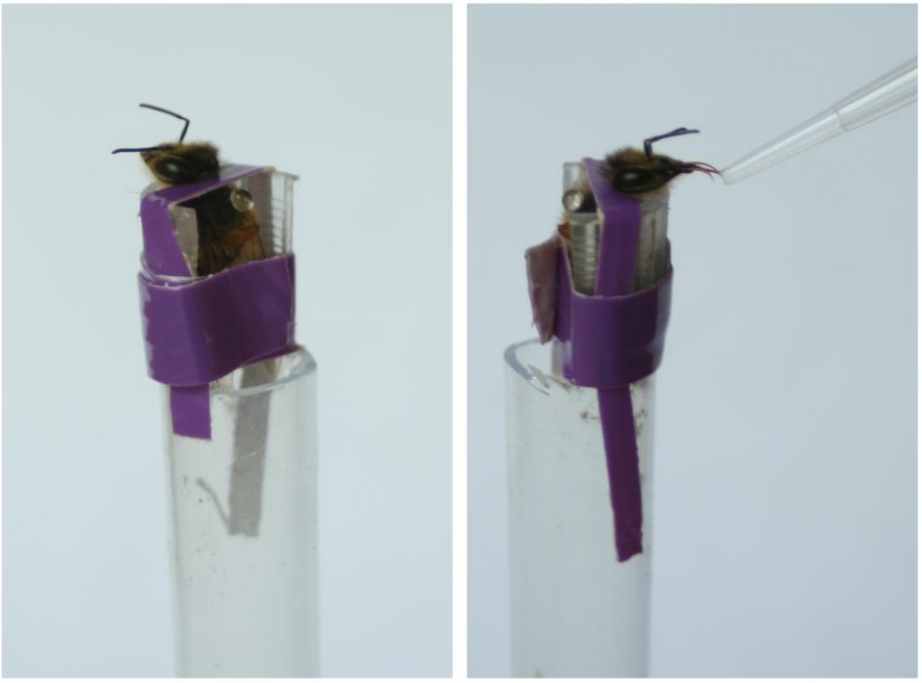

Figura 38. Administración aguda por contacto (izquierda) y oral (derecha) de IMI. Crédito: Grupo INSSOC.

3.1.2.2 Variables medidas

Previo al condicionamiento olfativo, se estimuló a las abejas con solución de sacarosa 50 % m/m con el fin de utilizar sólo aquellos individuos que presentaran la **respuesta incondicionada** (RI), variable que fue cuantificada. El condicionamiento olfativo absoluto se realizó presentando 1-hexanol junto con solución de sacarosa 50 % m/m. A esto se lo consideró un ensayo. Se consideró que una abeja presentó una respuesta espontánea (RE) si extendió su probóscide ante el olor en el primer ensayo. Se registró la **respuesta condicionada** (RC) ante el olor durante los ensayos 2 a 5.

La estimación de la sensibilidad gustativa fue realizada sólo en la serie experimental de administración oral. Las abejas fueron estimuladas con soluciones de sacarosa de concentración creciente. Al final del ensayo se obtuvo un **puntaje** para cada abeja (1-7), el cual corresponde a la cantidad de soluciones de sacarosa ante las cuales el individuo extendió su probóscide. Las abejas con puntaje igual a 0 fueron aquellas que no extendieron su probóscide a la solución de sacarosa 50 % m/m, por lo que fueron excluidas del análisis ya que no se pudo descartar que hubieran tenido un déficit senso-motor.

La **supervivencia** luego de la administración topicada fue evaluada 15 minutos y 2 horas luego de la exposición. Las abejas expuestas oralmente al IMI fueron alimentadas con 50 % m/m y su supervivencia se evaluó a las 2, 20 y 24 horas luego de la exposición. Se consideró muerta a una abeja que no presentaba movimientos de antena y abdomen.

3.1.2.3 Análisis estadístico

El efecto de los factores sobre todas las variables se evaluó mediante el análisis de modelos lineales generalizados (GLM) o modelos lineales generalizados mixtos (GLMM). Los modelos fueron ajustados en el programa R (R Development Core Team 2011), mediante el uso de la función glm para el primer caso y la función glmer del paquete lme4 (Bates *et al.* 2015) para el segundo. Se evaluó cada modelo posible y se compararon entre sí utilizando la parsimonia y los valores de AIC (*Akaike's Information Criterion*) como criterios, luego de lo cual se eligió el modelo mínimo adecuado (MMA). Las

comparaciones *a posteriori* se realizaron utilizando la función glht del paquete multcomp (Hothorn *et al.* 2008).

En el estudio del aprendizaje asociativo, se excluyó a las abejas con una respuesta espontánea al olor. Se realizó un análisis separado para cada modo de exposición. La comparación de desempeños durante la fase de entrenamiento entre tratamientos se evaluó mediante un GLMM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento con IMI, la edad y el ensayo como factores fijos y la abeja como factor aleatorio. El efecto del tratamiento sobre la retención de memoria se evaluó mediante un GLM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó al tratamiento con IMI y la edad como factores fijos.

La sensibilidad gustativa se estimó utilizando un puntaje arbitrario (ver sección 2.3). El efecto del tratamiento sobre esta variable se evaluó mediante un GLM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento con IMI y la edad como factores fijos.

Para el estudio de supervivencia, se contabilizó el número de abejas vivas 15 minutos y 2 horas luego de la exposición por contacto, y 2, 20 y 24 horas luego de la exposición oral. Se realizó un análisis separado para cada modo de exposición. El efecto de los factores sobre esta variable se evaluó mediante un GLMM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento con IMI, la edad y el tiempo post-exposición como factores fijos y la abeja como factor aleatorio.

La respuesta de extensión de probóscide ante la solución de sacarosa 50 % m/m (RI) se evaluó en varios momentos de los protocolos. En el caso de la exposición por contacto, se midió solo después del condicionamiento olfativo. En el caso de la exposición oral, se midió antes de los protocolos, después del condicionamiento olfativo y al final del protocolo de umbral de respuesta a la sacarosa. Se realizó un análisis separado para cada momento de evaluación. El efecto del IMI sobre esta variable se evaluó mediante un GLM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento con IMI y la edad como factores fijos.

3.1.3 Resultados

3.1.3.1 Aprendizaje olfativo

Con el fin de evaluar la capacidad de establecer una memoria asociativa, las abejas fueron sometidas a un condicionamiento olfativo 15 minutos luego de la exposición por contacto y una hora luego de la exposición oral al IMI. El condicionamiento consistió en una fase de entrenamiento de cinco ensayos y una fase de evaluación de un ensayo. Se evaluó la respuesta de extensión de probóscide ante la presencia del olor.

La exposición por contacto al IMI pareció afectar la probabilidad de REP en el entrenamiento de abejas de 2/3 días de edad, pero no de edades mayores (Figura 39, izquierda). Sin embargo, el análisis estadístico indicó que el IMI por contacto afectó esta variable independientemente de la edad, ya que el modelo mínimo adecuado no ponderó la interacción entre estos factores (GLMM con estructura binomial, REP ~ IMI + Ensayo + Abeja, Tabla 5). Es más, el desempeño durante la fase de entrenamiento fue similar entre edades, ya que este factor fue excluido del conjunto de variables explicatorias. Las dosis de IMI no difirieron entre sí y provocaron una menor proporción de abejas con respuesta condicionada en todos los ensayos (Figura 40). En cuanto a la evaluación, el efecto aparente del IMI fue similar al observado en el entrenamiento en cuanto a la dependencia de la edad (Figura 39, derecha). Sin embargo, en este caso el análisis estadístico indicó que el IMI no afectó la probabilidad de REP (GLM con estructura binomial, REP ~ Edad , Tabla 6). No obstante, la retención olfativa difirió según la edad, donde las abejas de 2/3 días mostraron una probabilidad de REP más alta que las de mayor edad (Figura 39, sin discriminar por tratamiento). En resumen, **las abejas expuestas por contactoa ambas dosis de IMI mostraron un desempeño empobrecido durante el entrenamiento en comparación con las abejas control, pero no en la fase de evaluación**.

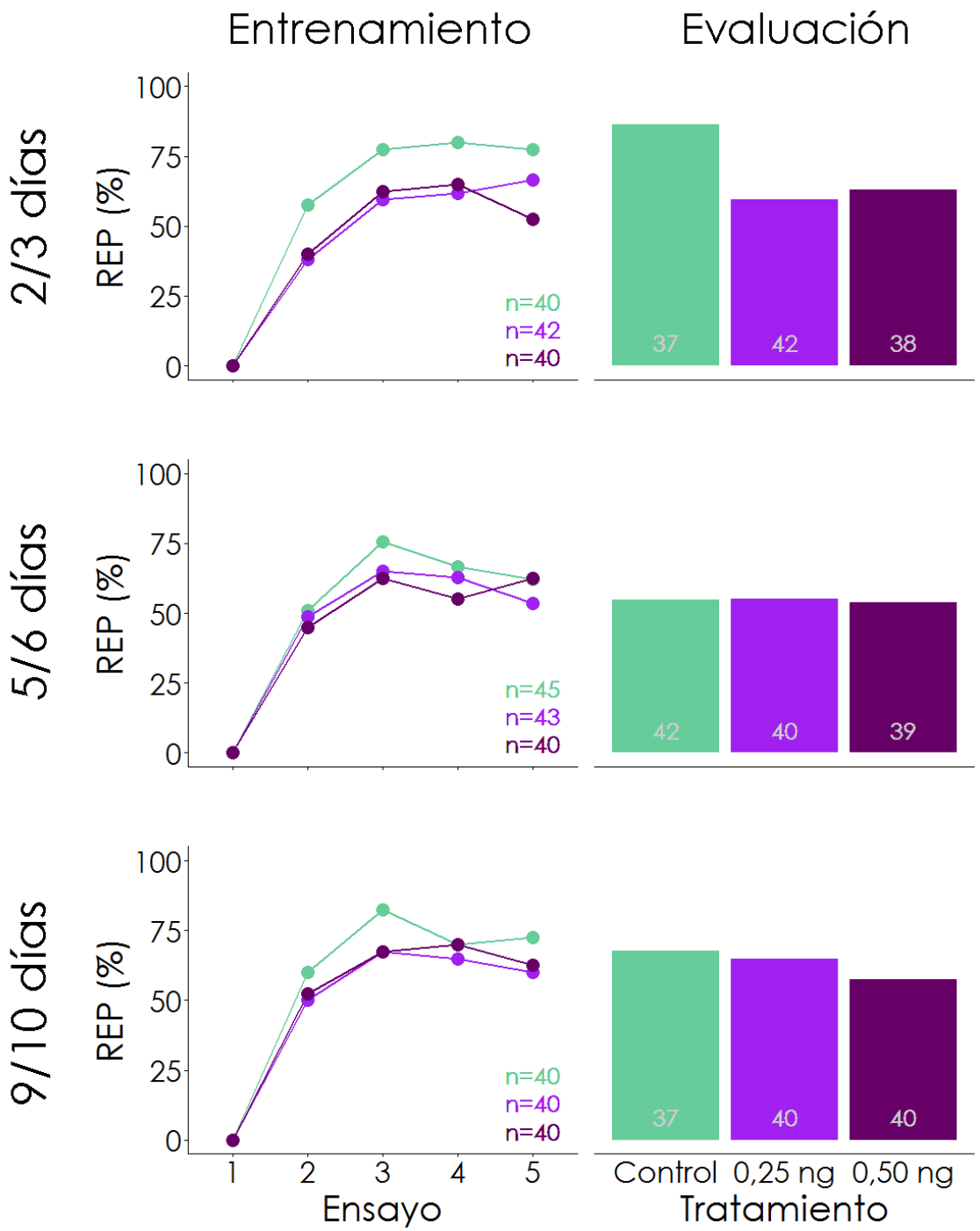

Figura 39. Efecto de la exposición aguda por contacto al IMI sobre el aprendizaje olfativo de abejas jóvenes. Las abejas de 2/3, 5/6 o 9/10 días de edad fueron topicadas en el tórax con 0 (aguamarina), 0,25 (violeta) o 0,50 ng (índigo) de IMI disuelto en DMSO. Quince minutos después fueron sometidas a un condicionamiento clásico absoluto. Se cuantificó el porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (REP) ante el olor a lo largo de cinco ensayos de entrenamiento (izquierda) y en un único ensayo de evaluación, quince minutos luego del entrenamiento (derecha). Los números dentro de las barras indican el tamaño muestral.

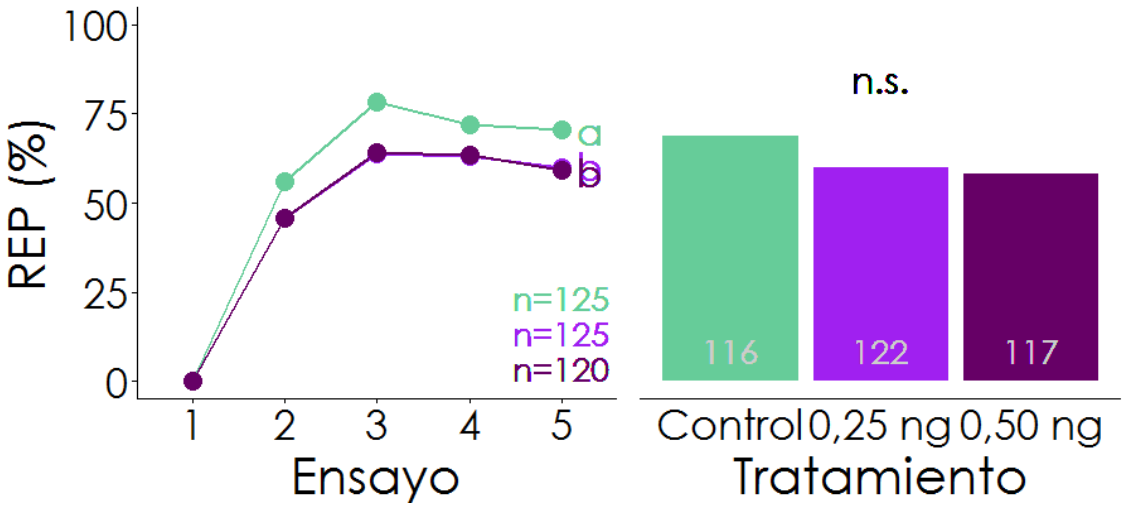

Figura 40. Efecto de la exposición aguda por contacto al IMI sobre el aprendizaje olfativo de abejas jóvenes (sin distinguir por edad). Las abejas fueron topicadas en el tórax con 0 (aguamarina), 0,25 (violeta) o 0,50 ng (índigo) de IMI disuelto en DMSO. Quince minutos después fueron sometidas a un condicionamiento clásico absoluto. Se cuantificó el porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (REP) ante el olor a lo largo de cinco ensayos de entrenamiento (izquierda) y en un único ensayo de evaluación, quince minutos luego del entrenamiento (derecha). Los números dentro de las barras indican el tamaño muestral. Las letras diferentes simbolizan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos indicados. "n.s" indica diferencias no significativas. MMAs: REP ~ IMI + Ensayo + Abeja (entrenamiento), REP ~ Edad (evaluación).

La exposición oral al IMI afectó el desempeño durante el entrenamiento, al disminuir la probabilidad de REP en todos los ensayos. La magnitud del efecto dependió de la edad de las abejas, ya que el modelo mínimo adecuado ponderó la interacción entre estos factores (GLMM con estructura binomial, REP ~ IMI*Edad + Ensayo + Abeja, Tabla 7). En el caso de abejas de 2/3 y 9/10 días, la aplicación de ambas dosis de IMI resultó en el mismo nivel de deterioro de adquisición. En cambio, las abejas de edad intermedia se vieron afectadas por el IMI de una manera dosis dependiente (Figura 41, izquierda). Además, los desempeños de las abejas de ambos grupos control fueron similares entre sí. En cuanto a la evaluación, el efecto del IMI fue independiente de la edad (GLM con estructura binomial, REP ~ IMI + Edad, Tabla 8). La ingesta de 0,50 ng de IMI redujo la retención de memoria de abejas de todas las edades. El efecto de la dosis más baja siguió la misma tendencia, pero fue estadísticamente indefinido ya que los niveles de este grupo no difirieron de los del grupo que recibió la dosis más alta ni de los del grupo Control IMI. Sorprendentemente, el porcentaje de abejas con REP del grupo Control IMI fue diferente del grupo Control DMSO por lo que no se puede descartar un efecto del solvente (Figura

42). Nuevamente, la retención difirió según la edad, pero en este caso las abejas de hasta 6 días mostraron una probabilidad de REP mayor que las de 9/10 días. En resumen, **las abejas expuestas oralmente al IMI mostraron un desempeño empobrecido durante el entrenamiento y en la fase de evaluación**.

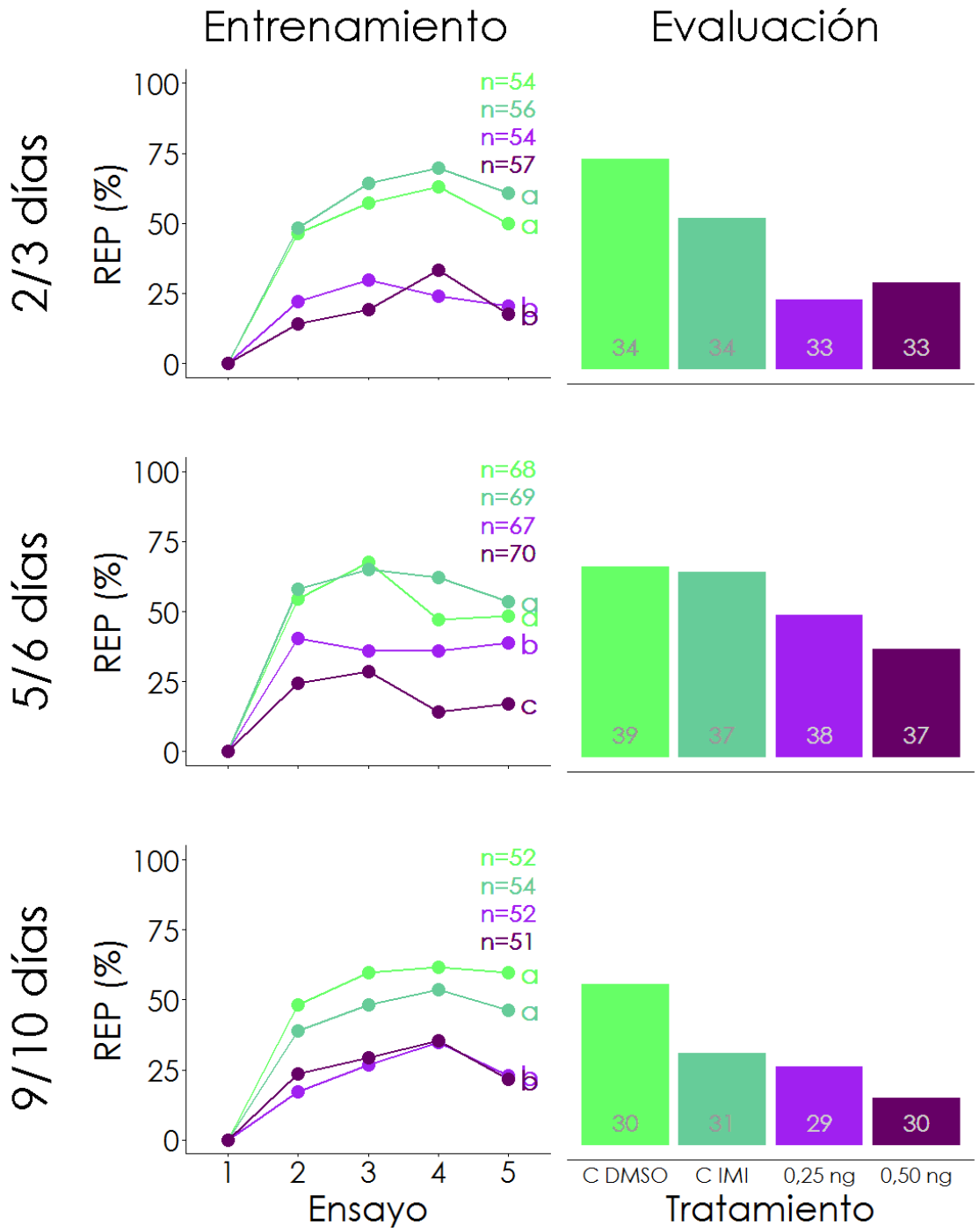

Figura 41. Efecto de la exposición aguda oral al IMI sobre el aprendizaje olfativo de abejas jóvenes. Las abejas de 2/3, 5/6 o 9/10 días de edad fueron alimentadas con solución de sacarosa sola (Control DMSO, verde) o solución de sacarosa con DMSO (Control IMI, aguamarina) o la última más 0,25

(violeta) o 0,50 ng (índigo) de IMI. Una hora después fueron sometidas a un condicionamiento clásico absoluto. Se cuantificó el porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (REP) ante el olor a lo largo de cinco ensayos de entrenamiento (izquierda) y en un único ensayo de evaluación, quince minutos luego del entrenamiento (derecha). Los números dentro de las barras indican el tamaño muestral. Las letras diferentes simbolizan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos indicados. "n.s." indica diferencias no significativas. MMAs: REP ~ IMI*Edad + Ensayo + Abeja (entrenamiento), REP ~ IMI + Edad (evaluación).

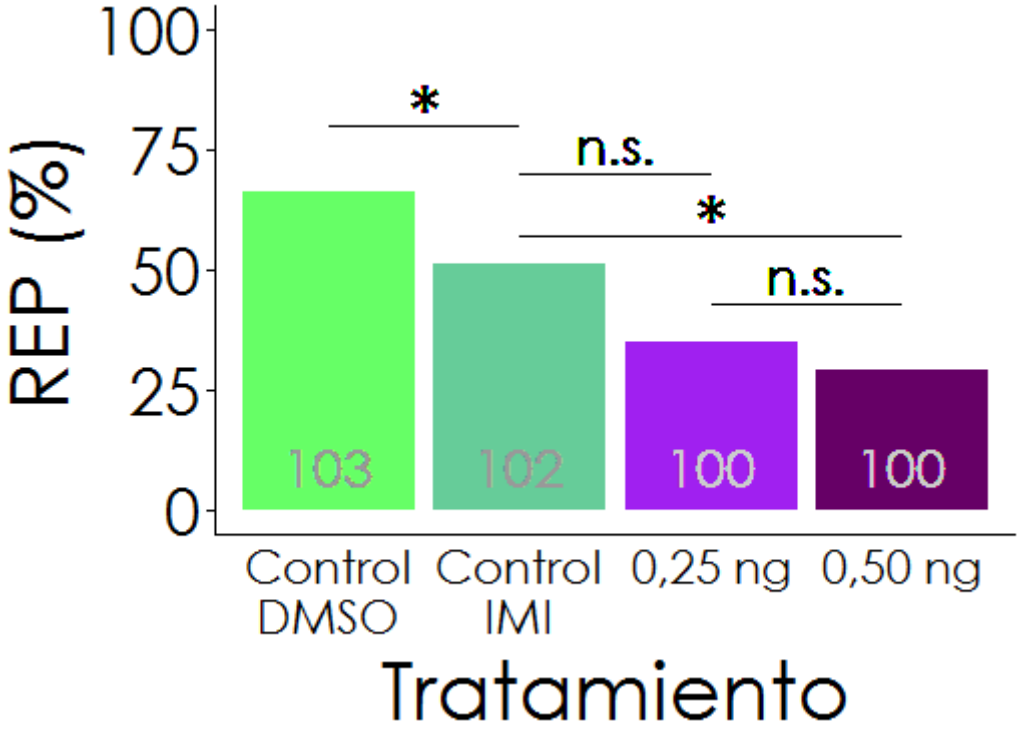

Figura 42. Efecto de la exposición aguda oral al IMI sobre la evaluación del aprendizaje olfativo de abejas jóvenes de todas las edades. Las abejas fueron alimentadas con solución de sacarosa sola (Control DMSO, verde) o solución de sacarosa con DMSO (Control IMI, aguamarina) o la última más 0,25 (violeta) o 0,50 ng (índigo) de IMI. Se muestran los resultados de cuantificar el porcentaje de abejas de todas las edades que extendieron su probóscide (REP) ante el olor en la evaluación. Los números dentro de las barras indican el tamaño muestral. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos indicados. "n.s." indica diferencias no significativas. MMA: REP ~ IMI + Edad.

3.1.3.2 Percepción gustativa

Con el fin de evaluar la sensibilidad gustativa, las abejas fueron estimuladas con soluciones sacarosa de concentración creciente. La evaluación se realizó una hora luego de la exposición oral al IMI.

La ingesta de IMI afectó la probabilidad de REP, independientemente de la edad de las abejas (GLM con estructura binomial, Puntaje ~ IMI + Edad, Tabla 9). La ingesta del solvente DMSO no afectó la propensión de las abejas de

cualquier edad a extender la probóscide ante la sacarosa (Figura 43, verde vs. aguamarina). Por el contrario, la ingesta del insecticida afectó la sensibilidad gustativa de abejas de todas las edades. Las abejas que ingirieron IMI mostraron un puntaje menor —y, por lo tanto, un umbral de respuesta mayor— que las abejas del grupo Control IMI. Las dosis de IMI no difirieron entre sí, dado que ambas tuvieron el mismo efecto depresor sobre el puntaje (Figura 43, izquierda). Además, el puntaje varió según la edad de las abejas. Las abejas de 2/3 días presentaron un puntaje mayor que el de las de 5/6 días. No obstante, el grupo de 9/10 días de edad se mantuvo estadísticamente indefinido, ya que su umbral no se distinguió del de los otro dos grupos (Figura 43, derecha). En resumen, **las abejas que ingirieron IMI mostraron un umbral de respuesta a la sacarosa mayor que el de las abejas del grupo Control**.

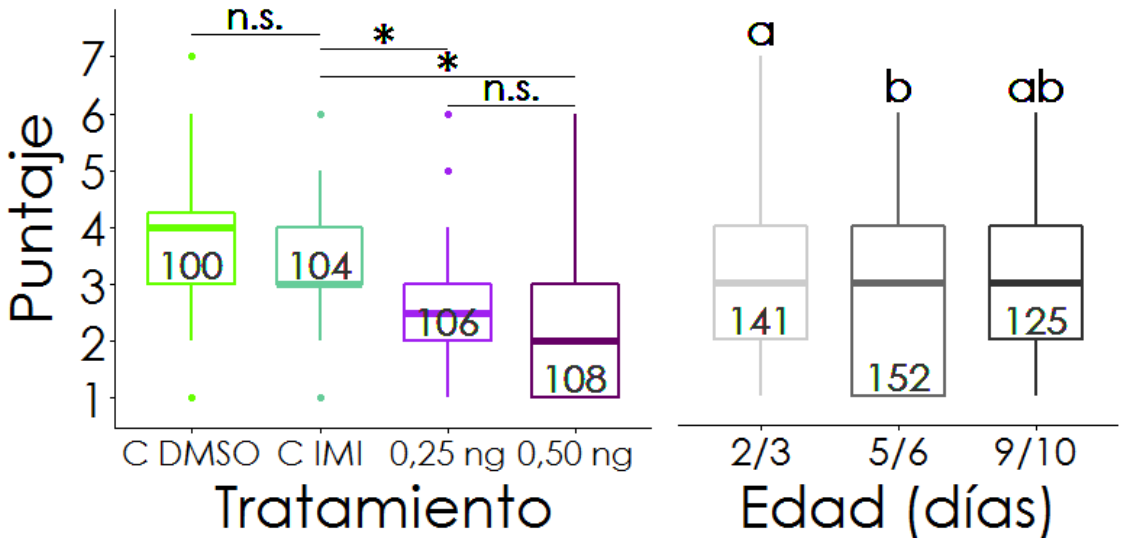

Figura 43. Efecto de la exposición aguda oral al IMI sobre la percepción gustativa de abejas jóvenes. Las abejas de 2/3 (gris claro), 5/6 (gris medio) o 9/10 (negro) fueron alimentadas con solución de sacarosa sola (Control DMSO, verde) o solución de sacarosa con DMSO (Control IMI, aguamarina) o la última más 0,25 (violeta) o 0,50 ng (índigo) de IMI. Una hora después fueron sometidas a un protocolo de umbral de respuesta a la sacarosa. Se calculó un puntaje para cada abeja. El cuadrado, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Los asteriscos y "n.s." señalan diferencias significativas y no significativas (α = 0,05), respectivamente, entre los tratamientos indicados. Las letras diferentes reflejan diferencias significativas entre los grupos de edad. MMA: Puntaje ~ IMI + Edad.

3.1.3.3 Mortalidad y capacidad sensomotora

Con el fin de confirmar que las dosis utilizadas son subletales para abejas de 2 a 10 días de edad, se evaluó la supervivencia de las abejas utilizadas para los ensayos comportamentales. Para ello, se mantuvieron amarradas en los cepos y se midió la mortalidad 15 minutos y 2 horas luego de la exposición por contacto y 2, 20 y 24 horas luego de la exposición oral. El IMI aplicado tópicamente no afectó el número de abejas vivas de ninguna edad (Figura 44, izquierda; GLMM con estructura binomial, Abeja viva ~ Tiempo + Abeja, Tabla 10). Sin distinguir entre edades, la supervivencia de abejas control, expuestas a 0,25 ng y a 0,50 ng de IMI llegó a 85,65 %, 86,12 % y 86,41 %, respectivamente. Para todas las edades, la supervivencia de las abejas que ingirieron el IMI no difirió de las de abejas control, incluso 24 horas luego de la administración (Figura 44, derecha; GLMM con estructura binomial, Abeja viva ~ Tiempo + Abeja, Tabla 11). A las 24 horas, la supervivencia de abejas control llegó a 69,17 % y 72,46 % (Controles DMSO e IMI, respectivamente) y la de abejas que ingirieron 0,25 ng y 0,50 ng de IMI, a 72,03 % y 71,74 %, respectivamente. En resumen, **las dosis utilizadas no afectaron la mortalidad**.

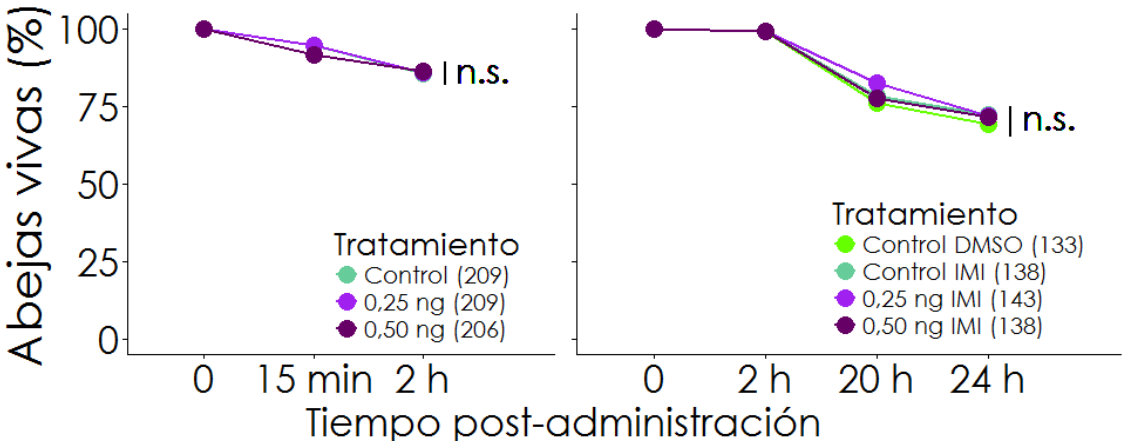

Figura 44. Efecto de la exposición al IMI por contacto (izquierda) u oral (derecha) sobre la supervivencia de abejas jóvenes. Las abejas de 2/3, 5/6 o 9/10 días de edad utilizadas para los ensayos comportamentales se mantuvieron amarradas en los cepos y se evaluó su supervivencia. En el caso de la exposición por contacto, las abejas fueron topicadas en el tórax con 0 (aguamarina), 0,25 (violeta) o 0,50 ng (índigo) de IMI disuelto en DMSO y se midió la supervivencia 15 minutos y 2 horas después. En el caso de la exposición oral, las abejas fueron alimentadas con solución de sacarosa sola (Control DMSO, verde) o solución de sacarosa con DMSO (Control IMI, aguamarina) o la última más 0,25 (violeta) o 0,50 ng (índigo) de IMI y se midió la supervivencia 2, 20 y 24 horas después. "n.s." indica diferencias no

significativas ($p < 0,05$). MMAs: Abeja viva ~ Tiempo + Abeja (contacto), Abeja viva ~ Tiempo + Abeja (oral).

Con el fin de verificar que las dosis de IMI no afectan las capacidades sensorial y motora para extender la probóscide ante la presentación de solución de sacarosa 50 % m/m, se estudió esta respuesta incondicionada. El efecto del IMI por contacto fue estudiado solo luego del condicionamiento olfativo dado que la aplicación del tratamiento se realizó sobre aquellas abejas que habían presentado la respuesta incondicionada. Las abejas que fueron topicadas con IMI no mostraron una propensión diferente a extender su probóscide ante solución de sacarosa 50 % m/m (GLM con estructura binomial, REP ~ Edad, Tabla 12). Los valores de respuesta incondicionada luego de la exposición por contacto se encontraron entre 96,67 % y 97,6 % (Tabla 2). El IMI oral no afectó la probabilidad de RI en ninguno de los momentos considerados, antes (GLM con estructura binomial, REP ~ 1, Tabla 13) y después (GLM con estructura binomial, REP ~ IMI, comparaciones *a posteriori* no significativas, Tabla 14) del condicionamiento olfativo y al final del protocolo de umbral de respuesta a la sacarosa (GLM con estructura binomial, REP ~ IMI + Edad, comparaciones *a posteriori* entre niveles de IMI no significativas, Tabla 15). Los valores de respuesta incondicionada luego de la exposición oral se encontraron entre 94,92 % y 100 % (Tabla 3). En resumen, **las dosis utilizadas no afectar la REP a solución de sacarosa 50 % m/m**.

Tabla 2. Efecto de la exposición al IMI por contacto sobre la respuesta incondicionada de abejas jóvenes.

Tratamiento	n	REP (%)
Control	120	96,67
0,25 ng IMI	125	97,60
0,50 ng IMI	120	97,50

Cantidad de abejas evaluadas (n) y porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (REP) ante la solución de sacarosa 50 % m/m luego del condicionamiento olfativo absoluto.

Tabla 3. Efecto de la exposición al IMI oral sobre la respuesta incondicionada de abejas jóvenes.

Tratamiento	Antes del condicionamiento		Luego del condicionamiento		Luego del protocolo URS	
	n	REP (%)	n	REP (%)	n	REP (%)
Control DMSO	227	96,91	106	97,17	167	98,20
Control IMI	236	95,34	104	98,08	160	100,00
0,25 ng IMI	235	95,32	101	100,00	179	96,65
0,50 ng IMI	236	94,92	105	95,24	157	98,09

Cantidad de abejas evaluadas (n) y porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (REP) ante la solución de sacarosa 50 % m/m antes y después del condicionamiento olfativo y luego del protocolo de medición del umbral de respuesta a la sacarosa (URS).

3.1.4 Discusión

En este capítulo se planteó como objetivo estudiar las consecuencias de exponer obreras jóvenes al IMI, el insecticida neonicotinoide más utilizado globalmente, sobre su comportamiento apetitivo. Estas abejas son miembros de la colonia que muestran alta plasticidad fisiológica y comportamental (Arenas *et al.* 2013) y realizan tareas fundamentales dentro de la colmena que garantizan el mantenimiento y cuidado del nido (Lindauer 1952, Seeley 1982). De acuerdo con la evidencia obtenida en esta sección, se puede concluir que las dosis de IMI elegidas afectan la sensibilidad a la sacarosa y la capacidad de aprendizaje olfativo de abejas jóvenes.

El efecto del IMI sobre el aprendizaje olfativo es bien conocido en abejas de edad recolectora (Decourtye *et al.* 2003, Decourtye *et al.* 2004, Yang *et al.* 2012, Williamson *et al.* 2013, Williamson y Wright 2013, Wright *et al.* 2015). Sin embargo, no se había investigado su efecto sobre abejas jóvenes. En esta Tesis, además, se consideraron abejas de diferentes edades con el objetivo de dilucidar si existen cambios en las vías colinérgicas nicotínicas a lo largo de los primeros días de vida adulta. Éste se fundó en evidencias previas que reportaron efectos contrastantes del IMI sobre otro tipo de aprendizaje, no asociativo, la habituación (Guez *et al.* 2001). El efecto del IMI sobre la sensibilidad gustativa observado en abejas jóvenes, que fue independiente de la edad, es similar que el encontrado en abejas recolectoras; en ambos casos, la alteración ocurre en el

mismo sentido. Las dosis utilizadas son similares, con la excepción de que las abejas recolectoras de néctar exhiben una sensibilidad al IMI con 0,21 ng de este compuesto, mientras que las recolectoras de polen se ven afectadas recién con 2,16 ng (Eiri y Nieh 2012). La reducción de la sensibilidad a la sacarosa también se encontró al utilizar otros neonicotinoides, como thiametoxam y acetamiprid (El Hassani *et al.* 2008, Aliouane *et al.* 2009).

Toxicidad diferencial según modo de exposición

Cuando se aplicó de manera topicada, ambas dosis de IMI tuvieron un efecto negativo sobre la adquisición de las abejas de todas las edades, pero no afectaron la retención de memoria. La exposición oral al IMI redujo la probabilidad de REP, pero su efecto fue más pronunciado que el de la exposición por contacto. Por un lado, promediando entre edades, mientras que 0,5 ng de IMI topicado redujo el porcentaje de REP en el quinto ensayo de 70,40 % a 59,17 % en comparación con el grupo control, la misma dosis administrada de manera oral produjo un déficit mayor (53,55 % a 18,75 %). Por el otro, el IMI topicado no afectó la retención de memoria olfativa mientras que el IMI oral afectó ambas fases de formación de memoria. Este efecto diferencial es esperable dado que la toxicidad oral es mayor que la toxicidad dérmica (Suchail *et al.* 2000, Nauen *et al.* 2001), fenómeno que se observó para otros neonicotinoides (El Hassani *et al.* 2008, Aliouane *et al.* 2009, Decourtye y Devillers 2010). Esto puede estar relacionado con la rápida translocación del IMI al sistema digestivo mientras que la aplicación por contacto depende de la absorción pasiva. Es más, la administración oral representa una situación más realista para las abejas dado que recolectan en sistemas agrícolas expuestos a pesticidas, ingieren los recursos contaminados y los comparten con la colonia.

Relación entre sensibilidad gustativa y aprendizaje

El tratamiento con IMI no afectó la respuesta incondicionada a solución de sacarosa 50 % m/m. No obstante, la ingesta de IMI afectó la sensibilidad gustativa aumentando el umbral de respuesta al azúcar. Esto significa que la solución de sacarosa 50 % m/m no tiene el mismo valor relativo para abejas correspondientes a diferentes tratamientos. Para una abeja con un umbral de respuesta elevado, una solución muy concentrada está subvaluada en comparación con una abeja con un umbral más bajo. En este sentido, la

sensibilidad a la recompensa depende del umbral de respuesta de la abeja. Uno puede esperar que una recompensa elevada promueva una asociación fuerte con un estímulo condicionado, y viceversa (Page y Erber 2002). Por lo tanto, una abeja con un umbral bajo mostraría un mejor desempeño en un condicionamiento clásico que una abeja con un umbral alto. Esto mismo se obtuvo cuando se compararon los resultados de sensibilidad gustativa con los de aprendizaje olfativo (Figura 45). Como no se utilizó el mismo grupo de abejas para medir ambas variables, no fue correcto realizar un análisis de correlación. Se calculó un índice de aprendizaje (IA) para cada abeja como la suma de respuestas condicionadas a lo largo de la fase de entrenamiento. Considerando todas las edades, las abejas control mostraron un puntaje y un IA altos mientras que las abejas tratadas con IMI mostraron un puntaje y un IA bajos. En otras palabras, la sensibilidad baja debido a la administración de IMI se asoció con un déficit en el aprendizaje. Este tipo de relación se ha visto en otros trabajos, donde abejas que presentaron un bajo umbral de respuesta al azúcar mostraron una mejor retención de memoria (Scheiner *et al.* 2004, Ramírez *et al.* 2010). Entonces, el déficit en la adquisición y la retención de una memoria olfativa está acompañado, si no causado por, cambios en la sensibilidad a la recompensa.

Diferencias entre edades

Dado que el IMI actúa como neurotóxico y que el sistema nervioso se sigue desarrollando durante la vida adulta de una abeja, se esperaba que los efectos encontrados fueran dependientes de la edad de exposición. Esta hipótesis fue propuesta por primera vez cuando se estudió el efecto del IMI y sus metabolitos sobre la habituación de abejas jóvenes (Guez *et al.* 2001, Guez *et al.* 2003). Las abejas recién emergidas (2/3 días) fueron las más afectadas por cualquier tratamiento con IMI. Las abejas de 5/6 días fueron diferencialmente sensibles a las dosis de IMI ingeridas. Es pertinente recordar que las abejas de 5-8 días muestran mayor retención que abejas de 9-12 días (Arenas y Farina 2008). Además, es interesante destacar que al comparar entre edades dentro de un mismo tratamiento (mismo color, diferente forma), los puntajes más bajos suelen pertenecer a abejas de 5/6 días (triángulos) a pesar de que éstas presentan niveles de adquisición similares al resto (Figura 45). En otras palabras, estas abejas lograron desempeños similares en un condicionamiento a

pesar de tener umbrales de respuesta al azúcar más altos. Esto sugiere que la sensibilidad gustativa y la capacidad de aprendizaje en abejas pre-recolectras dependen de la edad, pero esta relación no es lineal. En este sentido, el desarrollo del sistema nervioso olfativo durante los primeros días luego de la emergencia como adulto (Masson y Arnold 1987, Morgan *et al.* 1998, McQuillan *et al.* 2012) puede explicar, al menos en parte, los cambios no lineales encontrados en este estudio y otros relacionados (Arenas *et al.* 2013).

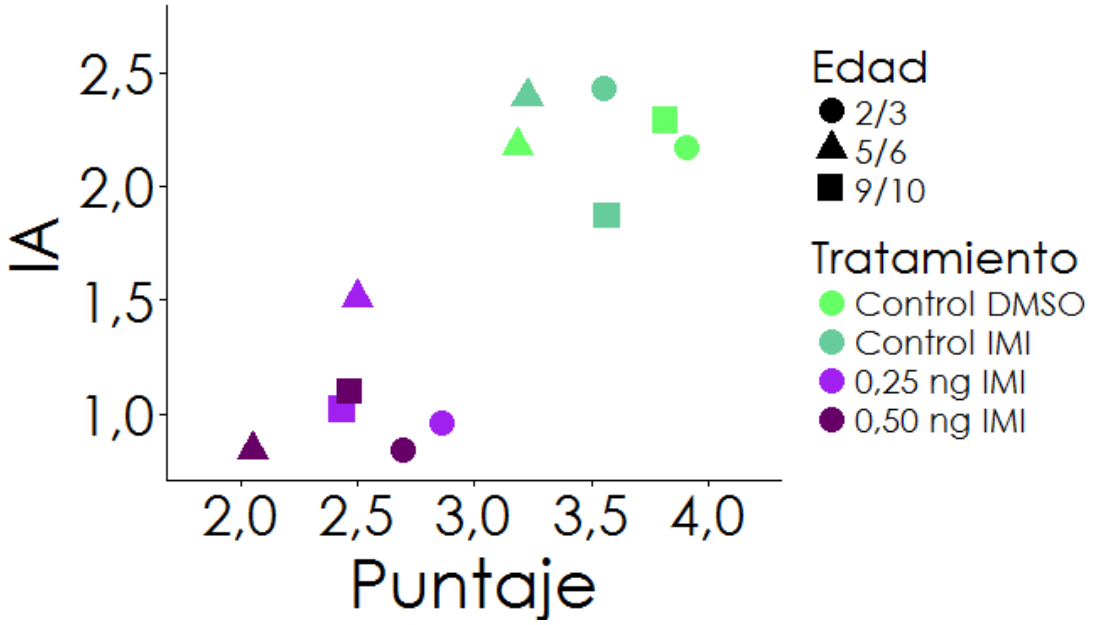

Figura 45. Relación entre la capacidad de aprendizaje y la sensibilidad gustativa de abejas jóvenes luego de haber ingerido IMI. Valores medios de puntaje e índices de aprendizaje (IA) de diferentes grupos de abejas. Cada símbolo representa la combinación de valores de puntaje e IA de dos grupos con las mismas condiciones experimentales (edad y tratamiento).

3.2 Detección olfativa

Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
AIC	Criterio de información de Akaike
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Electroantenograma
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
GLMM	Modelo lineal generalizado mixto
GSE	Ganglio subesofágico
IMI	Imidacloprid
LA	Lóbulo antenal
MMA	Modelo mínimo adecuado
MB	Cuerpo peduculado
nAChR	Receptor colinérgico nicotínico
NRO	Neurona receptora olfativa
PUO	Proteína de unión a odorante
REP	Respuesta de extensión de probóscide
RO	Receptor olfativo

3.2.1 Introducción

El rol del sistema olfativo es decodificar el universo de moléculas volátiles del ambiente y moldearlas a piezas de información relevante, lo que permite al animal tomar decisiones y realizar comportamientos pertinentes. El primer paso consta de traducir las características fisicoquímicas de las moléculas odoríferas al lenguaje de los receptores ubicados en las antenas, el órgano de detección olfativa de las abejas. Los receptores olfativos detectan rasgos particulares de las moléculas, lo que da lugar a un proceso de transducción donde la señal detectada se convierte en actividad eléctrica. Esto genera un código de combinación que converge en estructuras cerebrales dedicadas a procesar las señales para que la molécula inicial quede representada en un espacio perceptual. Este último será el involucrado en la ejecución de comportamientos, dentro de los cuales el aprendizaje olfativo es sumamente

importante en la vida de una abeja. Éste requiere vincular un olor con un estímulo relevante y significativo para el animal. En esta Tesis, ese estímulo es uno apetitivo, de modalidad gustativa.

La detección periférica comienza a nivel de las neuronas receptoras olfativas (NROs), las cuales se localizan dentro sensilias olfativas (Goodman 2003). En las antenas de la abeja *A. mellifera*, éstas son principalmente del tipo placoideo. Tienen forma de plato ovalado y numerosos poros invervados por entre 5 y 35 NROs, bañadas en hemolinfa (Esslen y Kaissling 1976). En los insectos, las moléculas odoríferas llegan a las dendritas de las NROs luego de difundir a través de la hemolinfa, a veces ayudadas por proteínas de unión a odorantes (PUOs). Allí, se unen a los receptores olfativos (ROs), proteínas ubicadas en la membrana de las NROs (Leal 2013). Los axones de las NROs forman el nervio antenal y llegan a los lóbulos antenales (LAs), el centro olfatorio primario del cerebro de un insecto.

En las NROs se genera un proceso de transducción, en el cual la señal de un olor se convierte en actividad eléctrica. Los ROs son proteínas transmembrana y están acoplados a una proteína G. Cuando un ligando se une al RO, se activa la proteína G. La misma activa a la adenilato ciclasa (AC) y se genera el segundo mensajero AMPc, lo que da lugar a la fosforilación de canales iónicos. Todo este mecanismo resulta en la inducción de una corriente eléctrica (Hildebrand y Shepherd 1997). Cada NRO responde a una determinada porción de una molécula, por lo que un olor genera que más de una neurona dispare una señal (Figura 46).

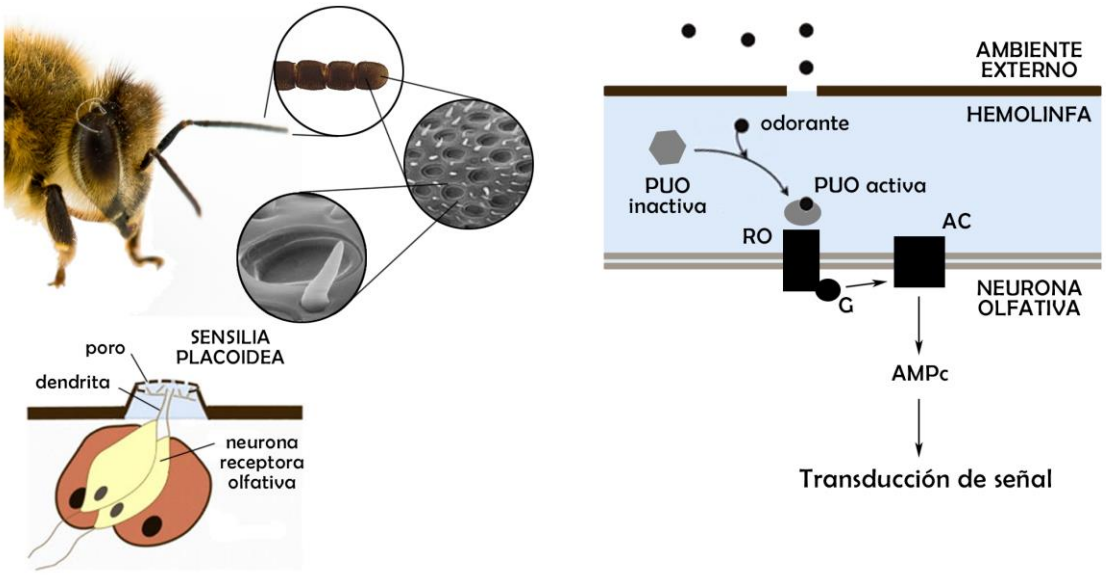

Figura 46. Detección olfativa en insectos. Izquierda: La cabeza de una abeja con sus antenas, los órganos primarios de detección olfativa, cubiertas de sensilias olfativas de diferente tipo (acercamiento). En la abeja *A. mellifera*, la mayoría de las sensilias antenas son placoideas, con forma de plato ovalado y numerosos poros invervados por entre 5 y 35 NROs, bañadas en hemolinfa. Derecha: La molécula odorante ingresa a la sensilia a través de un poro en la cutícula y se une a una PUO. Este complejo se une a un RO unido a proteína G en la membraba dendrítica de una NRO. Luego de varios pasos, se genera una corriente eléctrica a través de la cual se completa la transducción de señal.

En los LAs convergen los axones de las NROs. Estas estructuras están compartimentalizada en glomérulos, los cuales son el resultado de conexiones sinápticas entre varios tipos de neuronas, entre ellas las neuronas de proyección, que llevan la información olfativa procesada a los cuernos laterales y los cuerpos pedunculados (MBs por *mushroom bodies*). Éstos son centros de integración ya que reciben aferencias de vías visual, gustativa y mecanosensorial, además de la vía olfativa. El condicionamiento clásico que se implementó en esta Tesis, apetitivo y olfativo, requiere la asociación entre un estímulo olfativo (estímulo condicionado, EC) y uno gustativo (estímulo incondicionado, EI). En términos neurales, requiere que exista un detector de coincidencia que reciba información contingente de las vías olfativa y gustativa. En cuanto a ésta última, la actividad de la VUMmx1, una neurona octopaminérgica, constituye un correlato neural al EI en un condicionamiento olfativo (Hammer 1993). Los procesos neurales se ramifican en el cerebro y convergen con la vía olfativa en los LAs, los MBs y los cuernos laterales. Esta convergencia es la base neuroanatómica de las asociaciones EI-EC (Figura 47).

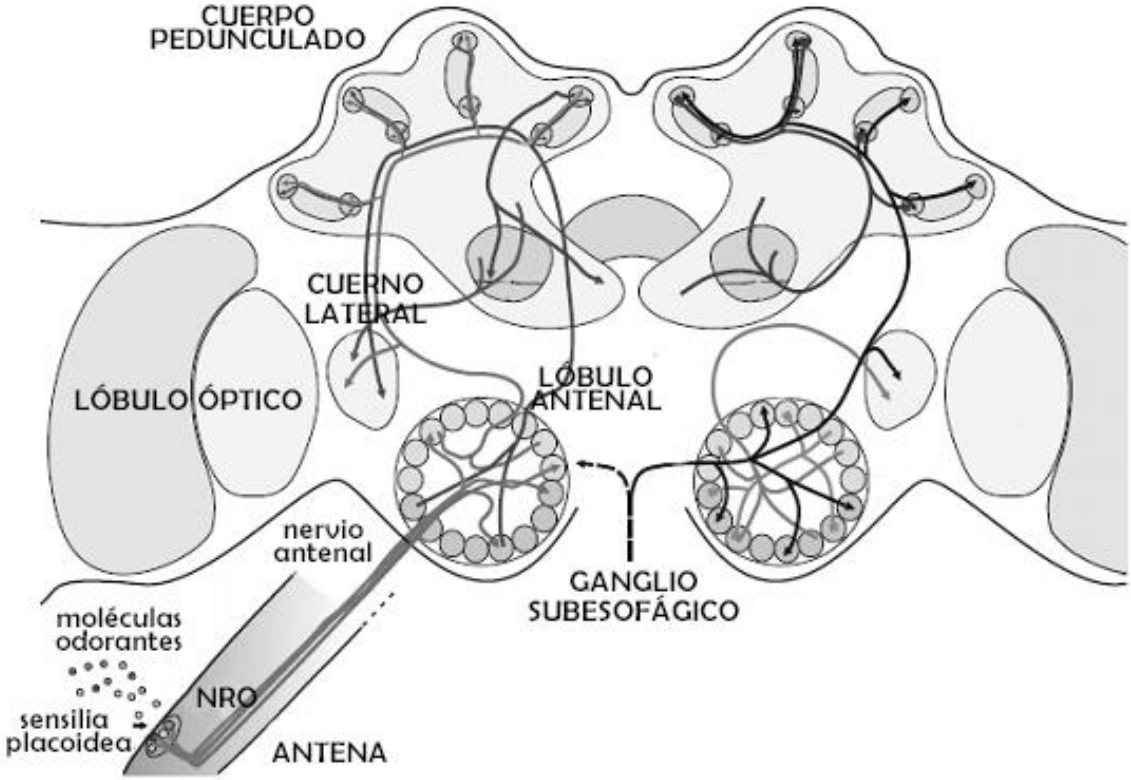

Figura 47. La vía olfativa y el cerebro de la abeja. Las moléculas odorantes penetran a través de los poros de las sensilias placoideas y se unen a los receptores en la membrana de las dendritas de las ORNs. Los axones de las mismas convergen en el lóbulo antenal (LA), que está formado por 165 unidadesanatómicas y funcionales llamadas glomérulos. De allí otras neuronas envían señales al cuerno lateral (CL) y al cuerpo pedunculado (MB). La neurona VUMmx1, que provee la señal de refuerzo apetitivo al cerebro, proyecta desde el ganglio subesofágico (GSE) al cerebro y converge con la vía olfativa en el LA, el MB y el cuerno lateral (CL). Salvo el GSE, todas estas estructuras son bilaterales. Figura tomada de (Sandoz 2012).

Los resultados obtenidos en el capítulo 3.1 indican que el IMI afecta la capacidad de aprendizaje olfativo de abejas jóvenes y que esto podría deberse, en parte, a una alteración de su sensibilidad a la sacarosa. No obstante, un detrimento en las habilidades cognitivas podría deberse a una falla en el establecimiento de la asociación entre dos estímulos o en las vías sensoriales en sí. Por ejemplo, podría verse entorpecida la detección de uno de los dos estímulos. Así, los cambios observados en comportamientos apetitivos basados en la respuesta de extensión de probóscide (REP), variable motora resultante de un procesamiento a nivel del sistema nervioso central, podrían ser explicados por cambios en la periferia sensorial. Se ha estudiado la respuesta a la sacarosa de neuronas gustativas en la galea de *A. mellifera* y del abejorro *Bombus terrestris* mediante una técnica electrofisiológica y no se encontró una

alteración de la misma debido a la ingesta de IMI (Kessler *et al.* 2015). Respecto de la vía olfativa, hay evidencia de que el IMI interactúa con las PUO y entorpece la unión de estas proteínas con la molécula odorante (Li *et al.* 2015). Las experiencias pueden inducir cambios en la antena de la abeja (Vergoz *et al.* 2009, Ramírez *et al.* 2016) y que la antena presenta cambios plásticos acorde con la edad de la obrera (Masson y Arnold 1987, McQuillan *et al.* 2012). Por lo tanto, nos planteamos estudiar la periferia olfativa mediante una técnica electrofisiológica clásica como la electroantenografía (Kaissling 1974). Evaluamos el efecto de la ingesta de IMI sobre respuesta olfativa de las antenas de abejas de diferentes edades.

3.2.2 Metodología

Figura 48. Esquema de procedimiento experimental para evaluar el efecto de la exposición aguda oral al IMI sobre la detección olfativa.

3.2.2.1 Series experimentales

Los experimentos se realizaron en la temporada de verano del año 2016. Las abejas adultas emergidas dentro de una incubadora artificial en el laboratorio fueron colocadas en cajas de madera. Las abejas fueron evaluadas a los 2, 5 o 9 días de edad.

Al momento del ensayo experimental, cada abeja fue capturada en una jaula tipo rulero y alimentada con 3 µl de solución de sacarosa 16 % m/m. Un grupo recibió solución de sacarosa sola (Control DMSO), otro recibió solución de sacarosa con DMSO 0,33 % v/v (Control IMI) y el restante recibió la última

solución más 0,25 ng de IMI. Las abejas fueron evaluadas 1 o 24 h luego de la administración de IMI, periodo durante el cual fueron conservadas en una incubadora. La medición un día después se realizó con el fin de evaluar si los potenciales efectos del IMI eran a largo plazo.

3.2.2.2 Registros electroantenográficos (EAG)

Al momento del registro, cada abeja dentro del rulero fue anestasiada con frío a −4 ºC. Se disecó la antena derecha e inmediatamente se suspendió entre dos electrodos conectados a un amplificador y conversor de señales de baja frecuencia (ver sección 2.5). El dispositivo de liberación de olor, que produce un flujo de aire húmedo constante, se colocó a 1 cm de la antena.

Cada antena fue estimulada con concentraciones crecientes de 1-hexanol en agua destilada (1:100, 1:10, 1:1) durante 1 s. Se registró la diferencia de voltaje en función del tiempo generada por la antena antes, durante y luego de la estimulación olfativa. Se calculó la **amplitud de la respuesta** como la diferencia en voltaje inmediatamente antes de la estimulación y el punto con el valor más extremo durante la presentación.

3.1.2.3 Análisis estadístico

El efecto de los factores se evaluó mediante el análisis de modelos lineales generalizados mixtos (GLMM). Los modelos fueron ajustados en el programa R (R Development Core Team 2011), mediante el uso de la función glmer del paquete lme4 (Bates *et al.* 2015). El efecto de la edad sobre la amplitud de respuesta de las antenas se evaluó utilizando un GLMM con estructura de error de tipo Gamma, donde el modelo máximo incluyó a la edad y la concentración de olor como factores fijos y a la abeja sujeto como un factor aleatorio. El efecto del IMI sobre la respuesta de las antenas se evaluó utilizando un GLMM con estructura de error de tipo Gamma, donde el modelo máximo incluyó al tratamiento con IMI, la edad, el tiempo post-administración y la concentración de olor como factores fijos y a la abeja sujeto como un factor aleatorio. Dentro de cada análisis, se evaluó cada modelo posible y se compararon entre sí utilizando la parsimonia y los valores del criterio de información de Akaike (AIC), luego de lo cual se eligió el modelo mínimo adecuado (MMA). Las

comparaciones *a posteriori* se realizaron utilizando la función glht del paquete multcomp (Hothorn *et al.* 2008).

3.2.3 Resultados

Con el fin de evaluar la sensibilidad olfativa, las antenas de las abejas fueron estimuladas con concentraciones crecientes de 1-hexanol y se midió la respuesta máxima ante cada presentación en un EAG. Las abejas tenían 2, 5 y 9 días de edad cuando se las alimentó con 3 µl de solución tratamiento de IMI. Su respuesta de EAG se midió 1 o 24 h luego de la administración del tratamiento.

Primero, se estudió el efecto de la edad sobre la percepción olfativa. En este caso, sólo se tuvo en cuenta a las abejas que fueron alimentadas con solución de sacarosa sola (Control). Por lo tanto, considerando que las abejas fueron evaluadas el mismo día del tratamiento o 24 horas después, se podría considerar que se contaba con seis grupos de edad: 2, 3, 5, 6, 9 y 10 días. Como era esperable, **las respuestas EAG aumentaron acorde se incrementó la concentración del olor presentado**. Del día 2 al día 5 de edad hubo un aumento en la sensibilidad olfativa, fenómeno que se observó para las tres concentraciones de olor. A partir de esa edad, la respuesta se mantuvo al mismo nivel (Figura 49; GLMM con estructura Gamma, Voltaje ~ Edad + Concentración + Abeja, Tabla 16). A pesar de que el efecto de la edad es global ya que no depende de la concentración, la diferencia entre abejas de diferentes edades fue más evidente en las respuestas al olor puro (cajas negras).

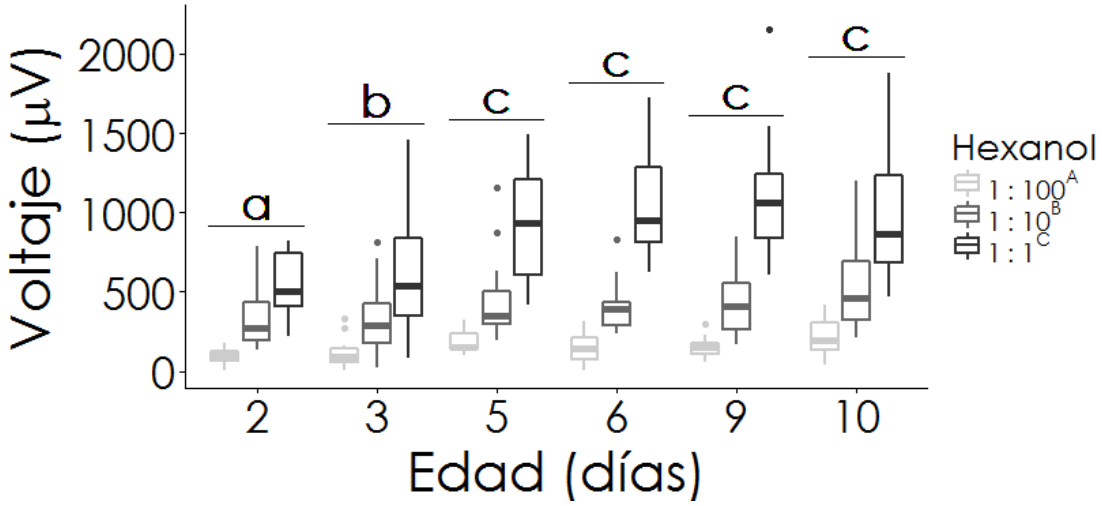

Figura 49. Respuesta electrofisiológica de NROs de la antena de abejas control. Amplitud máxima de respuesta de antenas de abejas de 2, 3, 5, 6, 9 y 10 días de edad ante la presentación de concentraciones creciente de 1-hexanol (escalas de gris). La línea horizontal gruesa, la caja y los bigotes representan la mediana, el intervalo inter-cuartil y el rango de datos, respectivamente. Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre grupos; las minúsculas en el área del gráfico indican diferencias entre edades y las mayúsculas en el texto de la leyenda indican diferencias entre concentraciones de 1-hexanol. El tamaño muestral fue de 15 antenas en cada grupo de edad. MMA: Voltaje ~ Edad + Concentración + Abeja.

Segundo, se estudió el efecto de la exposición aguda al IMI sobre la sensibilidad olfativa dependiendo de la edad de la abeja. Nuevamente, las respuestas EAG aumentaron acorde se incrementó la concentración del olor presentado. **El tratamiento con IMI y el tiempo post-administración no tuvieron efecto sobre la sensibilidad olfativa**. En concordancia con las abejas control, hubo un aumento en la respuesta de las abejas de 5 días de edad respecto de las más jóvenes, y se mantuvo en el mismo nivel en las de más edad (Figura 50; GLMM con estructura Gamma, Voltaje ~ Edad*Concentración + Abeja, Tabla 17). A pesar de que el MMA incluyó la interacción entre edad e intensidad del olor, las comparaciones múltiples indicaron que las diferencias entre niveles de cada factor fueron las mismas para todos los niveles del otro.

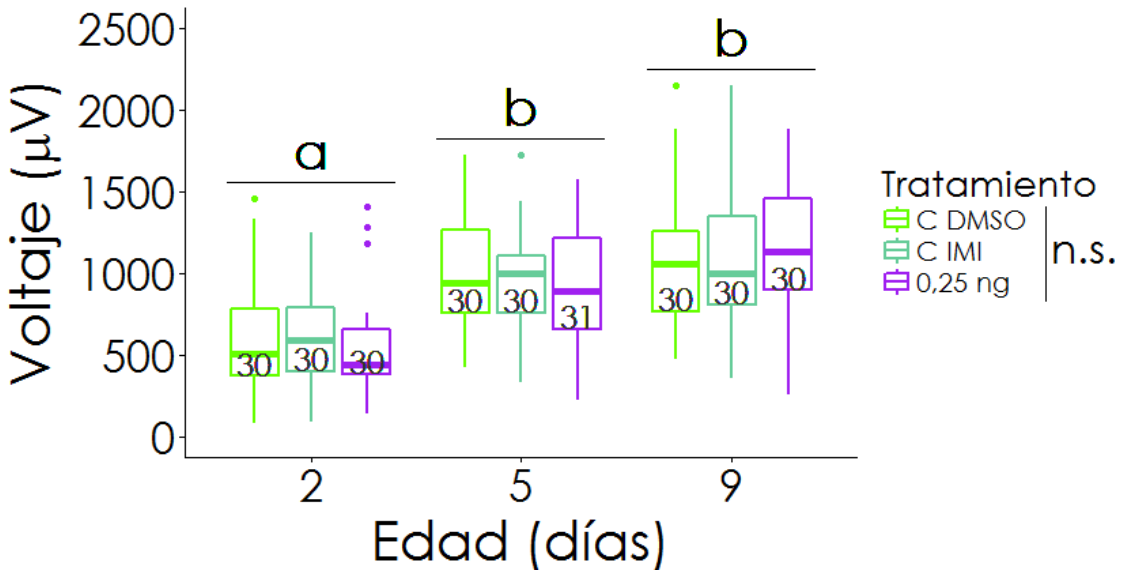

Figura 50. Respuesta electrofisiológica de NROs de la antena de abejas ante 1-hexanol puro. Amplitud máxima de respuesta de abejas de 2, 5 y 9 días de edad alimentadas con solución de sacarosa sola (Control DMSO, verde), con DMSO (Control IMI, aguamarina) o con DMSO más 0,25 ng de IMI (violeta). Las disecciones de antena y su evaluación de sensibilidad fueron realizadas 1 h o 24 h luego de la administración del tratamiento (datos fusionados). La línea horizontal gruesa, la caja y los bigotes representan la mediana, el intervalo inter-cuartil y el rango de datos, respectivamente. Los números dentro de las cajas indican el tamaño muestral. Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre edades. "n.s." indica diferencias no significativas entre tratamientos. MMA: Voltaje ~ Edad*Concentración + Abeja.

3.2.4 Discusión

De acuerdo con la evidencia obtenida en esta sección, se puede concluir que las dosis de IMI elegidas no afectaron la respuesta de la periferia olfativa de abejas jóvenes en las condiciones en las que se realizó el experimento.

La respuesta eléctrica de la antena ante 1-hexanol aumentó desde los 2 hasta los 5 días de edad, a partir de la cual se mantuvo estable. Estos resultados se encuentran en concordancia con experimentos previos donde se observó un incremento de respuesta de los 0 a los 4 días de edad y una estabilidad hasta los 8 días de edad. Además, se registró una leve disminución en la amplitud del EAG hasta el día 15 (Masson y Arnold 1987), pero en nuestro estudio este periodo no se consideró. Los olores utilizados por estos investigadores fueron diferentes al empleado en este estudio, por lo que se profundiza el hecho de que esta variación con la edad es independiente de la identidad del olor. Esta variación fue válida para todas las concentraciones de 1-hexanol, aunque se hizo

más evidente cuando se estimuló con el olor sin diluir (Figura 49, gris oscuro). Un estudio de receptores aminérgicos en el flagelo antenal muestra una variación en la expresión génica según la edad de las obreras. Esto indica que existe una modulación dinámica en la periferia olfativa de la abeja de acuerdo con la edad (McQuillan *et al.* 2012).

La ingesta de IMI no influyó sobre la respuesta antenal ante 1-hexanol. Por lo tanto, el efecto del IMI sobre el aprendizaje olfativo observado en esta Tesis (ver capítulo 3.1) no puede explicarse por un deterioro en la detección olfativa antenal. Sí sugiere un posible efecto del IMI a nivel del sistema nervioso central que promueve una disminución en la sensibilidad quimiosensorial, la cual se evidencia en una respuesta sistémica como la alteración en el umbral de respuesta a la sacarosa (Capítulo 3.1). El efecto del IMI sobre esta vía sensorial, fuera del contexto de aprendizaje olfativo, ha sido relegado hasta hace poco tiempo. Un estudio basado en espectroscopía y análisis de *docking* ha evaluado la interacción *in vitro* entre el IMI y una PUO de *Apis cerana*, una especie del este de Asia. Se encontró que el IMI interfiere con la unión entre la PUO y la molécula odorante (Li *et al.* 2015). Este resultado es relevante ya que implicaría que la estimulación con olor a la antena sería insuficiente para activar los RO. No obstante, nuestros resultados no sustancian esta predicción. Esto puede deberse a que se trata de otra especie, que un estudio *in vitro* es acotado al momento de extrapolarlo a nivel fisiológico, o a que la concentración de IMI utilizada (10^{-3} M) y el olor elegido (β ianona) por este grupo son diferentes a los de esta Tesis. Otro estudio ha indagado en la anatomía de la superficie antenal de abejas *A. cerana* provenientes de ambientes agrícolas con baja o alta intensidad de cultivo. Se encontró que las abejas pertenecientes a este último grupo poseen una menor cantidad de sensilias y que, en ocasiones, éstas presentan un aspecto deformado (Chakrabarti *et al.* 2015). Este resultado es sumamente importante ya que se trata de un estudio que considera abejas criadas en un entorno realista. Más allá de la especie de abeja estudiada, los cambios observados en la cantidad y calidad de sensilias antenales probablemente se deban a una exposición prolongada a los pesticidas utilizados en cultivos. Por lo tanto, no se descarta que un estudio crónico de exposición al IMI pueda generar cambios a nivel periférico. Otro estudio ha evaluado el efecto

del IMI sobre la actividad glomerular *in vivo* de *A. mellifera* utilizando la técnica de *imaging* de calcio. Luego de una exposición aguda al neonicotinoide, disminuyó la respuesta glomerular ante la estimulación olfativa. Más aún, se encontró que las representaciones de cuatro olores en el espacio perceptual se acercan por lo que la discriminación olfativa se vería impedida (Andrione *et al.* 2016).

Los resultados obtenidos de la ingesta de IMI sobre la respuesta antenal a un odorante son consistentes con aquellos obtenidos en un abordaje electrofisiológico sobre la detección gustativa. En este estudio la ingesta de IMI, thiamethoxam o clothianidin no alteraron la respuesta a sacarosa de neuronas ubicadas en sensilias basicónicas de la galea de *A. mellifera*. Tampoco se observó que la estimulación con estos neonicotinoides activara neuronas receptoras gustativas, por lo que ésta no serían sensibles a los compuestos (Kessler *et al.* 2015). Por lo tanto, el IMI no parecería actuar sobre o afectar la periferia sensorial de *A. mellifera*.

Sin embargo, sí parecerían actuar río abajo de la antena en estructuras centrales, ya sea en los LAs (Andrione *et al.* 2016) o en los MBs (Déglise *et al.* 2002, Palmer *et al.* 2013, Peng y Yang 2016). Es decir, sobre la percepción olfativa. Es probable que esta acción diferencial se deba a que un electroantenograma muestra la respuesta eléctrica del conjunto de NROs, neuronas que no presentarían nAChRs en sus membranas. La localización más próxima de estos receptores es en las sinapsis entre las NROs y las neuronas locales y de proyección de los LAs. Dado que los nAChRs son post-sinápticos, estos se ubicarían en la membrana celular de las neuronas de los LAs y no de las NROs. Además, las sinapsis entre neuronas de proyección y células de Kenyon son colinérgicas (Gauthier y Grünewald 2012). Por ende, esto también sugiere que no existirían vías retrógradas que, al perturbarse los LAs o MBs, afecten la periferia olfativa.

3.3 Comportamiento dentro de la colmena

Abreviaturas

AIC	Criterio de información de Akaike
CP	Componente principal
GLM	Modelo lineal generalizado
IMI	Imidacloprid
MMA	Modelo mínimo adecuado
TC	Tiempo de permanencia en el área de cría
TR	Tiempo de permanencia en el área de reserva
TT	Tiempo de permanencia en el área de transferencia

3.3.1 Introducción

En los capítulos precedentes hemos caracterizado efectos del IMI sobre la cognición y diferentes respuestas quimiosensoriales de *A. mellifera*. Éstos se evaluaron sobre la base de paradigmas clásicos de aprendizaje y percepción, utilizados porque permiten controlar las condiciones experimentales de modo tal de aislar el fenómeno de interés y sus procesos subyacentes. Esto se logra simplificando el contexto del animal, lo que a su vez reduce su repertorio comportamental. No obstante, esta expresión restringida del comportamiento constituye un reflejo de un fenómeno biológicamente relevante que se desarrolla en el contexto natural del animal. En su contexto natural, el de la colmena y el ambiente que la rodea, la abeja pone en juego procesos de integración entre los ambientes externo e interno.

La colonia de abejas melíferas es un sistema que opera de manera descentralizada. Su coordinación surge a partir de que las obreras toman decisiones basándose en información local y realizan comportamientos acorde en paralelo (Fewell 2003, Gordon 2007). La auto-organización produce propiedades emergentes: fenotipos sociales que son más que la suma de los

comportamientos individuales de las obreras. Así es como el conjunto de individuos se dirige a sí mismo (Camazine 2003).

Las abejas pre-recolectoras, que permanecen dentro de la colmena, tienen un repertorio comportamental que incluye estar quietas, caminar, inspeccionar celdas, acicalarse y ventilar, entre otras actividades (Johnson 2002). Las abejas nodrizas y las procesadoras de alimento permanecen inmóviles un 10 % y 14 % del tiempo, respectivamente (Johnson 2008b). El resto del tiempo permanecen activas. Todas estas actividades requieren de la función motora y constituyen comportamientos no restringidos, que además ocurren en el contexto natural de la colmena.

El efecto del IMI ha sido evaluado sobre la actividad recolectora (Bortolotti *et al.* 2003, Colin *et al.* 2004, Ramirez-Romero *et al.* 2005, Eiri y Nieh 2012, Schneider *et al.* 2012), pero no en profundidad sobre la función locomotora en sí (Lambin *et al.* 2001, Teeters *et al.* 2012, Williamson *et al.* 2014). La incorporación oral de 0,5 ng luego de 24 horas indujo a las abejas recolectoras estar más tiempo tendidas patas para arriba, lo que implica una disrupción del reflejo de enderezamiento (Williamson *et al.* 2014). Una dosis por contacto de 1,25 ng generó más actividad mientras que dosis mayores promueven la inmovilidad (Lambin *et al.* 2001). Las abejas alimentadas con concentraciones realistas a campo no presentaron una movilidad diferente de la de abejas control, pero aquellas alimentadas con 50 ppb (= 50 µg/l) o más recorrieron distancias más cortas (Teeters *et al.* 2012). En un trabajo donde se estudió la locomoción utilizando otro neonicotinoide, el thiametoxam, se encontró que abejas recién emergidas expuestas tópicamente a 3,8 ng de este compuesto recorrieron una menor distancia en una arena experimental (Charreton *et al.* 2015).

Por las tareas que realizan y su papel en la red que conforman los individuos de la colonia, las abejas pre-recolectoras tienen un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis de la colonia (Lindauer 1971a, Johnson 2008a, Baracchi y Cini 2014). Ésta tiene un mecanismo a largo término para reemplazar algún elemento, como la reina, pero la remoción de individuos clave, como una gran parte de los miembros dedicados a una determinada tarea, tiene efectos disruptivos inmediatos ya que el proceso requiere un ajuste fisiológico

(Johnson 2010b). En este sentido, es de interés estudiar cómo un neurotóxico afecta el comportamiento de abejas que permanecen dentro de la colmena, quienes pueden encontrarse con el compuesto ya sea por contactar alimento o abejas entrantes o por alimentarse de recursos almacenados (ver Capítulo 1).

3.3.2 Metodología

Figura 51. Esquema de procedimiento experimental para evaluar el efecto de la exposición aguda al IMI sobre el comportamiento dentro de la colmena.

3.3.2.1 Series experimentales

El experimento se realizó en la temporada de verano del año 2015. Las abejas adultas emergidas dentro de una incubadora artificial en el laboratorio fueron pintadas con un marcador de reinas en su tórax o abdomen. Este proceso se realizaba cada 24 h, por lo que las abejas de un mismo color no tenían más de un día de edad de diferencia. Las abejas marcadas fueron colocadas en una caja de madera, la cual conectó a una colmena de observación para que los individuos pudieran ingresar a la misma. En los días sucesivos, se realizaron marcas adicionales en las abejas de edad conocida con el fin de identificarlas individualmente.

Previo a la administración del insecticida, se realizó una observación de un sector de la colmena que contenía abejas con marcas individuales de la edad de interés. Las abejas de 6-10 días de edad fueron seleccionadas del área de cría y las de 15-17 días, de área de reserva. Luego de algunos minutos, se procedió a ofrecer 3 µl de la solución a las abejas de interés hasta que una extendiera su

probóscide y consumiera la totalidad. Las soluciones constaron de solución de sacarosa 50 % m/m sola o más 0,25 ng de IMI. Diez minutos luego de administrado el tratamiento, se realizó la observación de la abeja sujeto, la cual duró 8 minutos. Al final, se la capturó y se la descartó.

3.3.2.2 Variables medidas

Se registró el área donde se encontraba la abeja al comienzo del registro post-tratamiento. Así, se obtuvo la **distribución** de individuos en la colmena. Las filmaciones obtenidas fueron visualizadas en un ordenador. El registro del comportamiento fue realizado mediante el uso del software Etholog 2.2. Se registró el tiempo de **permanencia** en cada área. Para estimar la **movilidad**, se contabilizó el número de zonas que la abeja recorrió durante el tiempo de observación. Además, se creó una lista de categorías de **actividades** excluyentes (descanso, locomoción, acicalamiento, inspección de celda, ventilación, sacudirse, trofalaxia, anteneo, seguimiento de danza). Como resultado, se contó con una bitácora de los estados de cada abeja. De allí, se obtuvo el tiempo total dedicado en realizar cada actividad. Para ciertas actividades, además se contabilizó el número de eventos.

3.3.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizaco en el programa R (R Development Core Team 2011).

Se estudió la distribución de las abejas en las áreas de cría, reserva y transferencia al comienzo de la observación post-tratamiento. El efecto de los factores se evaluó mediante el análisis de modelos lineales generalizados (GLM) con estructura de error multinomial, donde el modelo máximo incluyó a la tarea y el tratamiento como factores fijos. Los modelos fueron ajustados mediante el uso de la función multinom del paquete nnet (Venables y Ripley 2002). Se evaluó cada modelo posible y se compararon entre sí utilizando la parsimonia y los valores de AIC (*Akaike's Information Criterion*) como criterios, luego de lo cual se eligió el modelo mínimo adecuado (MMA). El mismo arroja regresiones para cada valor de la variable respuesta. Los coeficientes informados son valores de logaritmo del odds ratio. Este último es una razón de probabilidades entre el

nivel de un factor y el nivel utilizado como referencia (intercepto), que da información acerca de la posibilidad de que un grupo presente un estado en comparación con el de referencia. En otras palabras, cuantifica cuánto más probable es que se presente cierto estado en un grupo que en otro. En el caso de nuestro diseño experimental, los estados posibles que podía presentar un grupo de abejas fueron que una abeja se encontrara en el área de cría, de reserva o de transferencia. Es por ello que el análisis arrojó una regresión para cada estado, con la salvedad de que los coeficientes están relativizados a una línea de base. En este caso, fue el estado "área de cría".

Se estudió la permanencia de cada abeja en las áreas de cría, reserva y transferencia durante la observación post-tratamiento. Dado que no son excluyentes entre sí (más tiempo en un área significa menos tiempo en las otras dos), se esperó una correlación entre estas variables. Por lo tanto, previo a la evaluación del efecto del IMI, se realizó un análisis de componentes principales (CP) mediante el uso de la función prcomp del paquete stats. El efecto de los factores sobre los primeros dos CP extraídos se evaluó mediante el análisis de GLM con estructura de error normal, donde el modelo máximo incluyó a la tarea y el tratamiento como factores fijos. Los modelos fueron ajustados mediante el uso de la función glm. Se evaluó cada modelo posible y se compararon entre sí utilizando la parsimonia y los valores de AIC como criterios, luego de lo cual se eligió el MMA.

Se estudió la movilidad cuantificando las zonas recorridas por la abeja focal. El efecto de los factores se evaluó mediante un GLM con estructura de error de Poisson, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento con IMI y la tarea de la abeja como factores. Los modelos fueron ajustados mediante el uso de la función glm. Se evaluó cada modelo posible y se compararon entre sí utilizando la parsimonia y los valores de AIC como criterios, luego de lo cual se eligió el MMA.

Para el estudio de las actividades realizadas por las abejas, se realizó un análisis de CP con las 14 variables (duración de descanso, locomoción, acicalamiento, vibración, ventilación, inspección de celda, antenación, trofalaxia y seguimiento de danza; y frecuencia de vibración, inspección de celda, antenación, trofalaxia y seguimiento de danza) con el fin de sintetizar la

variabilidad mediante el uso de la función prcomp del paquete stats. No fue posible realizar un análisis factorial con los CP elegidos dado que no se encontró una estructura de error que ajustara a los datos, probablemente debido al tamaño muestra reducido.

3.3.3 Resultados

Observaciones generales

Las abejas marcadas se incorporaron prontamente a la colonia experimental. Al cabo de unos días, la colmena de observación contó con un gran número de individuos de colores. Al comienzo del experimento, la colonia presentó una amplia área de cría (más de un cuadro). Al pasar los días, el tamaño del área se fue reduciendo acorde los adultos fueron emergiendo. Dado que había mucha actividad recolectora, esas celdas fueron ocupadas con néctar en lugar de ser utilizadas por la reina para colocar los huevos. Debido a la baja demanda de nodrizas, había un gran número de abejas desempleadas. Esto se reflejó en una inactividad general de la colonia (mucho descanso).

Luego de la administración del tratamiento, la abeja alimentada parecía activarse y comenzaba a recorrer el panal realizando diferentes actividades. Esta activación solía disminuir al cabo de los 10 minutos de espera, momento en el cual comenzaba la observación post-tratamiento.

Distribución

Las abejas presuntamente nodrizas (6-10 días) fueron seleccionadas del área de cría y las presuntamente procesadoras de alimento (15-17 días), del área de reserva de alimento. Se evaluó la distribución de las abejas en las áreas de cría, reserva y transferencia de alimento luego de haber sido alimentadas con solución de sacarosa 50 % m/m sola (Control) o con 0,25 ng de IMI. El modelo con mejor ajuste fue Área ~ Tarea + Tratamiento (GLM con estructura multinomial, Tabla 18). Sin embargo, los parámetros de las regresiones correspondientes no fueron significativos (Tabla 19). No obstante, sus valores brindaron información acerca de los resultados obtenidos (Figura 52).

Por un lado, la razón de probabilidades para las abejas procesadoras de presentar el estado “área de reserva” o “área de transferencia” fue muy alta (1,32

10^8 y 1,21 10^7, respectivamente). En otras palabras, **es mucho más probable que una abeja procesadora se encuentre en el área de reserva o de transferencia** que en el área de cría (Figura 52). Por otro lado, la razón de probabilidades para las abejas alimentadas con IMI de presentar el estado "área de reserva" o "área de transferencia" fue baja (3,57 10^{-4} y 9,75 10^{-5}, respectivamente). En otras palabras, es menos probable encontrar a una abeja expuesta al IMI en áreas fuera de la de cría. Este hecho se reflejó más en las abejas nodrizas que en las procesadoras, a pesar de que el modelo no ponderó la interacción entre los factores tratamiento y tarea (Figura 52). Por último, observando los parámetros del intercepto, se concluye **que es más probable encontrar abejas nodrizas en el área de cría** dado que las razones de posibilidades de las áreas de reserva y de transferencia fueron un 75 % y un 50 % menor, respectivamente. Por lo tanto, las abejas de 6-10 días pueden llamarse *nodrizas* y las de 15-17, *procesadoras de alimento*.

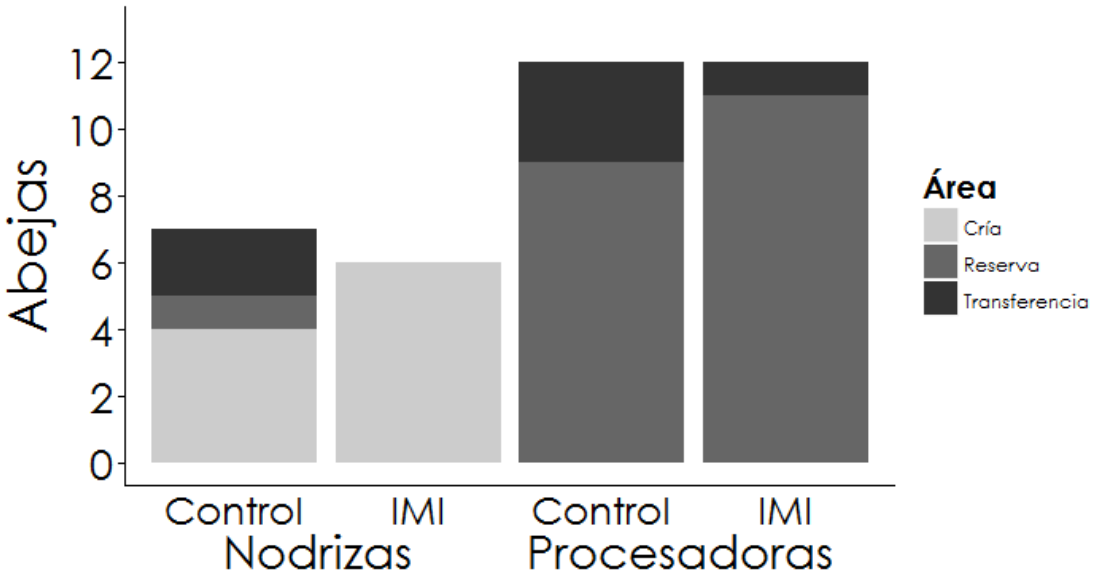

Figura 52. Ubicación de obreras en diferentes áreas de una colmena luego de la exposición aguda al IMI. Cantidad de abejas nodrizas y procesadoras de alimento encontradas en las áreas de cría (gris claro), reserva (gris medio) o transferencia (gris oscuro) de una colmena de observación luego de haber sido alimentadas con solución de sacarosa sola (Control) o más IMI.

Permanencia

Se midió el tiempo de permanencia en cada área durante la observación post-tratamiento y se realizó un análisis de CP para obtener nuevas variables no correlacionadas entre sí. La matriz R indicó una correlación entre tiempo en el

área de cría (TC) y el tiempo en el área de reserva (TR) (R^2 = 0,75). El análisis proveyó dos CP que explicaron el 100 % de la variabilidad (Tabla 20). TC y TR correlacionaron altamente con el primer CP (-0,66 y 0,73, respectivamente) mientras que el tiempo en el área de transferencia (TT) apenas lo hizo (-0,16) (Figura 53, Tabla 20). Los signos opuestos indican una correlación negativa entre las variables originales. En otras palabras, el tiempo de permanencia en un área es mayormente a expensas de la otra. El TT correlacionó con el segundo CP (0,88) (Tabla 20).

A continuación, se realizó un análisis factorial para evaluar el efecto del IMI sobre la permanencia en cada área. Para ello, se usó como variable respuesta el CP1 y el CP2. **El IMI no tuvo efecto sobre el tiempo ocupado en cada área de la colmena**. Sin embargo, la tarea realizada sí, dependiendo del área estudiada (GLM con estructura normal, CP1 ~ Tarea, CP2 ~ 1, Tabla 21 y Tabla 22). **Las abejas *nodrizas* pasaron más tiempo en el área de cría y menos en el área de reserva que las abejas procesadoras** dado que generalmente presentaron valores negativos de CP1, los cuales se traducen a altos niveles de TC (correlación negativa entre TC y CP1). Las *procesadoras* mostraron la tendencia opuesta (Figura 53). Las abejas no difirieron en su tiempo de permanencia en el área de transferencia (datos no mostrados).

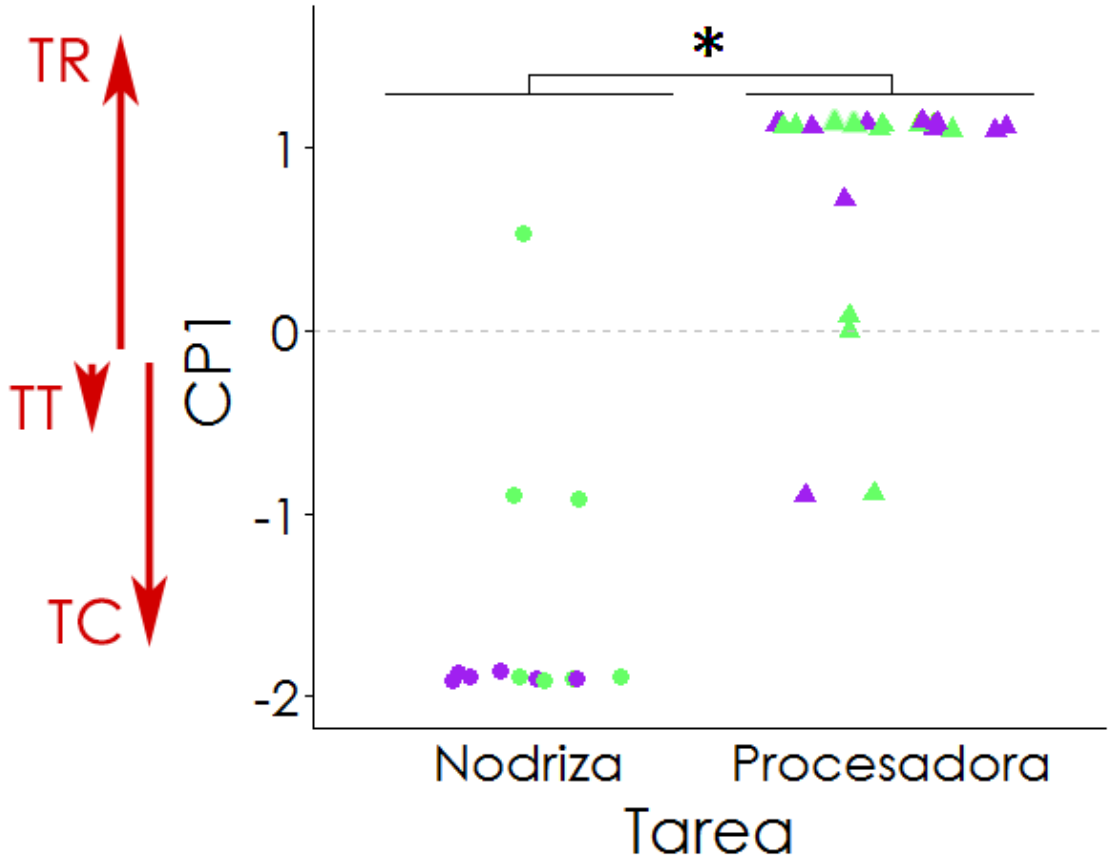

Figura 53. Tiempo de permanencia de obreras en diferentes áreas de una colmena luego de la exposición aguda al IMI. Valores del primer eje —resultado de un análisis de componentes principales— que explica la varianza en el tiempo de permanencia (s) de abejas pre-recolectaras en las áreas de cría (TC), reserva (TR) y transferencia (TT) de una colmena. Las abejas eran nodrizas o procesadoras de alimento y fueron alimentadas con solución de sacarosa sola (Control, verde) o más 0,25 ng de IMI (violeta). Las flechas rojas indican la correlación de las variables originales con el CP1 (TC = -0,66, TR = 0,73, TT =-0,16). MMA: CP1 ~ Tarea.

Movilidad

Como estimador de movilidad, se registró el número de zonas que recorrió la abeja focal durante el periodo de observación post-tratamiento. La gran mayoría de las abejas presentó valores iguales a 1. En otras palabras, permaneció en la zona donde se la encontró al comienzo de la observación. Algunas abejas recorrieron más zonas e incluso una de mediana edad llegó a recorrer 8 zonas (Figura 54). El análisis estadístico arrojó que abejas pertenecientes a una u otra subcasta presentaron una movilidad similar. Además, **el IMI no tuvo efecto sobre el desplazamiento de las abejas** (GLM con estructura Poisson, Zonas recorridas ~ 1, Tabla 23).

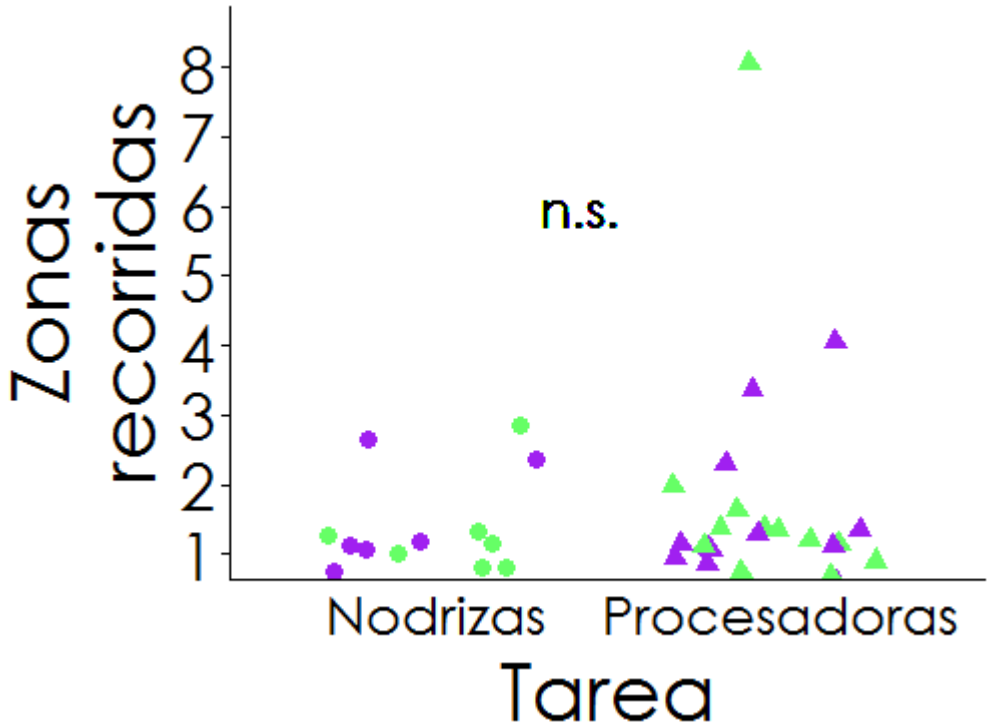

Figura 54. Movilidad de abejas obreras luego de la exposición aguda al IMI. Cantidad de zonas recorridas por abejas nodrizas o procesadoras de alimento alimentadas con solución de sacarosa sola (Control, verde) o más 0,25 ng de IMI (violeta). "n.s" indica diferencias no significativas entre tratamientos o entre tareas. MMA: Zonas recorridas ~ 1.

Actividades

Se registró el tiempo dedicado a realizar las actividades de descanso, locomoción, acicalamiento, vibración, ventilación, inspección de celda, antenación, trofalaxia y seguimiento de danza. Además, se contabilizó el número de eventos de vibración, inspección de celda, antenación, trofalaxia y seguimiento de danza (Figura 55). Se realizó un análisis de componentes principales con las 14 variables con el fin de sintetizar la variabilidad. Los primeros 4 CP extraídos explicaron el 81,5 % de la variabilidad. La matriz R indicó una baja correlación ($R^2 < 0,40$) entre las variables originales y estos CP (

Tabla 24). Esto indica que las variables originales están igualmente representadas por los CP escogidos. Debido al bajo tamaño muestral, no se pudo continuar con el análisis estadístico.

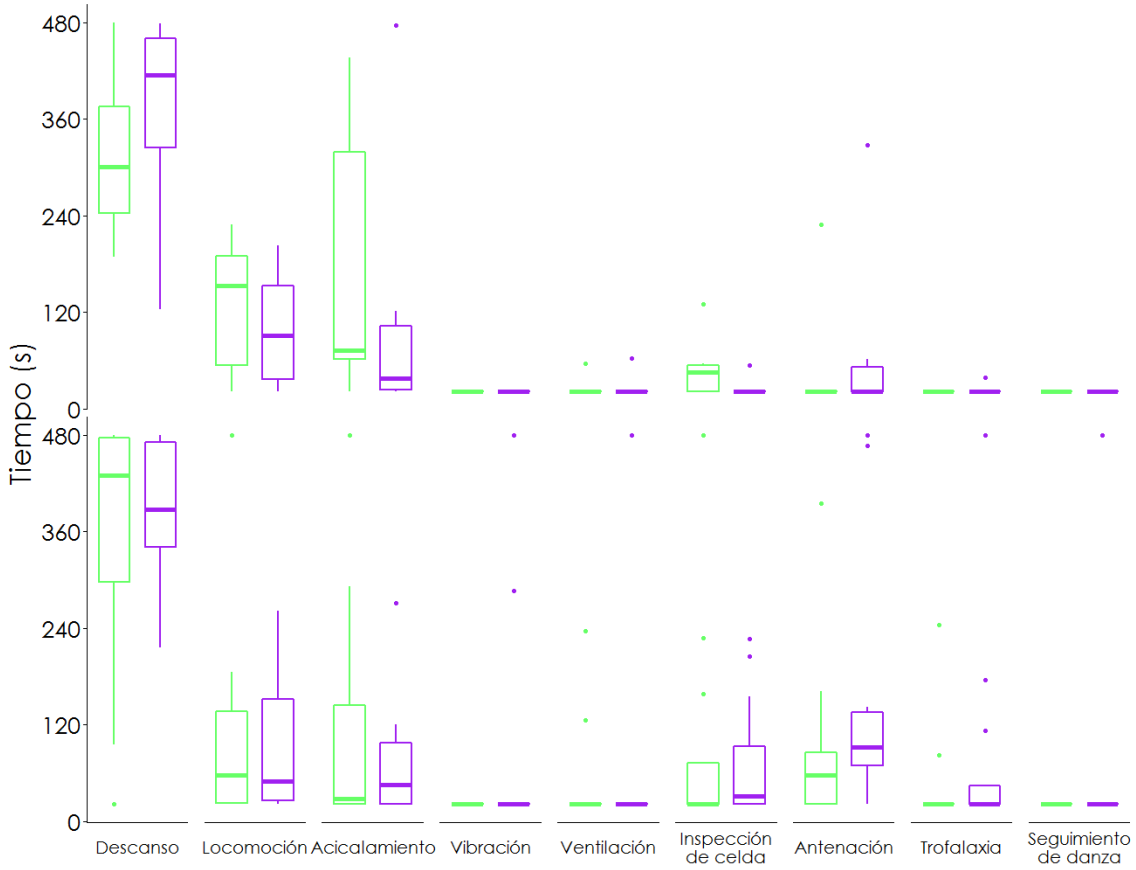

Figura 55. Comportamientos. Tiempo dedicado por abejas nodrizas (arriba) o procesadoras de alimento (abajo) a realizar determinados comportamientos 10 minutos luego de haber sido alimentadas con solución de sacarosa sola (Control, verde) o más 0,25 ng de IMI (violeta).

3.3.4 Discusión

La cantidad de datos obtenidos estableció un límite en la inferencia en términos estadísticos, sobre todo en cuanto a los efectos del IMI. Sin embargo, algunos resultados fueron robustos y proveyeron información acerca de las tareas que realizan las abejas de edad pre-recolectora.

Se trabajó con abejas de edad conocida, ya que fueron marcadas el día de su emergencia como adultas e ingresadas a la colmena de observación. Esto provee una herramienta útil al momento de estudiar el comportamiento de las obreras dentro de la colmena dado que el estado fisiológico y anatómico, correlato mecanístico de la edad, impone restricciones a cada subcasta y resulta en la

especialización en su repertorio de actividades (Winston 1987). No obstante, existen mecanismos de ajuste de acuerdo con los requerimientos de la colonia. Por lo tanto, es importante no limitarse a la edad al momento de definir a qué subcasta pertenece una abeja obrera (Johnson 2010a). Resolvimos considerar parámetros espaciales y comportamentales para satisfacer este objetivo.

Como variables espaciales, se tuvieron en cuenta la ubicación de la abeja al comienzo de la observación post-tratamiento y la permanencia en las áreas definidas a lo largo de toda la observación. Teniendo en cuenta estos dos tipos de variables, se concluyó que las abejas de 6-10 días se encontraron mayormente circunscriptas al área de cría y a las de 15-17 días, al área de reserva de alimento. Por lo tanto, de ambos análisis se infirió que las franjas etarias con las que se trabajó coincidieron con las subcastas nodriza y procesadora de alimento (Baracchi y Cini 2014). Como variables comportamentales, las actividades más relevantes para determinar las subcastas son referidas a la cría: la alimentación y el operculado. El resto de las actividades son compartidas, lo que las diferencia es el tiempo relativo dedicado a ellas (Johnson 2008b). En esta Tesis, debido a las condiciones de la colmena —inactividad generalizada— y al bajo tamaño muestral, las variables comportamentales medidas no pudieron ser utilizadas como *proxy* para determinar a qué subcasta pertenecían las abejas de las franjas etarias seleccionadas.

En cuanto a la localización, el IMI influyó sobre todo en abejas nodrizas. Aunque el análisis estadístico no fue concluyente, se observó que las abejas de esta subcasta que fueron alimentadas con IMI no visitaron otras áreas que la de cría. Este hecho significa una restricción en su área de acción. Por un lado, esto implica que se ve afectada la conectividad de las abejas tratadas con sus compañeras, fenómeno que tendría repercusiones sobre el flujo de información entre individuos (Fewell 2003). Por otro, implica que esta dosis de IMI podría estar comprometiendo la movilidad de la abeja tratada.

Sin embargo, el IMI no afectó el número de zonas recorridas por las abejas (Figura 54). No obstante, es importante notar que la mayoría de las abejas no tratadas permaneció en la zona donde se encontraba al inicio de la observación. Por lo tanto, esto podría estar generando un “efecto piso” que impediría

visualizar una disminución en esta variable debido a algún factor externo. Otros estudios han encontrado efectos depresores sobre la actividad de la abeja. La incorporación oral de 0,5 ng luego de 24 horas, dosis equivalente a la utilizada en esta Tesis, indujo a las abejas recolectoras estar más tiempo tendidas patas para arriba (Williamson *et al.* 2014). En otro caso, dosis mayores a 5 ng suministrada por topicación generaron una disminución en el tiempo de actividad (Lambin *et al.* 2001). También se encontró que las abejas recorrieron menos distancia y pasaron más tiempo inmóviles, pero las concentraciones utilizadas fueron extremadamente altas y no se consideran realista a campo: 50 ppb y 100 ppb (Medrzycki *et al.* 2003, Teeters *et al.* 2012). Sorprendentemente, la aplicación por contacto de 1,25 ng y 10 ng de IMI generó mayor actividad en abejas (Lambin *et al.* 2001) y hormigas cortadoras *Acromyrmex subterraneus* (Galvanho *et al.* 2013), respectivamente. Por lo tanto, los efectos del IMI sobre la función motora no son del todo claros. En parte, esto se debe a que los estudios difieren en modo de exposición, dosis o concentraciones y variables medidas.

En esta Tesis, la intención inicial no fue evaluar el efecto del IMI sobre la locomoción en sí, sino sobre el comportamiento de abejas pre-recolectoras en un contexto natural y social como es la colmena. Es por eso que además se realizó la observación de diferentes comportamientos. Sin embargo, por el pequeño tamaño muestral con el que se contó no fue posible realizar análisis estadísticos pertinentes ni observar tendencias claras. Otro factor que entorpeció el experimento fue la elevada cantidad de abejas adultas dentro de la colmena, lo que significó una baja demanda relativa de obreras y, por lo tanto, la presencia de muchas abejas desempleadas. Esto se reflejó principalmente en el considerable tiempo dedicado al descanso, a caminar y al acicalamiento (Figura 55). Valores altos del primer comportamiento indican inactividad (Esch 1960) mientras que valores altos de los otros dos muestran que las abejas están activas buscando trabajo (Johnson 2008a).

En el futuro, este inconveniente se podría salvar armando una colmena de observación con una cantidad limitada de obreras con el objeto de que el trabajo faltante sea aportado por las adultas marcadas que son incorporadas *a posteriori*. De esta manera, habría menos desempleo y aumentaría el tiempo

dedicado a las otras actividades. Además, podrían seleccionarse ciertos comportamientos clave para analizar. Por ejemplo, se ha visto que el tiempo dedicado a descansar, caminar y acicalarse puede ser indicador de un comportamiento de malestar (Hurst *et al.* 2014) y ya hemos mencionado que el IMI afecta en menor o mayor medida estas variables. Es importante mencionar que el thiametoxam, otro neonicotinoide, afecta la capacidad de termoregulación de abejas africanas *Apis mellifera scutellata* (Tosi *et al.* 2016). Por lo tanto, sería interesante estudiar esta variable en las subcastas que elegimos ya que una modificación en la termoregulación no sólo altera la recolección sino las tareas realizadas dentro del nido (Farina y Wainselboim 2001, Stabentheiner *et al.* 2003).

4

Exposición crónica a imidacloprid y glifosato

Abreviaturas

AIC	Criterio de información de Akaike
EC	Estímulo condicionado
EC+	Estímulo condicionado recompensado
EC-	Estímulo condicionado no recompensado
GLI	Glifosato
GLM	Modelo lineal generalizado
GLMM	Modelo lineal generalizado mixto
ID	Índice de discriminación
IIT	Ingesta individual total
IMI	Imidacloprid
MA	Mortalidad acumulada
MMA	Modelo mínimo adecuado
RC	Respuesta condicionada
RE	Respuesta espontánea
REP	Respuesta de extensión de probóscide
RR	Respuesta refleja

4.1 Introducción

La intensificación de la práctica agrícola conlleva a que las colmenas estén cada vez más expuestas a múltiples agroquímicos (Wu *et al.* 2011, Krupke *et al.* 2012, Hladik *et al.* 2016, Traynor *et al.* 2016), dentro de los cuales se encuentran los pesticidas para el control de plagas y malezas. Dos de ellos son el IMI y el GLI, un insecticida y un herbicida cuyos usos incrementaron considerablemente en las últimas dos décadas (Hough 2014). El IMI se aplica mayormente a través del bañado de semillas, mediante el cual la planta asimila el compuesto al germinar y lo distribuye sistémicamente a medida que crece. También se puede aplicar en el suelo y la planta lo asimila a través de sus raíces (Elbert *et al.* 2008). El principal modo de aplicación del GLI es por rociado mediante pulverizadores terrestres (Giesy *et al.* 2000). Así, es esperable que las trazas de dos de los agroquímicos más populares y ampliamente utilizados coexistan en ecosistemas agrícolas y ambientes aledaños.

Estas metodologías significan una exposición a los agroquímicos para insectos no blanco y beneficiosos como la abeja *A. mellifera*. Esta especie es utilizada por la obtención de sus productos, como miel y cera, y como servicio de polinización. Dado su destino final, las abejas pueden recoger accidentalmente trazas de los agroquímicos en sus viajes de recolección, ya sea por contacto directo con los compuestos o por recolectar recursos contaminados. Las abejas pre-recolectoras, que permanecen dentro de la colmena, están expuestas a las trazas que se encuentran en el alimento y las abejas entrantes, pero también en los recursos almacenados en celdas (ver Capítulo 1). Concentraciones bajas de estos compuestos no son detectadas por abejas recolectoras (Schneider *et al.* 2012, Herbert *et al.* 2014), por lo que la entrada de recursos contaminados sería constante. Así, las abejas dentro de la colmena estarían expuestas a los compuestos de manera prolongada. Por lo tanto, nos propusimos estudiar el efecto de una exposición crónica y combinada al IMI y al GLI sobre abejas pre-recolectoras.

Los efectos de una mezcla química no son genéricos. Considerar una exposición combinada requiere evaluar si los efectos son aditivos o independientes, o si existe una interacción. Esta última puede ser del tipo

antagónica o sinérgica, donde la mezcla causa efectos menos o más severos que la suma de los efectos independientes de cada componente, respectivamente (Jonker *et al.* 2005). No obstante, estos últimos requieren el estudio de varias concentraciones de compuestos, práctica común de estudios toxicológicos. Esta Tesis tuvo como objetivo evaluar el efecto de estos agroquímicos en concentraciones realistas, por lo que se consideró sólo una concentración para cada pesticida. Por lo tanto, nos focalizamos en la evaluación de la existencia de una interacción simple entre ambos compuestos.

El efecto de la exposición combinada, que además de químicos incluyen factores biológicos y ambientales, ha sido objeto de investigación hace algunos años. Así, se han evaluado los efectos de una exposición combinada a pesticidas sobre la mortalidad, el desarrollo, el comportamiento recolector y el aprendizaje de abejas melíferas y otros polinizadores; y, en algunos casos, se han encontrado evidencias de sinergismo (Johnson *et al.* 2009, Wu *et al.* 2011, Gill *et al.* 2012, Williamson y Wright 2013). Se ha investigado además el efecto de pesticidas en combinación con patógenos sobre la mortalidad o la capacidad de esterilización (Alaux *et al.* 2010, Doublet *et al.* 2015) o cómo la exposición a los primeros afecta la susceptibilidad a los segundos (Pettis *et al.* 2012, Wu *et al.* 2012). También, se ha examinado la infección combinada de parásitos y patógenos, como virus y hongos, y se encontró sinergismo entre estos agentes (Bromenshenk *et al.* 2010, Nazzi *et al.* 2012, Vojvodic *et al.* 2012). Por último, se consideró la interacción entre la exposición a neonicotinoides y la humedad (Girolami *et al.* 2012). Sin embargo, nunca se consideró el efecto de una exposición conjunta a un insecticida y un herbicida.

La recolección de recursos es un proceso esencial en una colonia de abejas. Las abejas encargadas de esta tarea aprenden claves olfativas de las flores visitadas, lo cual les facilita encontrar el recurso en los próximos vuelos de recolección (von Frisch 1923). No obstante, la eficiencia de la recolección como un todo no depende exclusivamente de las abejas recolectoras sino también de una distribución rápida del alimento que facilite la transferencia de información entre las obreras (Grüter *et al.* 2009, Ramírez *et al.* 2010). Las abejas pre-recolectoras reciben información olfativa y gustativa acerca de la fuente de alimento y esta experiencia puede afectar las tareas que realicen a futuro dentro

y fuera del nido (Arenas *et al.* 2007). Por lo tanto, se propuso estudiar el efecto de los agroquímicos sobre la percepción gustativa y el aprendizaje olfativo de abejas pre-recolectoras.

4.2 Metodología

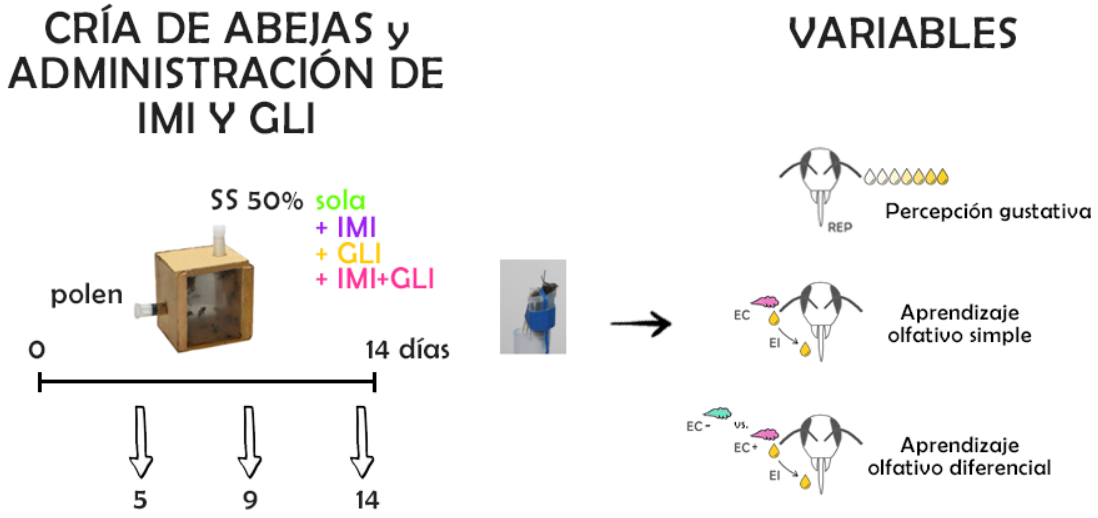

Figura 56. Esquema de procedimiento experimental para evaluar el efecto de la exposición crónica oral al IMI y al GLI sobre el comportamiento apetitivo.

4.2.1 Series experimentales

Los experimentos se realizaron en las temporadas de verano y otoño de los años 2014, 2015 y 2016. Las abejas adultas emergidas dentro de una incubadora en el laboratorio fueron colocadas en cajas de madera. Este proceso se realizaba cada 24 h, por lo que las 60 de una misma jaula no tenían más de un día de edad. Las abejas fueron alimentadas *ad libitum* con solución de sacarosa 50 % m/m y polen. La exposición crónica se logró alimentando a las abejas durante todo el periodo de cría con solución de sacarosa sola, con IMI, con GLI o con ambos. Las concentraciones finales de IMI y GLI fueron de 1 µg/l y 2,5 mg/l, respectivamente. Las mismas son subletales y, en el caso del IMI, realista a campo o, en el caso del GLI, representante de un escenario del peor caso (Cresswell 2011, Herbert *et al.* 2014). Las soluciones fueron reemplazadas cada dos o tres días. Las abejas fueron evaluadas a los 5, 9 o 14 días de edad. El día

del ensayo experimental, cada abeja fue amarrada en los cepos descriptos en la sección 2.3. Luego se las colocó en la incubadora durante una hora y media para disminuir el estrés causado por la manipulación.

4.2.2 Variables medidas

Se registró diariamente la cantidad de abejas muertas en cada caja de madera y el volumen de solución de sacarosa ingerido por los adultos. De allí, se pudo calcular la mortalidad y la ingesta durante el periodo de cría. Con el fin de evaluar el efecto de los agroquímicos sobre la mortalidad, se utilizó la cantidad de abejas acumuladas hasta el día en el que se realizó el ensayo comportamental (**mortalidad acumulada**, MA). Los valores de ingesta de cada jaula fueron relativizados al número de abejas vivas durante el periodo en el que se realizó la medición, y luego se sumaron. Así, se obtuvo un valor estimado del volumen total de solución de sacarosa ingerido por una abeja hasta el día en el que fue sometida a un ensayo comportamental (**ingesta individual total**, IIT).

Uno de los ensayos comportamentales consisitó en estimar la sensibilidad gustativa estimulando a las abejas con soluciones de sacarosa de concentración creciente. Al final del ensayo se obtuvo un **puntaje** para cada abeja (1-7), el cual corresponde a la cantidad de soluciones ante las cuales el individuo extendió su probóscide. Las abejas con puntaje igual a 0 fueron aquellas que no presentaron la respuesta refleja (RR) a solución de sacarosa 50 % m/m y no se incluyeron en el análisis.

El condicionamiento olfativo absoluto se realizó presentando 1-hexanol junto con solución de sacarosa 50 % m/m. A esto se lo consideró un ensayo. Se consideró que una abeja presentó una respuesta espontánea (RE) si extendió su probóscide ante el olor en el primer ensayo. Se registró la **respuesta condicionada** (RC) ante el olor durante los ensayos 2 a 5 y en el único ensayo de evaluación.

El condicionamiento olfativo diferencial consistió en presentar 1-hexanol junto con solución de sacarosa 50 % m/m y nonanal en ausencia de la misma. A cada presentación de olor se la consideró un ensayo y a las presentaciones de mismo orden de ambos olores se las consideró un par de ensayos. Se consideró

que una abeja presentó una respuesta espontánea (RE) a un olor si extendió su probóscide ante él en el primer ensayo. Se registró la respuesta condicionada (RC) ante los olores durante los pares de ensayos 2 a 5 y en en el par de ensayos de la evaluación. Para estimar la habilidad de discriminar entre dos olores en el condicionamiento, se definió un **índice de discriminación** (ID) para cada abeja como la diferencia entre las respuestas al estímulo condicionado recompensado (EC+, 1-hexanol) y las respuestas al estímulo condicionado no recompensado (EC-, nonanal). En cada par de ensayos, se consideró que una abeja fue capaz de discriminar sólo si extendiósu probóscide ante el EC+ y no ante el EC-. Para evaluar la dinámica durante la fase de entrenamiento, se calculó un ID para cada par de ensayos (valores de 0 ó 1). Además, se calculó un ID global como la cantidad de pares de ensayos en los que la abeja logró discriminar entre ambos olores (valores de 0 a 4). En la fase de evaluación, se calculó el ID del mismo modo que para cada par de ensayos de la fase de entrenamiento.

4.2.3 Análisis estadístico

El efecto de los factores sobre todas las variables se evaluó mediante análisis de modelos lineales generalizados (GLM) o modelos linealies generalizados mixtos (GLMM). Los modelos fueron ajustados en el programa R (R Development Core Team 2011), mediante el uso de la función glm para el primer caso y la función glmer del paquete lme4 (Bates *et al.* 2015) para el segundo. Se evaluó cada modelo posible y se compararon entre sí utilizando la parsimonia y los valores de AIC (*Akaike's information criterion*) como criterios, luego de lo cual se eligió el modelo mínimo adecuado (MMA). Las comparaciones *a posteriori* se realizaron utilizando la función glht del paquete multcomp (Hothorn *et al.* 2008).

Se realizaron tres análisis separados para estudiar la mortalidad acumulada a los días 5, 9 y 14. El efecto del tratamiento se evaluó mediante un GLMM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó a la presencia de IMI, la presencia de GLI y la temporada como factores fijos y la jaula como un

factor aleatorio. A pesar de que el último no fue estrictamente una fuente de variabilidad, su inclusión se requirió para evitar la sobredispersión.

Se realizaron tres análisis separados para estudiar la ingesta individual total a los días 5, 9 y 14. El efecto del tratamiento se evaluó mediante un GLM con estructura de error Gamma y función de enlace log, donde el modelo máximo incluyó a la presencia de IMI, la presencia de GLI y la temporada como factores.

La sensibilidad gustativa se estimó utilizando un puntaje arbitrario (ver sección 2.3). El efecto del tratamiento sobre esta variable se evaluó mediante un GLMM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó a la ingesta individual total, la presencia de IMI, la presencia de GLI y la edad como factores fijos y la jaula como un factor aleatorio.

En el estudio del aprendizaje asociativo en un condicionamiento clásico absolutoe, se excluyó a las abejas con una respuesta espontánea al EC. La comparación de desempeños durante la fase de entrenamiento entre tratamientos se evaluó mediante un GLMM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó a la ingesta individual total, la presencia de IMI, la presencia de GLI, la edad y el ensayo como factores fijos y a la jaula y la abeja como factores aleatorios. El efecto del tratamiento sobre la retención de memoria se evaluó mediante un GLMM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó a la ingesta individual total, la presencia de IMI, la presencia de GLI y la edad como factores fijos y a la jaula como un factor aleatorio.

En el estudio del aprendizaje asociativo en un condicionamiento clásico diferencial, se excluyó a las abejas con una respuesta espontánea a cualquier EC (valor de 1 en algún ensayo del primer par). Cuando se estudió el ID para cada par de ensayos, se utilizó un GLMM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó a la ingesta individual total, la presencia de IMI, la presencia de GLI, la edad y el ensayo como factores fijos y a la jaula y la abeja como factores aleatorios. Cuando se estudió el ID global, se utilizó un GLMM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó a la ingesta individual total, la presencia de IMI, la presencia de GLI y la edad como factores fijos y a la jaula como factor aleatorio. El efecto del tratamiento sobre la retención de memoria se evaluó mediante un GLMM con estructura de error

binomial, donde el modelo máximo incluyó a la ingesta idividual total, la presencia de IMI, la presencia de GLI y la edad como factores fijos y a la jaula como factor aleatorio.

4.3 Resultados

4.3.1 Mortalidad e ingesta

Para estudiar la mortalidad, se utilizó la cantidad total de abejas muertas hasta los días 5, 9 y 14. **La presencia de agroquímicos en la solución de sacarosa no afectó la MA** en ninguno de los periodos de exposición evaluados (Figura 57; GLMM con estructura binomial, MA_5 ~ Jaula, MA_9 ~ Jaula, MA_{14} ~ Jaula, Tabla 25-Tabla 27). Los valores máximos de mortalidad variaron alrededor del 10 %, con la excepción de una jaula perteneciente al grupo Control.

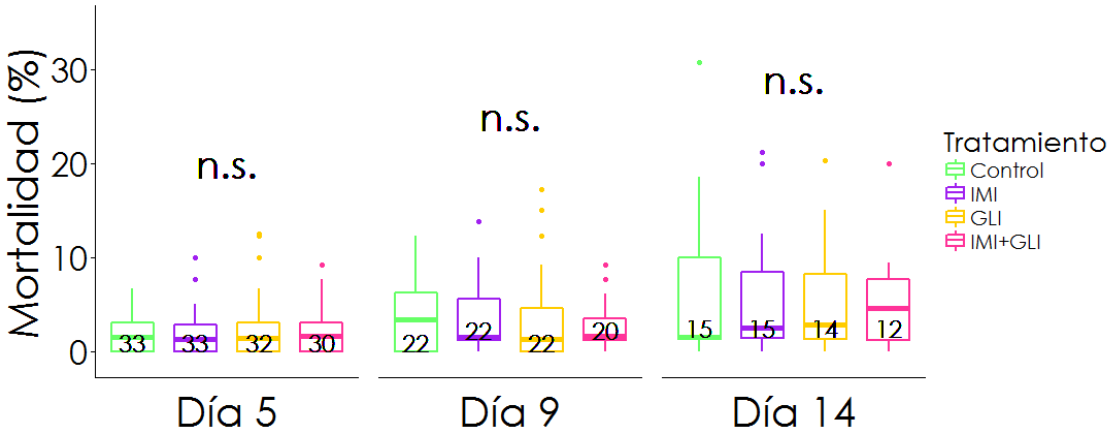

Figura 57. Efecto de la exposición crónica al IMI, al GLI y la mezcla de ambos sobre la mortalidad. Porcentaje de abejas muertas acumuladas al día 5, 9 o 14 luego de haber sido criadas con solución de sacarosa sola (Control, verde), con IMI (violeta), con GLI (naranja) o con ambos (fucsia). La línea gruesa, la caja y los bigotes representan la mediana, el rango intercuartil y el rango de datos excluyendo los datos extremos (puntos negros), respectivamente. Los números dentro de las cajas indican el tamaño muestral. "n.s." indica diferencias no significativas ($p > 0{,}05$) entre tratamientos. MMAs: MA_5 ~ Jaula, MA_9 ~ Jaula, MA_{14} ~ Jaula.

Para el estudio de ingesta, se utilizó la ingesta individual total (IIT) al día 5, 9 o 14. La presencia del IMI no tuvo efecto sobre la IIT. Por el contrario, **la presencia de GLI sí afectó la ingesta luego de todos los periodos**

considerados, dependiendo de la temporada en la que tuvo lugar el experimento (GLM con estructura Gamma, IIT_5 ~ GLI*Temporada, IIT_9 ~ GLI*Temporada, IIT_{14} ~ GLI*Temporada, Tabla 28-Tabla 30). Las abejas alimentadas con solución de sacarosa con GLI, tanto solo como junto con IMI, mostraron una reducción en la ingesta total sólo en la temporada 2014. Este resultado se obtuvo luego de 5, 9 o 14 días de exposición (Figura 58). La presencia de GLI no tuvo efecto sobre esta variable en las temporadas 2015 y 2016.

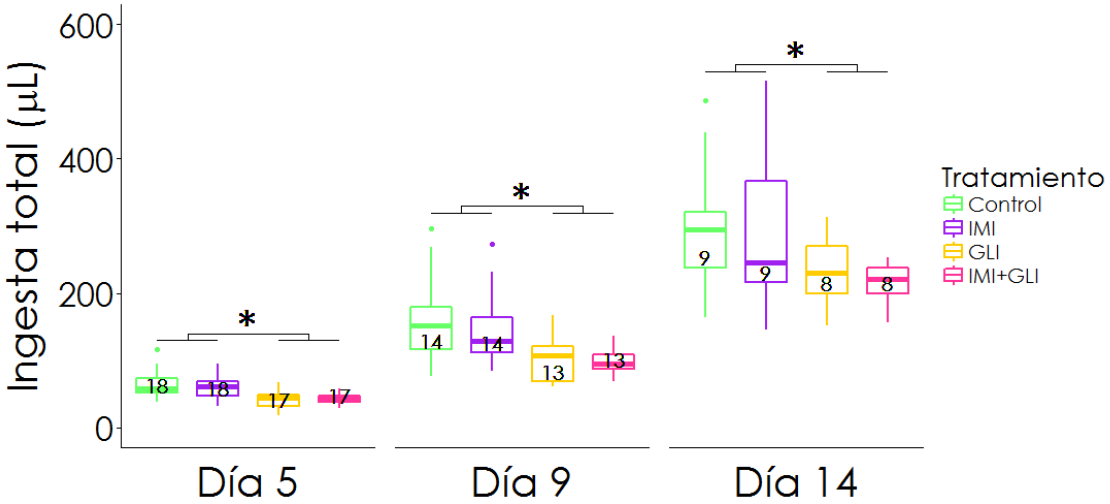

Figura 58. Efecto de la exposición crónica al IMI, al GLI y la mezcla de ambos sobre la ingesta. Volumen total de solución de sacarosa ingerido por una abeja al día 5, 9 o 14 luego de haber sido criada con solución de sacarosa sola (Control, verde), con IMI (violeta), con GLI (naranja) o con ambos (fucsia). Sólo se muestran los resultados de la temporada 2014. La línea gruesa, la caja y los bigotes representan la mediana, el rango intercuartil y el rango de datos excluyendo los datos extremos (puntos), respectivamente. Los números dentro de las cajas indican el tamaño muestral. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos correspondientes. MMAs: IIT_5 ~ GLI*Temporada, IIT_9 ~ GLI*Temporada, IIT_{14} ~ GLI*Temporada.

El consumo total de IMI y GLI se calculó teniendo en cuenta la IIT y la concentración final de los compuestos en la solución de sacarosa. Las abejas expuestas al IMI solo durante 14 días incorporaron cerca de 0,25 ng, cantidad que fue utilizada en el capítulo 3 para evaluar los efectos de la exposición aguda. Las abejas criadas durante menos días naturalmente incorporaron una cantidad total menor. Las abejas expuestas al IMI junto con GLI incorporaron una menor cantidad, dado que su IIT fue menor. El consumo total de GLI luego de 14 días fue alrededor de 0,6 µg por abeja. Nuevamente, las abejas expuestas por menos tiempo incorporaron una cantidad menor (Tabla 4).

Tabla 4. Consumo total de agroquímicos durante la crianza.

Tratamiento	Tiempo de exposición	n	IMI total (ng/abeja)	GLI total (µg/abeja)
IMI	5	27	0,057	-
	9	20	0,137	-
	14	13	0,249	-
GLI	5	28	-	0,112
	9	22	-	0,259
	14	14	-	0,664
IMI + GLI	5	26	0,044	0,110
	9	20	0,103	0,340
	14	12	0,228	0,570

"n" indica la cantidad de jaulas utilizadas.

4.3.2 Percepción gustativa

Para el estudio de sensibilidad a la sacarosa, se estimuló a las abejas con soluciones de sacarosa de concentración creciente. Se definió un puntaje como la suma de las respuestas positivas durante el procedimiento. Como este experimento se realizó en la temporada 2014, se incorporó la ingesta total como variable explicatoria en el análisis (ver sección 4.3.1). La ingesta total de solución de sacarosa no tuvo efecto sobre la sensibilidad gustativa. **El efecto del tratamiento no dependió de la edad** en la que fueron evaluadas las abejas dado que la interacción entre estos factores no está incluida en el modelo (GLMM con estructura binomial, Puntaje ~ IMI*GLI + Edad + Jaula, Tabla 31). Por un lado, todos los grupos tratamiento difirieron del control. **La presencia de IMI, GLI o ambos en el alimento resultaron en puntajes menores**, lo que implica un aumento en los umbrales de respuesta al azúcar de esas abejas. La presencia de un agroquímico adicional no modificó la sensibilidad gustativa, en comparación con la presencia de uno u otro agroquímico solo (Figura 59, izquierda). Por otro lado, las abejas de 14 días tuvieron un puntaje menor que las abejas más jóvenes, aunque el análisis estadístico sólo confirmó una diferencia con las de 9 días de edad. En otras palabras, su sensibilidad gustativa fue menor (Figura 59, derecha).

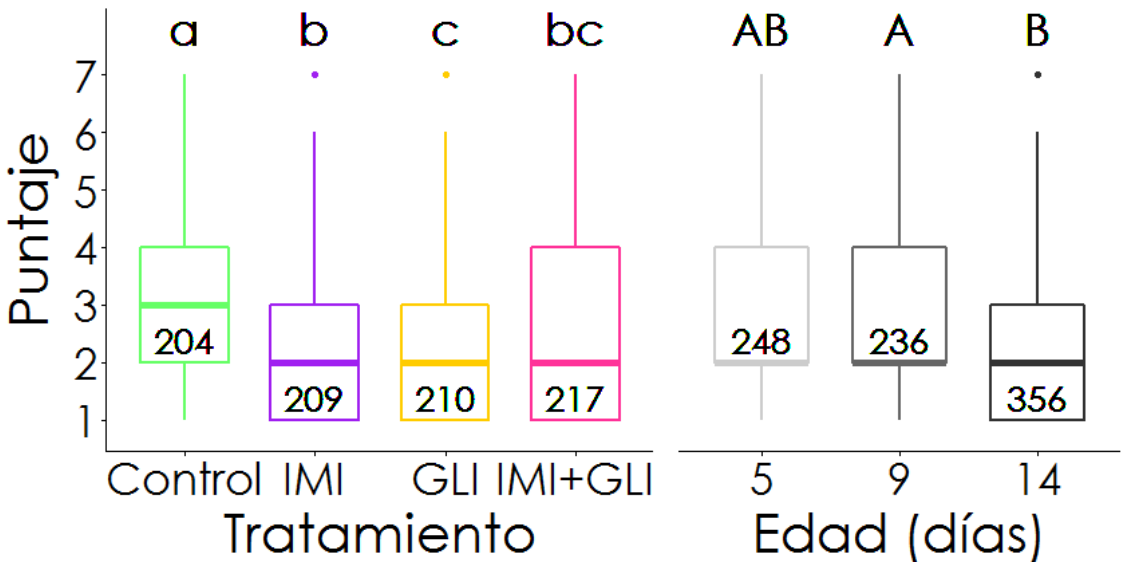

Figura 59. Efecto de la exposición crónica a agroquímicos sobre la percepción gustativa de abejas jóvenes. Puntaje obtenido en un protocolo de umbral de respuesta a la sacarosa. Las abejas utilizadas tenían 5 (gris claro), 9 (gris medio) o 14 (negro) días de edad y fueron criadas con solución de sacarosa sola (Control, verde), con IMI (violeta), con GLI (naranja) o con ambos (fucsia). Modelo mínimo adecuado: Puntaje ~ IMI*GLI + Edad + Jaula. El cuadrado, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Las letras diferentes reflejan diferencias significativas entre los niveles dentro de cada factor Tratamiento o Edad ($p < 0,05$). MMA: Puntaje ~ IMI*GLI + Edad + Jaula.

4.3.3 Aprendizaje olfativo

4.3.3.1 Condicionamiento absoluto

Para el estudio del aprendizaje olfativo en un condicionamiento absoluto, se estimuló a las abejas con un olor acompañado de solución de sacarosa 50 % m/m en cinco presentaciones (fase de entrenamiento). Luego, el olor (estímulo condicionado, EC) se presentó solo una única vez (fase de evaluación). Se consideró que una abeja presentó una RC cuando extendió su probóscide ante la presentación del olor. La ingesta individual total no tuvo efecto sobre la RC durante la fase de entrenamiento. Existió un efecto del tratamiento, el cual dependió de la edad en la que se evaluó a las abejas dado que la interacción entre estos factores está incluido en el modelo (Figura 60, izquierda; GLMM con estructura binomial, REP ~ IMI*GLI*Edad + Ensayo + Jaula + Abeja, Tabla 32). **Las abejas de 9 días o mayores estuvieron exentas al efecto de los agroquímicos**. **Las abejas de 5 días de edad que estuvieron expuestas**

al IMI solo mostraron un desempeño empobrecido en la fase de entrenamiento del condicionamiento olfativo. Sorprendentemente, las abejas que se alimentaron de la solución que contenía tanto IMI como GLI mostraron un desempeño diferente de las primeras y similar a las del grupo control. En otras palabras, **el efecto del IMI se observó en el caso de las jaulas que lo consumieron exclusivamente, y no junto con GLI**. El tratamiento no tuvo efecto sobre la RC en la fase de evaluación. No obstante, la ingesta total durante el periodo de cría sí tuvo una influencia sobre la probabilidad de extensión de probóscide ante el EC. (Figura 60, derecha; GLMM con estructura binomial, REP ~ IIT + Jaula, Tabla 33).

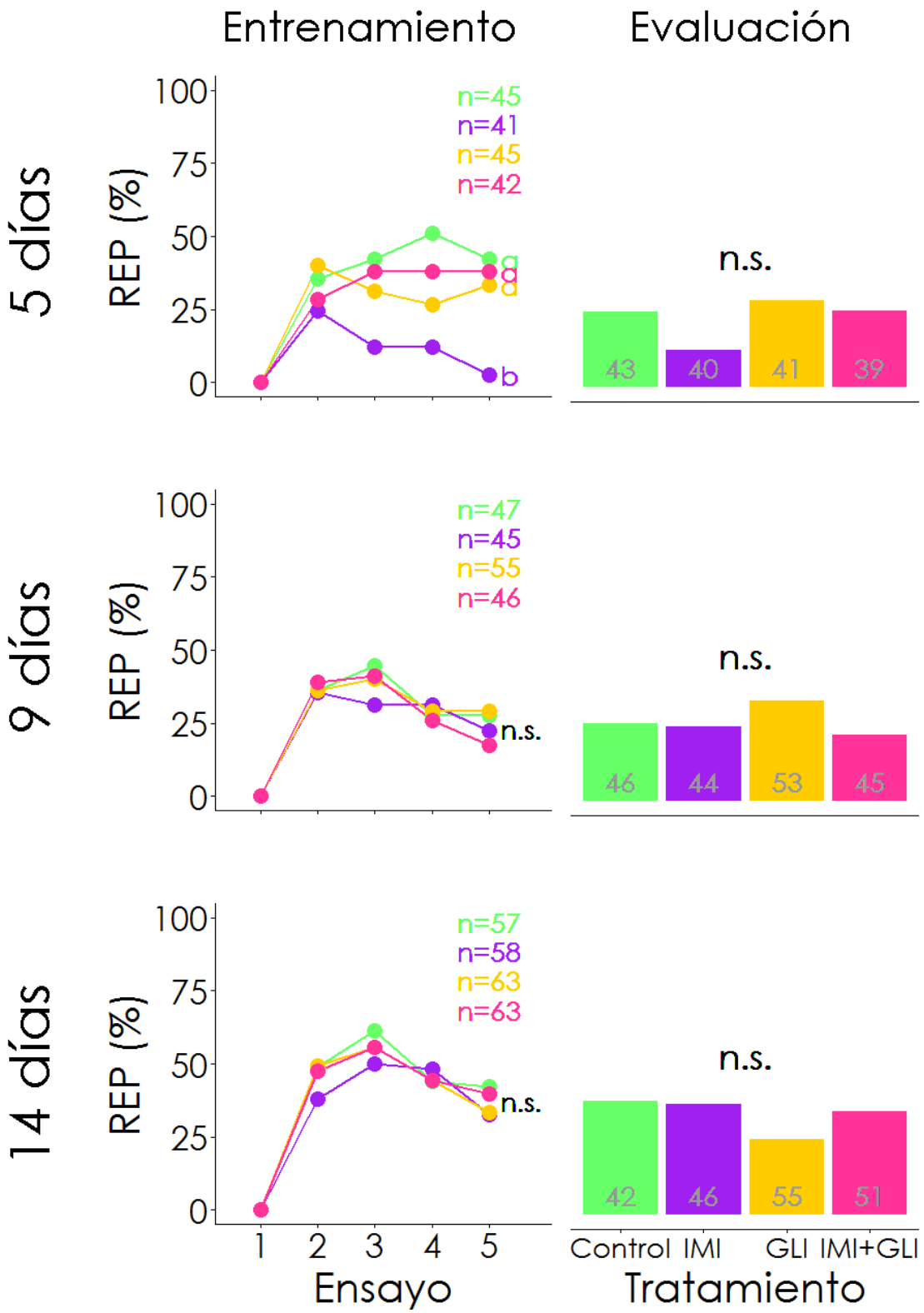

Figura 60. Efecto de la exposición crónica a agroquímicos sobre el aprendizaje olfativo simple. Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide antes el EC en la fase de entrenamiento (izquierda) y en la fase de evaluación (derecha) de un condicionamiento clásico simple. Las abejas utilizadas tenían 5, 9 o 14 días de edad y fueron criadas con solución de sacarosa sola (Control, verde), con IMI (violeta), con GLI (naranja) o con ambos (fucsia). Modelos mínimos adecuados: REP ~ IMI*GLI*Edad

+ Ensayo + Jaula + Abeja (Entrenamiento) y REP ~ IIT + Jaula (Evaluación). Los números dentro de las barras indican el tamaño muestral. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos correspondientes. "n.s." indica diferencias no significativas entre tratamientos. MMAs: REP ~ IMI*GLI*Edad + Ensayo + Jaula + Abeja (entrenamiento), REP ~ IIT + Jaula (evaluación).

4.3.3.2 Condicionamiento diferencial

Para el estudio del aprendizaje olfativo en un condicionamiento diferencial, se estimuló a las abejas con un olor acompañado de solución de sacarosa 50 % m/m (EC+) y con otro olor no recompensado (EC-). La fase de entrenamiento consistió en 5 presentaciones recompensadas y 5 presentaciones no recompensadas. Luego, el EC+ el y EC- se presentaron una vez en ausencia de la recompensa (fase de evaluación). Para el análisis de los datos, se definió un ID. Se consideró que una abeja discriminó entre el EC+ y el EC- sólo si extendió su probóscide antes el primero y no ante el segundo (ID = 1). Se calculó un ID por par de ensayos de la fase de entrenamiento y también un ID global como la suma de estos ID.

La IIT no tuvo efecto sobre el desempeño durante la fase de entrenamiento. El efecto del tratamiento sobre el ID y el ID global dependió de la edad en la que se evaluó la abeja (GLMM con estructura binomial, ID ~ IMI*GLI*Edad + Par de ensayos + Jaula + Abeja, ID global ~ IMI*GLI*Edad + Jaula, Tabla 34 y Tabla 35). Las abejas de 5 días de edad expuestas al IMI mostraron una capacidad de discriminación olfativa menor que las abejas no expuestas a agroquímicos. El GLI no afectó esta variable. La exposición dual generó un nivel intermedio de discriminación dado que este grupo se encontró estadísticamente indefinido entre el grupo IMI y el grupo GLI, y no fue diferente de las abejas control (Figura 61, izquierda). Las abejas de 9 días expuestas a ambo agroquímicos mostraron un desempeño empobrecido en la fase de entrenamiento. En la fase de evaluación, ninguna variable afectó el ID (Figura 61, derecha; GLMM con estrucutra binomial, ID ~ Jaula, Tabla 36). En resumen, **el IMI afectó la adquisición del aprendizaje olfativo diferencial en abejas de 5 y 9 días, pero el IMI sólo lo afectó en abejas de 9 días. Las abejas de edad mayor se mostraron insensibles a los efectos de los agroquímicos.**

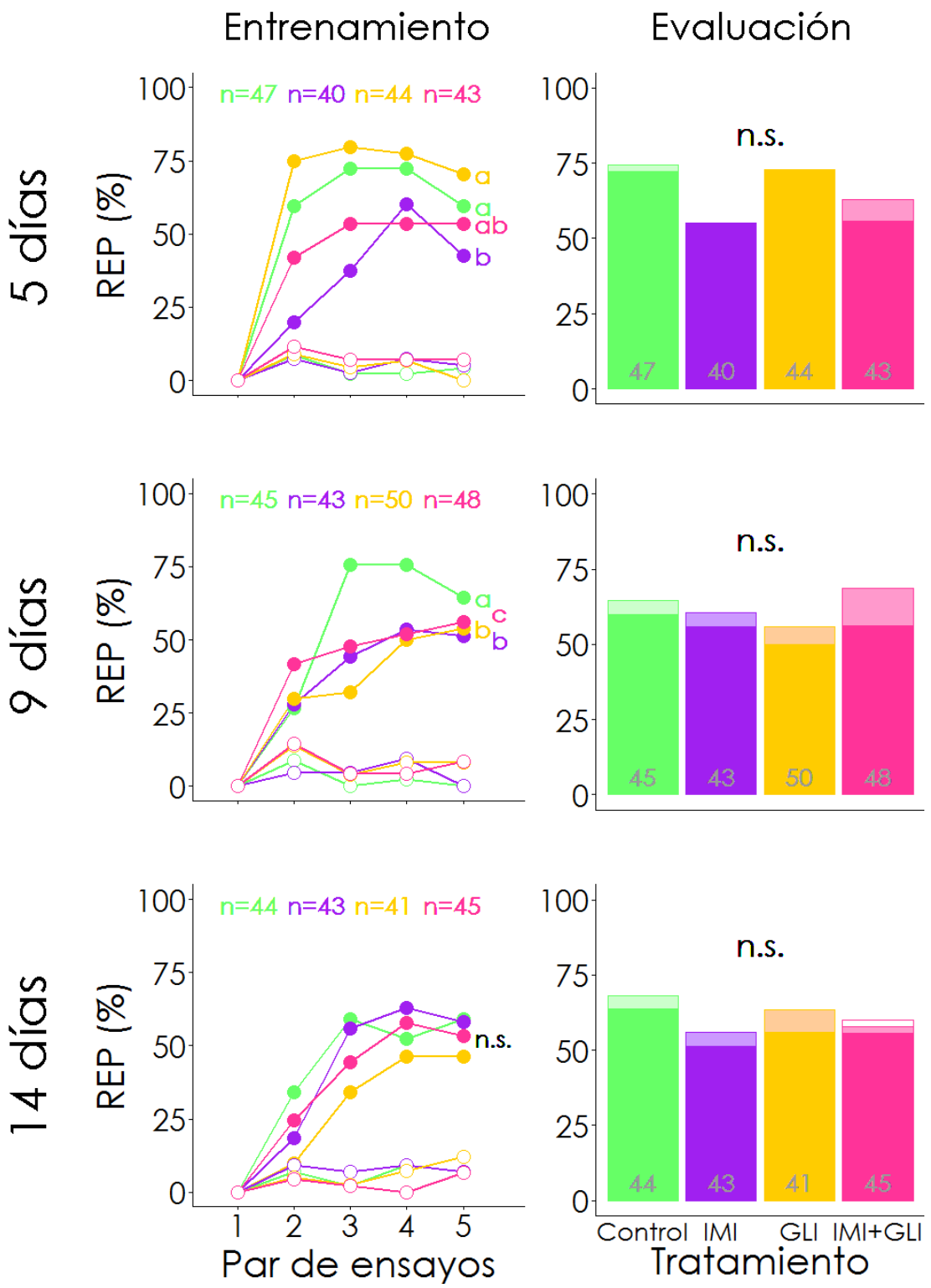

Figura 61. Efecto de la exposición crónica a agroquímicos sobre la discriminación olfativa en el contexto de aprendizaje. Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (REP) ante los EC durante un condicionamiento olfativo diferencial. Izquierda: REP ante el EC+ (círculos llenos) y ante el EC- (círculos vacíos) en la fase de entrenamiento. Derecha: REP sólo ante el EC+ (barras llenas), sólo ante el EC- (barras vacías) o ante ambos (barras diluidas) en la fase de evaluación. Las abejas utilizadas tenían 5, 9 o 14 días de edad y fueron criadas con solución de sacarosa sola (Control, verde), con IMI (violeta), con

GLI (naranja) or con ambos (fucsia). Los números dentro de las barras indican el tamaño muestral. Entrenamiento: ID ~ IMI*GLI*Edad + Par de ensayos + Jaula + Abeja, ID global ~ IMI*GLI*Edad + Jaula. Evaluación: ID ~ Jaula.

4.4 Discusión

Los jóvenes adultos de la abeja *A. mellifera* muestran una alta plasticidad comportamental y fisiológica (Arenas *et al.* 2013). Durante esas edades, las abejas de la casta obrera realizan tareas dentro de la colmena que garantizan el mantenimiento y el cuidado de la colonia (Lindauer 1952, Seeley 1982). De acuerdo con la evidencia obtenida en esta sección, se puede concluir que las concentraciones de IMI y GLI ofrecidas resultaron subletales. En concordancia con los resultados de la exposición aguda, el IMI afectó negativamente los umbrales de respuesta al azúcar y el aprendizaje olfativo de las abejas, dependiendo de su edad. El glifosato redujo la sensibilidad gustativa y, en un caso, la capacidad de discriminación olfativa, pero no interfirió con el aprendizaje olfativo simple. Algunos resultados sugirieron una interacción entre ambos pesticidas, pero no hubo evidencia clara sobre este aspecto.

Concentraciones subletales

El rango de concentración de IMI en néctar realista a campo es de 0,7-10 µg/l (Cresswell 2011). Por lo tanto, la concentración utilizada en este trabajo se encontró dentro del mismo y es 10 veces menor que la concentración realista máxima. Además de esto, esta concentración es subletal dado que los grupos de abejas expuestas a ésta resultan en una mortalidad promedio del 10 % (Cresswell 2011). Un trabajo utilizó abejas de edad recolectora en grupos de 20 y las expuso a 2,56 µg/l de IMI en solución de sacarosa 30 % m/m por 3 días. Este periodo no es precisamente crónico dado que es menor a 96 h, pero tampoco lo es agudo porque la administración no consistió de una única dosis (Medrzycki *et al.* 2013). El consumo individual total fue de 1,3 ng. Esta exposición generó una mortalidad de 20 % (Williamson y Wright 2013). Otro trabajo utilizó abejas capturadas dentro de la colmena, sobre cuadros con polen y néctar. Grupos de 30 abejas fueron expuestas a 0,1, 1 y 10 µg/l de IMI en solución de sacarosa 50 % m/m por 10 días. A las 72 horas, la mortalidad fue del 10 % para todas las

concentraciones. Sin embargo, luego siguió en aumento y al día 10 las abejas expuestas a la concentración menor presentaron un 40 % de mortalidad mientras que las expuestas a la intermedia – igual a la utilizada en esta Tesis – y a la más alta alcanzaron una mortalidad del 70 % (Suchail *et al.* 2001). Esto indicaría que las concentraciones utilizadas no son subletales. Sin embargo, el trabajo utilizó grupos de 30 abejas, cantidad seguramente insuficiente para criar abejas adultas *in vitro* durante tanto tiempo (Williams *et al.* 2013).

La concentración de GLI utilizada es similar a la más alta encontrada en entornos agrícolas (Giesy *et al.* 2000). Además, es subletal dado que la mortalidad a los 14 días fue entre 0 y 20,3 %, con un promedio alrededor del 6 %. Esta propiedad también fue verificada en el pasado, donde la misma concentración durante el mismo periodo de exposición generó un 24,1 % de mortalidad promedio (Herbert *et al.* 2014).

Consumo de alimento

El glifosato disminuyó la ingesta de solución de sacarosa durante la crianza. Este efecto puede deberse a dos fenómenos. Por un lado, las abejas podrían percibir la presencia del glifosato en la solución de sacarosa, el cual tendría un valor negativo, y decidir alimentarse menos. Por el otro, la incorporación del glifosato podría tener un efecto adverso sobre el estado interno de la abeja, el cual tendría como consecuencia que se alimente menos. Dado que la exposición fue crónica y que a las abejas no se les ofreció una solución de sacarosa alternativa libre de glifosato, no se puede distinguir entre estas dos hipótesis. En cuando a la primera hipótesis, se ha visto que abejas recolectoras a las cuales se ofreció una fuente de solución de sacarosa con 2,5 mg/l de GLI continuaron visitándola (Herbert *et al.* 2014) por lo que indicaría que ~~o~~ existe un rechazo. No obstante, el estado fisiológico y la motivación de las abejas recolectoras podría comprometerlas a seguir visitando una fuente no palatable (Ayestaran *et al.* 2010). Más allá de la explicación, el hecho de que las abejas expuestas al GLI se alimentaran menos agregó una fuente de variabilidad a los análisis subsiguientes. Es por ello que se tuvo en cuenta esta variable en los estudios de comportamiento apetitivo. No obstante, se concluyó que en los casos que estas abejas se distinguieron del resto, se comprobó que se debió a la exposición al GLI y no al hecho de una ingesta menor.

La presencia de IMI no afectó la ingesta total de solución de sacarosa. Esto se encuentra en concordancia con otro trabajo donde las abejas alimentadas por 24 h con 2,56 µg/l (10 nM) de IMI presentes en solución de sacarosa 30 % m/m consumieron la misma cantidad que las abejas alimentadas con solución de sacarosa sola (Kessler *et al.* 2015). Además, es consistente con el hecho de que el IMI no actuaría sobre la periferia quimiosensorial, olfativa (Capítulo 3.2) o gustativa (Kessler *et al.* 2015).

Efecto sobre percepción gustativa

Tanto el IMI como el GLI afectaron negativamente la percepción gustativa de las abejas de todas las edades. En ambos casos, las abejas expuestas a los pesticidas mostraron una mayor probabilidad de REP ante concentraciones más altas que las abejas control, lo cual se interpreta como un umbral de respuesta más alto.

El efecto del GLI encontrado sobre la percepción gustativa se observó en otro trabajo, donde abejas alimentadas por 15 días desde su emergencia como adultas con 2,5 y 5 µg/l de GLI presentaron puntajes menores que abejas criadas en ausencia del compuesto. En este caso los autores utilizaron una concentración adicional más alta, cuya magnitud de efecto fue igual a la dosis más baja. Además de la concordancia en el sentido del efecto, hubo coincidencia en los valores de puntajes. Teniendo en cuenta sólo las abejas de esta Tesis que fueron criadas durante 14 días, periodo equivalente al utilizado por los otros autores, en ambos estudios las abejas control presentaron un puntaje con mediana de 3 mientras que las abejas expuestas a 2,5 µg/l, un puntaje igual a 2 (Herbert *et al.* 2014).

El efecto de la exposición crónica al IMI sobre la sensibilidad gustativa no ha sido estudiado. No obstante, tomando el valor de consumo total del insecticida como una dosis, el efecto del IMI crónico es similar al observado luego de una exposición aguda (Eiri y Nieh 2012). Es importante destacar que el protocolo utilizado no permite distinguir sensibilidad periférica de estado interno de la abeja en cuanto a su influencia sobre la extensión de la probóscide. No obstante, se ha encontrado que la respuesta a la sacarosa de neuronas gustativas en sensilias basicónicas de la galea se mantuvo inalterada si las abejas habían sido

alimentadas *ad libitum* por 24 horas con 0,26, 2,56 y 25,6 µg/l IMI (Kessler *et al.* 2015).

Efecto sobre aprendizaje

El IMI afectó negativamente el aprendizaje asociativo simple sólo en el caso de las abejas de 5 días. Las abejas de esta edad que consumieron IMI mostraron una dinámica de adquisición empobrecida, donde la probabilidad de REP ante el EC disminuyó a partir del segundo ensayo y culminó en un valor cercano a 0 al final del entrenamiento. A pesar de que también se observó una disminución en esta variable en la fase de evaluación, esta diferencia no fue sustanciada estadísticamente (Figura 60). Se encontró una acción similar en abejas recolectoras alimentadas durante 4 días con 2,56 µg/l de IMI, quienes mostraron una tasa de adquisición disminuida en un condicionamiento de 6 ensayos con 1-hexanol, pero una retención de memoria a corto y largo término igual a la de abejas no expuestas (Williamson y Wright 2013). Sin embargo, en contraposición a esos resultados, nuestras abejas de 14 días – edad más cercana a la recolección – no fueron afectadas por IMI. Es posible que esta discrepancia se deba a que la concentración utilizada en esta Tesis es mucho menor (más de dos veces) y, dado el menor consumo de solución de sacarosa por abejas más jóvenes, estas últimas acumularon 0,25 ng del neonicotinoide, en contraposición a los 1,3 ng totales que incorporaron las abejas recolectoras del otro estudio. Al igual que en el condicionamiento absoluto, el IMI tuvo un efecto negativo sobre la fase de entrenamiento en el condicionamiento diferencial (Figura 61, izquierda).

Resulta interesante que el IMI y el GLI no tuvieron efecto de abejas de 9 días en el condicionamiento absoluto, pero sí en el condicionamiento diferencial. Esto indica que el condicionamiento diferencial es más apropiado para detectar efectos sutiles sobre el comportamiento. Este protocolo pone a prueba, además de asociar un olor con una recompensa, la capacidad de diferenciarlo de otro que no está asociado con ella. En este aprendizaje, por lo tanto, se puede evidenciar si un olor es discriminado de otro. Los olores utilizados en este trabajo fueron seleccionados por ser perceptualmente disímiles para *A. mellifera* (Guerrieri *et al.* 2005). Sin embargo, en la fase de evaluación del condicionamiento absoluto hubo una alta probabilidad de respuesta hacia el

olor novedoso, el nonanal (Figura 62, barras diluidas). Esto podría deberse a que las abejas confundieron el nonanal con el 1-hexanol o a que la asociación fue olor-inespecífica. Respecto de la primera hipótesis, se ha encontrado que el IMI disminuye la distancia perceptual entre representaciones de olor en los glomérulos de los LAs (Andrione *et al.* 2016). Este fenómeno de generalización podría explicar, en parte, los efectos observados sobre el aprendizaje en el condicionamiento diferencial. Así, el efecto del IMI sobre las abejas de 9 días se evidencia recién cuando el aprendizaje asociativo incorpora un olor adicional. Esto sugiere que el IMI podría estar actuando a nivel del sistema nervioso central, en estructuras como los MBs y los LAs – ambas regiones que albergan nAChRs - sobre el proceso de formación de memorias y la percepción olfativa, respectivamente (Gauthier y Grünewald 2012). Respecto del GLI, su mecanismo de acción sobre la percepción olfativa es desconocido, por lo que no podemos inferir sobre qué estructuras o evento de establecimiento de la asociación podría estar actuando. No obstante, se ha encontrado que altera el desarrollo neuronal en ratas como consecuencia de una disminución de la expresión de *Wnt5a* (Coullery *et al.* 2016), gen de la familia *Wnt* la cual está altamente conservada ya que se encuentra también en humanos, *Drosophila* y *Xenopus* (Nusse y Varmus 1992).

Figura 62. Efecto de la exposición crónica a agroquímicos sobre la REP a los olores presentados en la fase de evaluación de un condicionamiento absoluto. Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (REP) sólo ante el EC (barras llenas) o ante ambos EC y olor novedoso (barras diluidas). Las abejas utilizadas tenían 5, 9 o 14 días de edad y fueron criadas con solución de sacarosa sola (Control, verde), con IMI (violeta), con GLI (naranja) or con ambos (fucsia). Los números dentro de las barras indican el tamaño muestral.

El efecto de una exposición al GLI durante dos semanas ya ha sido estudiado (Herbert *et al.* 2014). En este caso, los autores encontraron que el GLI tuvo un

efecto negativo sobre el aprendizaje. No obstante, este compuesto generó una disminución de la probabilidad de REP sólo en el segundo ensayo de la fase de entrenamiento, y no en el tercero o en la fase de evaluación. En esta Tesis, no se encontró efecto alguno sobre el aprendizaje asociativo simple. Puede ser que esta discrepancia —aunque no una contradicción— se deba a variables no controladas que difirieron entre ambos experimentos.

Diferencias entre edades

El efecto de los agroquímicos sobre la percepción gustativa no dependió de la edad, lo que indica que su mecanismo de acción sobre esta vía no depende de la fisiología del animal o del tiempo de exposición. Más allá del tratamiento, las abejas de 14 días exhibieron una sensibilidad a la sacarosa menor que las abejas de 9 días. Esto es sorprendente ya que se espera que esta variable aumente con la edad de la abeja (Scheiner *et al.* 2004).

El efecto de los agroquímicos sobre el aprendizaje sí fue dependiente de la edad. *A priori*, uno creería que la magnitud del efecto aumentara con el tiempo de exposición debido a la acumulación de la sustancia ya que las abejas criadas en una jaula sólo defecan si son liberadas a una arena donde son capaces de volar (Núñez 1970). Sin embargo, se observó el fenómeno contrario, donde la fuerza del efecto del IMI decreció con la edad. Por lo tanto, se puede afirmar que el efecto diferencial del IMI se atribuye a la edad de la abeja y no al tiempo de exposición al compuesto.

Esto puede deberse a diferencias en el proceso de detoxificación. La detoxificación suele involucrar la actividad de oxigenasas. De hecho, el IMI incorporado por la abeja es metabolizado y los productos son el resultado de la acción de múltiples oxidasas (Suchail *et al.* 2004). Focalizándonos en este proceso, pueden existir dos explicaciones posibles para los resultados observados. Por un lado, dadas las especializaciones fisiológicas y anatómicas según la edad de la obrera (Winston 1987), puede que las abejas más jóvenes tengan una menor capacidad de detoxificación que las de más edad. Se ha visto esta correlación negativa con la edad al medir la toxicidad de un piretroide. Sin embargo, la sensibilidad a un organofosforado aumentó con la edad (Rinkevich *et al.* 2015). Los casos de sensibilidad decreciente al IMI y al piretroide pueden explicarse por el aumento de la actividad oxidativa del sistema P450 con la edad

(Smirle y Winston 1988). Se desconoce la variación temporal de la actividad de las enzimas encargadas de metabolizar el otro compuesto. Siguiendo esta línea de pensamiento, se ha visto una toxicidad diferencial de los metabolitos de IMI según la edad de la abeja. Así, los autores proponen que existen dos subpoblaciones de nAChRs, las cuales tienen diferente afinidad por el IMI y sus metabolitos. Sobre la base de los resultados, sugieren que el blanco del 5-hidroxi-imidacloprid no es expresado antes de los 8 días de edad. En abejas de edad recolectora este metabolito se genera a los 20 minutos de ingestión de IMI y hasta, al menos, 72 horas después (Suchail *et al.* 2004). Por lo tanto, teniendo en cuenta estos dos factores, se podría inferir que nuestras abejas de 5 días aún no metabolizaron —o lo hicieron pobremente— el IMI a 5-hidroxi-imidacloprid.

Por otro lado, dado que las abejas más jóvenes incorporaron una cantidad total menor de IMI (Tabla 4), puede hipotetizarse que la baja dosis del insecticida no sea suficiente para inducir un proceso de detoxificación. El mecanismo de este efecto puede explicarse porque que altas cantidades del compuesto activan una población mayor de receptores y esto puede dar lugar a una acción compensatorio que induciría un efecto protector (Nagata *et al.* 1998).

Efecto combinado

La existencia de una interacción entre dos compuestos significa que sus efectos no son aditivos ni independientes. A pesar de que los estudios toxicológicos que evalúan esta propiedad suelen incluir varias concentraciones de cada compuesto (Jonker *et al.* 2005), esta Tesis se focalizó en la evaluación de la existencia de una interacción simple entre concentraciones realistas de los compuestos.

En cuanto su efecto sobre la sensibilidad gustativa, la exposición dual al herbicida y al insecticida generó un déficit en esta variable pero no difirió de la exposición a uno u otro por separado. Por lo tanto, en este caso no hay evidencia de interacción entre ambos compuestos o incluso de aditividad. Esta relación de efectos se mantiene cuando nos focalizamos en el aprendizaje asociativo diferencial.

Diferente es el caso del condicionamiento asociativo absoluto de abejas de 5 días. En este caso, el IMI tiene un efecto perjudicial sobre la fase de

entrenamiento y el GLI no tiene efecto. Así, suponiendo que no hay interacción entre ambos compuestos, se predice que la exposición dual tendrá la magnitud de efecto del IMI. Sin embargo, el agregado de los agroquímicos al alimento no tuvo efecto. Por lo tanto, se observa un patrón consistente con el esperado suponiendo interacción. No obstante, es importante recordar que la ingesta total de solución de sacarosa de las abejas criadas con GLI fue menor que las criadas sin el herbicida. Por ende, las abejas del grupo IMI + GLI inevitablemente incorporaron menos insecticida que las abejas del grupo IMI (Tabla 4). Es por esta razón que el consumo IMI fue incluido como variable al momento de encontrar el modelo mínimo adecuado que explicara la variabilidad en la REP del condicionamiento. De este análisis se concluyó que el factor queda descartado como variable explicatoria. Sin embargo, puede que el efecto biológico de un factor exista, pero no sea detectado estadísticamente debido a una limitación en la potencia.

5

Discusión general

La relación estrecha que existe entre la abeja *A. mellifera* y los ambientes agrícolas genera una situación de riesgo para esta especie beneficiosa. La exposición al IMI y al GLI, dos de los agroquímicos más utilizados a nivel global, es altamente plausible. Las abejas recolectoras pueden recoger accidentalmente trazas de estos compuestos e ingresarlos a sus colmenas. En cuanto a su presencia en néctar, las dosis utilizadas en esta Tesis no son percibidas por abejas recolectoras ni alteran su comportamiento (Schneider *et al.* 2012, Herbert *et al.* 2014), por lo que la entrada del recurso contaminado persistiría. Allí, las abejas que permanecen dentro de la colmena podrían captar moléculas de estos compuestos presentes en recursos recientemente recolectados y sobre abejas entrantes, pero también néctar y polen almacenados en celdas. Esto supone exposición del tipo oral y por contacto, aguda y crónica. El IMI y el GLI pueden ser tóxicos para las abejas pre-recolectoras sin afectar su mortalidad por tener efectos subletales. Las abejas jóvenes son individuos de la colonia que muestran una alta plasticidad, de índole comportamental y fisiológica (Arenas *et al.* 2013), y realizan tareas relevantes dentro de la colmena que garantizan el mantenimiento y el cuidado de la colonia (Lindauer 1952, Seeley 1982). Para ello, la percepción y las habilidades cognitivas son indispensables en la ejecución de las tareas ya que requieren de la integración de estos procesos. Además, las experiencias vividas pueden afectar las tareas que realicen a futuro dentro y fuera del nido. Por eso, el objetivo general de esta Tesis fue evaluar el

efecto de la exposición a agroquímicos de uso masivo como el IMI y el GLI sobre el comportamiento de abejas jóvenes.

En primer lugar, se estudió el efecto de la exposición aguda al IMI sobre el comportamiento apetitivo – percepción gustativa y aprendizaje olfativo – en abejas jóvenes de diferente edad. Se encontró que las abejas topicadas o alimentadas con IMI presentaron un empobrecimiento en el aprendizaje asociativo, específicamente en la etapa de adquisición. Además, la exposición oral generó una disminución en la sensibilidad a la sacarosa al evaluar la REP. Por lo tanto, se puede concluir que la exposición aguda al IMI afecta negativamente el comportamiento apetitivo de abejas pre-recolectoras. Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos por otros grupos de investigación, donde se utilizaron abejas de edad recolectora (Lambin *et al.* 2001, Decourtye *et al.* 2003, Decourtye *et al.* 2004, Eiri y Nieh 2012, Williamson *et al.* 2013, Williamson y Wright 2013). Además, se esperaba que estos efectos variaran según la edad de exposición dado que el sistema nervioso, y particularmente sus vías olfativas, se sigue desarrollando durante la vida adulta de una abeja y el IMI actúa como un neurotóxico. Esto ocurrió en el caso del aprendizaje asociativo, donde el grado de deterioro durante la adquisición dependió de la edad de las abejas: las de 5/6 días de edad resultaron menos sensibles al IMI que las de 2/3 y 9/10 días (Figura 41). Se ha visto este efecto edad dependiente al estudiar la habituación, un tipo de aprendizaje no asociativo (Guez *et al.* 2001).

En segundo lugar, se estudió el efecto de la exposición oral aguda sobre la detección olfativa en abejas jóvenes de diferente edad. Este objetivo se planteó sobre la base de los resultados obtenidos sobre el comportamiento apetitivo con el fin de dilucidar si el déficit observado en la capacidad de aprendizaje se debió a una falla en la contingencia de las vías gustativa y olfativa y/o a la percepción quimiosensorial de una u otra modalidad. El IMI no afectó la respuesta electroantenográfica de abejas de ninguna edad. Por lo tanto, el efecto observado sobre el aprendizaje asociativo no puede explicarse por una falla en la detección olfativa. Más aún, según los resultados obtenidos en un estudio sobre la detección gustativa (Kessler *et al.* 2015), se puede decir que el IMI administrado de manera aguda no parecería afectar la periferia quimiosensorial.

Como no se estudió en esta Tesis, no se descarta que se haya afectado la percepción olfativa, que involucra los LAs.

La señalización de ACh juega un rol importante en los LAs, el primer centro de procesamiento de información olfativa, y en los MBs, donde las vías olfativa y gustativa se encuentran, la información se integra y ocurren los procesos de aprendizaje y memoria (Gauthier 2010). Entonces es esperable que el IMI, que actúa sobre receptores colinérgicos nicotínicos, tenga efectos sobre fenómenos que involucren estas estructuras cerebrales. En concordancia con esta hipótesis, se ha encontrado que el IMI afecta la representación de olores en los LAs (Andrione *et al.* 2016), afecta la densidad de microglomérulos de los MBs (Peng y Yang 2016) e inactiva a las neuronas intrínsecas de los MBs (Palmer *et al.* 2013). Por lo tanto, además de operar sobre la asociación olor-recompensa y la percepción gustativa, el IMI administrado de manera oral y aguda podría estar actuando sobre la percepción olfativa.

En tercer lugar, se evaluó el efecto de la exposición aguda oral al IMI sobre el comportamiento de abejas pre-recolectoras en un contexto natural de colmena. Dado el bajo tamaño muestral, no se pudieron realizar inferencias con sustento estadístico. No obstante, se observó que el IMI influyó sobre la distribución de abejas nodrizas en las diferentes áreas de la colmena. A pesar de que no se encontró efecto del IMI sobre el desplazamiento ni se observó algún efecto comportamental conspicuo, no se descarta alguna falla en la locomoción producto de este pesticida. El hecho de que existan diferentes subtipos de nAChRs en el sistema nervioso puede explicar que los efectos de dosis tan bajas de IMI sobre la función motora sean sutiles (Williamson *et al.* 2014) en comparación con los observados sobre las habilidades cognitivas. Esta hipótesis también es válida al observar efectos sobre la probabilidad de REP ante soluciones de sacarosa de concentración creciente, pero no sobre solución de sacarosa 50 % m/m. En cuanto a la metodología implementada, se encontró que considerar variables de ubicación fue suficiente para verificar que las franjas etarias con las que se trabajó pertenecían a las castas temporales de interés. Esto provee una herramienta útil y eficiente ya que significa que no es necesario realizar observaciones fatigosas de los comportamientos que realizan las abejas (Johnson 2008b).

Finalmente, se evaluó el efecto de la exposición crónica combinada al IMI y al GLI sobre el comportamiento apetitivo de abejas pre-recolectoras. Ambos agroquímicos redujeron la sensibilidad gustativa. El IMI afectó negativamente ambos tipos de aprendizaje, dependiendo de la edad de exposición. El GLI no interfirió sobre el aprendizaje simple, pero redujo la discriminación olfativa en abejas de edad intermedia.

Los efectos de la exposición crónica al IMI fueron consistentes con los efectos agudos. En ambos casos, la reducción de sensibilidad a la sacarosa fue independiente de la edad y el déficit del aprendizaje varió con la edad. Las edades que pueden compararse son las de 5 y 9 días de edad ya que abejas de esta edad fueron utilizadas en ambos experimentos. En el caso de las más jóvenes, el efecto del IMI crónico fue mayor que el del IMI agudo a pesar de que la dosis total fue menor (0,057 ng vs. 0,25 ng). En el caso de las de 9 días, se observó lo opuesto ya que la exposición aguda generó un déficit en el aprendizaje simple mientras que el IMI crónico no tuvo efecto sobre éste. Por un lado, estas discrepancias pueden deberse a diferencias en la fisiología de abejas de 5 y 9 días. Esto se discutirá más adelante. Por el otro, la toxicidad diferencial puede deberse a los niveles de metabolitos luego de periodos de exposición distintos (Suchail *et al.* 2001, Suchail *et al.* 2004). Vale aclarar que estas explicaciones no son excluyentes.

Las abejas a las que se le añadió GLI en la solución de sacarosa consumieron menos alimento durante su crianza. Esto podría deberse a que el GLI genera un malestar que se evidencia por una ingesta reducida o a que el GLI, al ser detectado, genera rechazo. Teniendo en cuenta los efectos observados sobre la ingesta de solución de sacarosa y sobre la sensibilidad a la sacarosa, podría suponerse que ambos son resultado del mismo mecanismo de acción sobre la percepción gustativa.

Un resultado interesante es que el estudio del aprendizaje asociativo diferencial arrojó efectos de los agroquímicos que no fueron observados al evaluar el aprendizaje simple. Dado que este protocolo no sólo pone a prueba la capacidad de asociar un olor con una recompensa sino que, además, fuerza a diferenciarlo de otro que no está asociado con ella. Así, permite detectar

sutilezas que un condicionamiento absoluta ignora. Por lo tanto, se recomienda utilizar este paradigma al momento de estudiar el aprendizaje olfativo.

Dado que ambos agroquímicos tendrían diferentes sitios de acción, se postuló que podría existir una interacción entre ambos. Esta propiedad se evidencia cuando el efecto de la exposición dual es diferente de la adición de los efectos de las exposiciones simples. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se obtuvieron evidencias de esto. Sólo en el caso del aprendizaje asociativo simple en abejas de 5 días se observó un efecto de la exposición combinada al IMI y GLI diferente de la suma de los efectos de los agroquímicos por separado. Sin embargo, no se puede descartar que esto se deba a una diferencia en la cantidad de IMI incorporado durante la crianza.

El efecto del IMI, tanto agudo como crónico, sobre el aprendizaje asociativo dependió de la edad. Un efecto edad dependiente se ha observado sobre la habituación, un tipo de aprendizaje no asociativo (Guez *et al.* 2001). Las abejas de 5 días parecen ser menos sensibles al IMI cuando éste es administrado de manera aguda mientras que las abejas de 14 días parecerían serlo cuando se incorpora de manera crónica. Cuando una abeja ingiere IMI, éste es metabolizado. Los niveles de los metabolitos y su distribución en diferentes partes del cuerpo dependen del tiempo (Suchail *et al.* 2004). Por lo tanto, es sensato concluir que el efecto observado luego de la exposición crónica es debido a la toxicidad del IMI y de sus metabolitos. Se ha hipotetizado que el IMI y sus metabolitos tienen una afinidad diferencial por diferentes subtipos de receptores (Guez *et al.* 2003). Esto, sumado a la plasticidad cognitiva encontrada en abejas pre-recolectoras (Masson y Arnold 1984, Fahrbach y Robinson 1995, Arenas *et al.* 2013), sugiere que la expresión de subtipos de nAChRs varía con la edad de la abeja obrera.

En conclusión, ambos agroquímicos tuvieron efectos adversos sobre el comportamiento de las abejas pre-recolectoras. Un déficit en el aprendizaje tendría un efecto en la propagación de información olfativa y en la distribución de néctar dentro de la colmena. Umbrales de respuesta al azúcar elevados sugieren que puede haber una escasa distribución de néctar dentro de la colonia (Pankiw *et al.* 2004). Asimismo, aún luego de concluida esta operación, podría haber dificultad en establecerse asociaciones olor-recompensa, lo cual da lugar a

una propagación de información de alimento insuficiente (Ramírez *et al.* 2010). Esto afectaría no sólo la distribución de néctar contaminado en sí, sino también la de aquellos néctares recolectados en simultáneo. Dado que la sensibilidad gustativa de abejas pre-recolectoras está asociada al comportamiento de recolección (Pankiw *et al.* 2004), las recolectoras en general estarían motivadas a salir de la colmena dada la necesidad de explotar nuevas fuentes de alimento (von Frisch 1967, Seeley 1995). Esto implica que la colmena podría enfrentar el final de la temporada con reservas de alimento limitadas y potencialmente contaminadas.

6

Anexo estadístico

Tabla 5. Conjunto de GLMM que explican la respuesta condicionada en la fase de entrenamiento de un condicionamiento absoluto luego de la exposición aguda por contacto al IMI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad*Ensayo + Abeja	36	1780,06	43,56	$2,40\ 10^{-10}$
2. IMI*Edad + Ensayo + Abeja	12	1744,55	8,04	$1,24\ 10^{-2}$
3. IMI + Edad + Ensayo + Abeja	8	1738,49	1,98	0,26
4. IMI + Ensayo + Abeja	6	1736,51	0	0,70
5. Ensayo + Abeja	4	1742,18	5,68	$4,04\ 10^{-2}$
6. IMI + Abeja	3	1786,15	49,64	$1,15\ 10^{-11}$
7. Abeja	1	1791,80	55,29	$6,81\ 10^{-13}$

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 6. Conjunto de GLM que explican la respuesta condicionada en la fase de evaluación de un condicionamiento clásico absoluto luego de la exposición aguda por contacto al IMI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad	9	473,71	2,65	0,09
2. IMI + Edad	5	471,33	0,27	0,30
3. IMI	3	473,17	2,11	0,12
4. Edad	3	471,06	0	0,34
5. Nulo	1	472,59	1,54	0,16

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 7. Conjunto de GLMM que explican la respuesta condicionada en la fase de entrenamiento de un condicionamiento absoluto luego de la exposición aguda oral al IMI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad*Ensayo + Abeja	48	3370,52	26,60	$8,71\ 10^{-7}$
2. IMI*Edad + Ensayo + Abeja	15	3343,91	0	0,52
3. IMI*Ensayo + Edad + Abeja	18	3359,95	16,045	$1,72\ 10^{-4}$
4. IMI + Edad + Ensayo + Abeja	9	3346,49	2,58	0,14
5. IMI + Ensayo + Abeja	7	3344,79	0,88	0,34
6. Ensayo	4	3489,92	146,00	$1,03\ 10^{-32}$

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 8. Conjunto de GLM que explican la respuesta condicionada en la fase de evaluación de un condicionamiento absoluto luego de la exposición aguda oral al IMI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad	12	527,97	6,55	0,04
2. IMI + Edad	6	521,42	0	0,96
3. IMI	4	531,31	9,89	$6,82\ 10^{-3}$
4. Edad	3	551,29	29,87	$3,13\ 10^{-7}$
5. Nulo	1	560,06	38,64	$3,89\ 10^{-9}$

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 9. Conjunto de GLM que explican el puntaje de las abejas en un protocolo de umbral de respuesta al azúcar luego de la exposición aguda oral al IMI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad	12	1415,41	8,72	0,01
2. IMI + Edad	6	1406,68	0	0,97
3. IMI	4	1414,88	8,20	0,02
4. Edad	3	1469,08	62,40	$2,74\ 10^{-14}$
5. Nulo	1	1476,15	69,47	$7,99\ 10^{-16}$

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 10. Conjunto de GLMM que explican el número de abejas vivas luego de la exposición aguda por contacto al IMI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad*Tiempo + Abeja	27	614,34	306,30	$2,38\ 10^{-67}$
2. IMI*Edad + Tiempo + Abeja	11	507,55	199,51	$3,67\ 10^{-44}$
3. IMI + Edad + Tiempo + Abeja	7	316,00	7,96	0,02
4. IMI + Tiempo + Abeja	5	312,04	3,99	0,11
5. Edad + Tiempo + Abeja	5	312,00	3,96	0,11
6. Tiempo + Abeja	3	308,04	0	0,77
7. Abeja	1	774,08	466,03	$4,90\ 10^{-102}$

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 11. Conjunto de GLMM que explican el número de abejas vivas luego de la exposición aguda oral al IMI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad*Tiempo + Abeja	48	911,78	332,30	$6,61\ 10^{-73}$
2. IMI*Edad + Tiempo + Abeja	15	792,15	212,67	$6,28\ 10^{-47}$
3. IMI + Edad + Tiempo + Abeja	9	612,70	33,22	$5,82\ 10^{-8}$
4. IMI + Tiempo + Abeja	7	585,47	5,99	0,05
5. Edad + Tiempo + Abeja	6	680,26	100,78	$1,24\ 10^{-22}$
6. Tiempo + Abeja	4	579,48	0	0,95
7. Abeja	1	1573,73	994,25	$1,21\ 10^{-216}$

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 12. Conjunto de GLM que explican la respuesta incondicionada de las abejas luego de la exposición aguda por contacto al IMI, al final del condicionamiento olfativo. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad	9	96,29	4,15	0,07
2. IMI + Edad	5	95,97	3,83	0,08
3. IMI	3	97,44	5,30	0,04
4. Edad	3	92,14	0	0,56
5. Nulo	1	93,67	1,53	0,26

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 13. Conjunto de GLM que explican la respuesta incondicionada de las abejas una hora luego de la exposición aguda oral al IMI, antes del condicionamiento olfativo. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad	12	350,73	12,24	0
2. IMI + Edad	6	344,75	6,25	0,03
3. IMI	4	343,13	4,63	0,06
4. Edad	3	340,11	1,61	0,28
5. Nulo	1	338,50	0	0,63

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 14. Conjunto de GLM que explican la respuesta incondicionada de las abejas luego de la exposición aguda oral al IMI, al final del condicionamiento olfativo. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad	12	105,88	10,62	0
2. IMI + Edad	6	98,768	3,50	0,09
3. IMI	4	95,27	0	0,53
4. Edad	3	99,81	4,53	0,06
5. Nulo	1	96,32	1,05	0,32
Comparaciones *a posteriori* modelo 3: n.s.				

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i. "n.s." significa que los niveles del factor IMI no difirieron significativamente entre sí.

Tabla 15. Conjunto de GLM que explican la respuesta incondicionada de las abejas luego de la exposición aguda oral al IMI, al final del protocolo de umbral de respuesta a la sacarosa. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*Edad	12	122,12	7,56	0,02
2. IMI + Edad	6	114,56	0	0,67
3. IMI	4	120,29	5,73	0,04
4. Edad	3	116,48	1,92	0,26
5. Nulo	1	122,07	7,50	0,02
Comparaciones *a posteriori* modelo 2: n.s.				

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i. "n.s." significa que los niveles del factor IMI no difirieron significativamente entre sí.

Tabla 16. Conjunto de GLMM que explican la respuesta eléctrica antenal de abejas pre-recolectoras de diferente edad. Estructura de error Gamma.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. Edad*Concentración + Abeja	18	3502,87	4,73	0,08
2. Edad + Concentración + Abeja	8	3498,14	0	0,89
3. Edad + Abeja	6	3863,87	365,72	$3,41\ 10^{-80}$
4. Concentración + Abeja	3	3505,08	6,94	0,03
5. Abeja	1	3873,15	375,00	$3,29\ 10^{-82}$

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 17. Conjunto de GLMM que explican la respuesta eléctrica antenal de abejas luego de una exposición aguda oral al IMI. Estructura de error Gamma.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. Edad*Tratamiento*Tiempo*Concentración + Abeja	54	19487,81	9049,71	0
2. Edad* Tratamiento *Tiempo + Concentración + Abeja	20	10471,10	33,00	$6,43\ 10^{-8}$
3. Edad* Tratamiento +Tiempo + Concentración + Abeja	12	10457,10	19,00	$7,06\ 10^{-5}$
4. Edad + Tratamiento + Tiempo + Concentración + Abeja	8	10449,20	11,10	$3,66\ 10^{-3}$
5. Edad + Tratamiento + Concentración + Abeja	7	10448,70	10,60	$4,70\ 10^{-3}$
6. Edad + Tiempo + Concentración + Abeja	6	10445,90	7,80	0,02
7. Edad + Concentración + Abeja	5	10445,00	6,90	0,03
8. Edad*Concentración + Abeja	9	10438,10	0	0,94

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 18. Conjunto de GLM que explican el número de abejas ubicadas en diferentes áreas de la colmena luego de la exposición aguda oral al IMI. Estructura de error multinomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. Tratamiento*Tarea	4	49,76	4,00	0,09
2. Tratamiento + Tarea	3	45,76	0	0,64
3. Tratamiento	3	76,45	1,73	0,27
4. Tarea	2	47,49	30,69	$1,39\ 10^{-7}$
5. Nulo	1	75,79	30,02	$1,94\ 10^{-7}$

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 19. Regresión multinomial logística (Área ~ Tratamiento + Tarea) que explica el número de abejas ubicadas en diferentes áreas de la colmena luego de la exposición aguda oral al IMI.

X_i	Reserva			Transferencia		
	β_i	e^{β_i}	p	β_i	e^{β_i}	p
(Control, Nodriza)	-1,39	0,25	0,2149	-0,69	0,50	0,4238
IMI	-7,94	$3{,}57\ 10^{-4}$	0,8194	-9,24	$9{,}75\ 10^{-5}$	0,7905
Procesadora	18,70	$1{,}32\ 10^{8}$	0,6955	16,91	$1{,}21\ 10^{7}$	0,7235

X es la variable explicatoria incluida en el modelo de regresión. X_0 es el intercepto de la regresión, el cual incluye los niveles "Control" y "Nodriza". El análisis arroja dos regresiones, una para cada estado de la variable respuesta (reserva y transferencia), relativazadas a una línea de base (cría). β es el parámetro estimado que acompaña cada X. e es el operador matemático exponencial. p es el p-valor del parámetro estimado.

Tabla 20. Cargas o *loadings* de los tiempos de permanencia en cada área. Los valores indican la correlación de las variables originales con cada CP extraído.

Variable original	Componente principal (proporción de varianza explicada)		
	CP1 (58,92 %)	CP2 (41,08 %)	CP3 (0 %)
TC	-0,66	-0,43	0,62
TR	0,73	-0,20	0,65
TT	-0,16	0,88	0,45

TC, TR y TT son los tiempos de permanencia en las áreas de cría, reserva de alimento y transferencia de alimento, respectivamente.

Tabla 21. Conjunto de GLM que explican el CP1 extraído de un análisis de componentes principales sobre los tiempos de permanencia de las abejas en las diferentes áreas de una colmena de observación luego de la exposición aguda oral al IMI. Estructura de error normal.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. Tarea*Tratamiento	4	78,76	0,42	0,36
2. Tarea + Tratamiento	3	79,98	1,65	0,20
3. Tarea	2	78,34	0	0,45
4. Tratamiento	2	131,05	52,73	$1{,}59\ 10^{-12}$
5. Nulo	1	129,06	50,73	$4{,}30\ 10^{-12}$

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 22. Conjunto de GLM que explican el CP2 extraído de un análisis de componentes principales sobre los tiempos de permanencia de las abejas en las diferentes áreas de una colmena de observación luego de la exposición aguda oral al IMI. Estructura de error normal.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. Tarea*Tratamiento	4	116,31	1,19	0,16
2. Tarea + Tratamiento	3	116,36	1,24	0,16
3. Tarea	2	117,10	1,98	0,11
4. Tratamiento	2	115,13	0,01	0,29
5. Nulo	1	115,12	0	0,29

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 23. Conjunto de GLM que explican la cantidad de zonas recorridas por abejas nodrizas y procesadoras de alimento luego de la exposición aguda oral al IMI. Estructura de error Poisson.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. Tarea*Tratamiento	4	115,94	5,34	0,03
2. Tarea + Tratamiento	3	114,23	3,63	0,08
3. Tarea	2	112,28	1,68	0,21
4. Tratamiento	2	112,56	1,96	0,18
5. Nulo	1	110,60	0	0,49

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 24. Cargas o *loadings* de las duraciones y frecuencias de actividades. Los valores indican la correlación de las variables originales con cada CP extraído.

Variable original	Componente principal (proporción de varianza explicada)			
	CP1 (33,58 %)	CP2 (19,45 %)	CP3 (15,63 %)	CP4 (12,79 %)
Descanso[D]	0,28	0,20	0,44	0,03
Locomoción[D]	-0,20	-0,16	-0,40	0,06
Acicalamiento[D]	-0,20	-0,21	-0,37	-0,18
Vibración[D]	-0,21	-0,32	0,40	-0,30
Ventilación[D]	-0,19	-0,32	0,12	-0,43
Inspección de celda[D]	-0,35	0,15	-0,15	-0,04
Antenación[D]	-0,30	0,02	0,26	0,41
Trofalaxia[D]	-0,31	0,07	0,01	0,30
Seguimiento de danza[D]	-0,13	0,48	0,07	-0,33
Vibración[N]	-0,25	-0,29	0,39	-0,18
Inspección de celda[N]	-0,34	0,34	-0,04	-0,10
Antenación[N]	-0,31	0,03	0,27	0,41
Trofalaxia[N]	-0,38	0,01	-0,11	0,04
Seguimiento de danza[N]	-0,13	0,48	0,07	-0,33

[D] corresponde a la duración de la actividad, [N] corresponde a la frecuencia.

Tabla 25. Conjunto de GLMM que explican el número de abejas vivas luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI durante 5 días. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*GLI*Temporada + Jaula	12	428,56	15,50	$1,46\ 10^{-4}$
2. IMI*GLI + Temporada + Jaula	6	419,35	6,30	0,02
3. IMI + GLI*Temporada + Jaula	7	421,28	8,20	$5,61\ 10^{-3}$
4. GLI + IMI*Temporada + Jaula	7	421,30	8,20	$5,61\ 10^{-3}$
5. IMI + GLI + Temporada + Jaula	5	417,49	4,40	0,04
6. IMI + GLI + Jaula	3	416,40	3,30	0,07
7. IMI + Temporada + Jaula	4	416,26	3,20	0,07
8. GLI + Temporada + Jaula	4	415,49	2,40	0,10
9. GLI + Jaula	2	414,40	1,30	0,18
10. Temporada + Jaula	3	414,27	1,20	0,19
11. Jaula	1	413,15	0	0,34

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 26. Conjunto de GLMM que explican el número de abejas vivas luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI durante 9 días. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*GLI*Temporada + Jaula	12	371,00	16,90	$8,91\ 10^{-5}$
2. IMI*GLI + Temporada + Jaula	6	362,50	8,40	$6,25\ 10^{-3}$
3. IMI + GLI*Temporada + Jaula	7	362,60	8,50	$5,94\ 10^{-3}$
4. GLI + IMI*Temporada + Jaula	7	363,50	9,40	$3,79\ 10^{-3}$
5. IMI + GLI + Temporada + Jaula	5	360,60	6,50	0,02
6. IMI + GLI + Jaula	3	357,20	3,10	0,09
7. IMI + Temporada + Jaula	4	359,30	5,20	0,03
8. GLI + Temporada + Jaula	4	358,70	4,60	0,04
9. GLI + Jaula	2	356,00	1,90	0,16
10. Temporada + Jaula	3	355,30	1,20	0,23
11. Jaula	1	354,10	0	0,42

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 27. Conjunto de GLMM que explican el número de abejas vivas luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI durante 14 días. Estructura de error binomial.

Modelo	K	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*GLI*Temporada + Jaula	12	304,50	16,70	$1,13\ 10^{-4}$
2. IMI*GLI + Temporada + Jaula	6	296,70	8,90	$5,58\ 10^{-3}$
3. IMI + GLI*Temporada + Jaula	7	298,00	10,20	$2,91\ 10^{-3}$
4. GLI + IMI*Temporada + Jaula	7	297,40	9,60	$3,93\ 10^{-3}$
5. IMI + GLI + Temporada + Jaula	5	294,70	6,90	0,02
6. IMI + GLI + Jaula	3	291,80	4,00	0,06
7. IMI + Temporada + Jaula	4	292,80	5,00	0,04
8. GLI + Temporada + Jaula	4	292,80	5,00	0,04
9. GLI + Jaula	2	289,80	2	0,18
10. Temporada + Jaula	3	289,80	2	0,18
11. Jaula	1	287,80	0	0,48

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 28. Conjunto de GLM que explican la ingesta individual total luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI durante 5 días. Estructura de error Gamma.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*GLI*Temporada	12	1028,30	9,50	0,01
2. IMI*GLI + Temporada	6	1026,70	7,90	0,01
3. IMI + GLI*Temporada	7	1020,40	1,60	0,27
4. GLI + IMI*Temporada	7	1028,50	9,70	0,01
5. IMI + GLI + Temporada	5	1024,80	6,00	0,03
6. GLI*Temporada	6	1018,80	0	0,61
7. GLI + Temporada	4	1023,20	4,40	0,07

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 29. Conjunto de GLM que explican la ingesta individual total luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI durante 9 días. Estructura de error Gamma.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*GLI*Temporada	12	873,00	4,15	0,05
2. IMI*GLI + Temporada	6	872,34	3,49	0,07
3. IMI + GLI*Temporada	7	869,34	0,49	0,30
4. GLI + IMI*Temporada	7	874,97	6,12	0,02
5. IMI + GLI + Temporada	5	871,80	2,95	0,09
6. GLI*Temporada	6	868,85	0	0,389
7. GLI + Temporada	4	871,63	2,78	0,10

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 30. Conjunto de GLM que explican la ingesta individual total luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI durante 14 días. Estructura de error Gamma.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*GLI*Temporada	12	646,35	9,78	0
2. IMI*GLI + Temporada	6	643,04	6,47	0,02
3. IMI + GLI*Temporada	7	637,71	1,14	0,31
4. GLI + IMI*Temporada	7	645,31	8,74	0,01
5. IMI + GLI + Temporada	5	641,91	5,34	0,04
6. GLI*Temporada	6	636,57	0	0,56
7. GLI + Temporada	4	641,05	4,48	0,06

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 31. Conjunto de GLMM que explican el puntaje de las abejas en un protocolo de umbral de respuesta al azúcar luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IIT*IMI*GLI*Edad + Jaula	24	2902,5	12,69	0
2. IIT + IMI*GLI*Edad + Jaula	13	2896,9	7,09	0,01
3. IMI*GLI*Edad + Jaula	12	2894,97	5,16	0,04
4. IMI*GLI + Edad + Jaula	6	2889,81	0	0,50
5. IMI + GLI*Edad + Jaula	7	2893,89	4,08	0,07
6. GLI + IMI*Edad + Jaula	7	2896,15	6,34	0,02
7. IMI + GLI + Edad + Jaula	5	2892,54	2,73	0,13
8. IMI*GLI + Jaula	4	2891,34	1,53	0,23

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 32. Conjunto de GLMM que explican la respuesta condicionada durante la fase de entrenamiento de un condicionamiento absoluto luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*GLI*Edad*Ensayo + Jaula + Abeja	48	2874,5	23,6	$3{,}02\ 10^{-6}$
2. IMI*GLI*Edad + Ensayo + Jaula + Abeja	15	2850,9	0	0,40
3. IMI*GLI + Edad + Ensayo + Jaula + Abeja	9	2851,5	0,6	0,30
4. IIT*IMI*GLI*Edad + Ensayo + Jaula + Abeja	27	2867,5	16,6	10^{-4}
5. IIT + IMI*GLI*Edad + Ensayo + Jaula + Abeja	16	2851,5	0,6	0,30

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 33. Conjunto de GLMM que explican la respuesta condicionada durante la fase de evaluación de un condicionamiento absoluto luego de la exposición oral crónica al IMI y al GLI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IIT*IMI*GLI*Edad + Jaula	24	604,35	12,72	$6,93\ 10^{-4}$
2. IIT + IMI*GLI*Edad + Jaula	13	599,66	8,03	$7,23\ 10^{-3}$
3. IMI*GLI*Edad + Jaula	12	606,08	14,45	$2,92\ 10^{-4}$
4. IIT + IMI*GLI + Edad + Jaula	7	599,63	8,00	$7,34\ 10^{-3}$
5. IIT + IMI + GLI + Edad + Jaula	6	597,67	6,04	0,02
6. IIT + IMI + GLI + Jaula	4	594,69	3,06	0,09
7. IIT + IMI + Jaula	3	593,17	1,54	0,19
8. IIT + GLI + Jaula	3	593,04	1,41	0,12
9. IIT + Jaula	2	591,63	0	0,40
10. Jaula	1	594,54	2,91	0,09

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 34. Conjunto de GLM que explican el ID durante la fase de entrenamiento de un condicionamiento diferencial luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IMI*GLI*Edad*Ensayo + Jaula + Abeja	48	2489,58	4,76	0,06
2. IMI*GLI*Edad + Ensayo + Jaula + Abeja	15	2484,82	0	0,62
3. IMI*GLI + Edad + Ensayo + Jaula + Abeja	9	2496,67	11,85	$1,66\ 10^{-3}$
4. IMI + GLI*Edad + Ensayo + Jaula + Abeja	10	2497,93	13,11	$8,86\ 10^{-4}$
5. GLI + IMI*Edad + Ensayo + Jaula + Abeja	10	2491,30	6,48	0,02
6. IIT + IMI*GLI*Edad + Ensayo + Jaula + Abeja	16	2486,33	1,51	0,29

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 35. Conjunto de GLM que explican el ID global en la fase de entrenamiento de un condicionamiento diferencial luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IIT*IMI*GLI*Edad + Jaula	24	1923,51	6,54	0,02
2. IIT + IMI*GLI*Edad + Jaula	13	1917,93	0,96	0,34
3. IMI*GLI*Edad + Jaula	12	1916,97	0	0,55
4. IMI*GLI + Edad + Jaula	6	1926,22	9,25	$5,42\ 10^{-3}$
5. IMI + GLI*Edad + Jaula	7	1927,23	10,26	$3,27\ 10^{-3}$
6. GLI + IMI*Edad + Jaula	7	1921,10	4,13	0,07
7. IMI + GLI + Edad + Jaula	5	1926,52	9,55	$4,67\ 10^{-3}$

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

Tabla 36. Conjunto de GLM que explican el ID en la fase de evaluación de un condicionamiento diferencial luego de la exposición crónica oral al IMI y al GLI. Estructura de error binomial.

Modelo	*K*	AIC	Δ_i	w_i
1. IIT*IMI*GLI*Edad + Jaula	24	717,21	12,40	$5,07\ 10^{-4}$
2. IIT + IMI*GLI*Edad + Jaula	13	716,83	12,02	$6,13\ 10^{-4}$
3. IMI*GLI*Edad + Jaula	12	716,85	12,04	$6,07\ 10^{-4}$
4. IMI*GLI + Edad + Jaula	6	708,72	3,91	0,04
5. IMI + GLI + Edad + Jaula	5	707,75	2,94	0,06
6. IMI + GLI + Jaula	3	706,08	1,27	0,13
7. IMI + Edad + Jaula	4	705,80	0,99	0,15
8. GLI + Edad + Jaula	4	708,64	3,83	0,04
9. IMI + Jaula	2	704,92	0,11	0,24
10. Edad + Jaula	3	706,69	1,88	0,10
11. Jaula	1	704,81	0	0,25

K es el número de parámetros del modelo. Δi es la diferencia de AIC entre el modelo i y el modelo con mejor ajuste (AIC menor). wi es el peso Akaike del modelo i.

7

Referencias bibliográficas

Aizen MA, Garibaldi LA, Cunningham SA y Klein AM (2008). Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Current Biology*, 18(20):1572-1575.

Alaux C, Brunet J-L, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Baldy A, Belzunces LP y Le Conte Y (2010). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 12(3):774-782.

Aliouane Y, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M y Gauthier M (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(1):113-122.

Alkassab AT y Kirchner WH (2016). Sublethal exposure to neonicotinoids and related side effects on insect pollinators: honeybees, bumblebees, and solitary bees. *Journal of Plant Diseases and Protection*:1-30.

Amrhein N, Deus B, Gehrke P y Steinrücken HC (1980). The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. *Plant physiology*, 66(5):830-834.

Andrione M, Vallortigara G, Antolini R y Haase A (2016). Neonicotinoid-induced impairment of odour coding in the honeybee. *Scientific Reports*, 6:38110.

Arenas A y Farina WM (2008). Age and rearing environment interact in the retention of early olfactory memories in honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, 194:629-640.

Arenas A, Fernández VM y Farina WM (2007). Floral odor learning within the hive affects honeybees' foraging decisions. *Naturwissenschaften*, 94:218-222.

Arenas A, Fernández VM y Farina WM (2009). Associative learning during early adultoohd enhances later memory retention in honeybees. *PLoS ONE*, 4(12):e8046.

Arenas A, Giurfa M, Sandoz JC, Hourcade B, Devaud JM y Farina WM (2012). Early olfactory experience induces structural changes in the primary olfactory center of an insect brain. *European Journal of Neuroscience*, 35:682-690.

Arenas A, Ramírez GP, Balbuena MS y Farina WM (2013). Behavioral and neural plasticity caused by early social experiences: the case of the honeybee. *Frontiers in Physiology*, 4:1-14.

Arregui MC, Lenardón A, Sanchez D, Maitre MI, Scotta R y Enrique S (2003). Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. *Pest Management Science*, 60:163-166.

Ayestaran A, Giurfa M y de Brito Sanchez MG (2010). Toxic but drank: gustatory aversive compounds induce post-ingestional malaise in harnessed honeybees. *PloS ONE*, 5(10):e15000.

Baker HG y Baker I (1975). Studies of nectar-constitution and pollinator-plant coevolution. *Coevolution of Animals and Plants*, 100(140):591-600.

Balbuena MS, Arenas A y Farina WM (2012). Floral scents learned inside the honeybee hive have a long-lasting effect on recruitment. *Animal Behaviour*, 84(1):77-83.

Baracchi D y Cini A (2014). A Socio-spatial combined approach confirms a highly compartmentalised structure in honeybees. *Ethology*, 120(12):1167-1176.

Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S, Christensen RHB, Singmann H, Dai B, Grothendieck G, Eigen C y Rcpp L (2015). Package 'lme4'. *convergence*, 12:1.

Baur P, Marzouk H, Schönherr J y Grayson BT (1997). Partition coefficients of active ingredients between plant cuticle and adjuvants as related to rates of foliar uptake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9):3659-3665.

Behrends A y Scheiner R (2009). Evidence for associative learning in newly emerged honey bees (*Apis mellifera*). *Animal Cognition*, 12(2):249-255.

Bitterman M, Menzel R, Fietz A y Schäfer S (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(2):107.

Blacquière T, Smagghe G, van Gestel CA y Mommaerts V (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4):973-992.

Bonmatin J-M, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser D, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M y Mitchell E (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1):35-67.

Bonmatin J, Marchand P, Charvet R, Moineau I, Bengsch E y Colin M (2005). Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13):5336-5341.

Bonmatin J, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin M y Bengsch E (2003). A LC/APCI-MS/MS method for analysis ofimidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Analytical Chemistry*, 75(9):2027-2033.

Bortolotti L, Montanari R, Marcelino J, Medrzycki P, Maini S y Porrini C (2003). Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*, 56(1):63-68.

Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, Deshpande SV, McCubbin PE, Seccomb RA y Welch PM (2010). Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PloS ONE*, 5(10):e13181.

Calderone NW (1998). Proximate mechanisms of age polyethism in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 29:127-158.

Camazine S (2003) *Self-organization in biological systems*, Princeton University Press.

Carew T (2000) *Behavioral Neurobiology: The cellular organization of natural behavior*, Sinauer Associates Publishers.

Chakrabarti P, Rana S, Bandopadhyay S, Naik DG, Sarkar S y Basu P (2015). Field populations of native Indian honey bees from pesticide intensive agricultural landscape show signs of impaired olfaction. *Scientific reports*, 5.

Chapman RF (1998) *The insects: structure and function*, Cambridge University Press.

Charreton M, Decourtye A, Henry M, Rodet G, Sandoz J-C, Charnet P y Collet C (2015). A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. *PloS one*, 10(12):e0144879.

Charvet R, Katouzian-Safadi M, Colin M, Marchand P y Bonmatin J (2004) Systemic insecticides: new risk for pollinator insects, *Annales pharmaceutiques francaises*.

Chauzat M-P, Faucon J-P, Martel A-C, Lachaize J, Cougoule N y Aubert M (2006). A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology*, 99(2):253-262.

Chauzat M-P, Martel A-C, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Zeggane S, Aubert M, Carpentier P y Faucon J-P (2011). An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(1):103-111.

Claudinei SP, Carraschi i, Shiogiri N, Sayuri a, da Silva AF, Pitelli RA y Machado MRF (2016). Sensitivity, ecotoxicity and histopathological effects on neotropical fish exposed to glyphosate alone and associated to surfactant. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 8(3):25-33.

Colin M, Bonmatin J, Moineau I, Gaimon C, Brun S y Vermandere J (2004). A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(3):387-395.

CONICET (2009) *Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente*, CA de Buenos Aires.

Correia F y Moreira J (2010). Effects of glyphosate and 2, 4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 85(3):264-268.

Coullery RP, Ferrari ME y Rosso SB (2016). Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway. *NeuroToxicology*, 52:150-161.

Crailsheim K (1998). Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 29:97-112.

Crane E (1992) The world's beekeeping - past and present. En: Graham J (ed.) *The hive and the honey bee*, 1-22, Datant & Sons.

Cresswell JE (2011). A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20:149-157.

Daly KC, Christensen TA, Lei H, Smith BH y Hildebrand JG (2004). Learning modulates the ensemble representations for odors in primary olfactory networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(28):10476-10481.

Davis RL (1993). Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron*, 11(1):1-14.

De Belle JS y Heisenberg M (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information*, 263(5147):692-694.

de Brito Sanchez MG, Chen C, Li J, Liu F, Gauthier M y Giurfa M (2008). Behavioral studies on tarsal gustation in honeybees: sucrose responsiveness and sucrose-mediated olfactory conditioning. *Journal of Comparative Physiology A*, 194(10):861-869.

Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M y Pham-Delègue M-H (2004). Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78:83-92.

Decourtye A y Devillers J (2010) Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. En: Thany SH (ed.) *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, 85-95, Springer.

Decourtye A, Lacassie E y Pham-Delègue M-H (2003). Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest management science*, 59(3):269-278.

Déglise P, Grünewald B y Gauthier M (2002). The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neuroscience Letters*, 321:13-16.

DeGrandi-Hoffman G y Hagler J (2000). The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Sociaux*, 47:302-306.

DeGrandi-Hoffman G y Martin JH (1993). The size and distribution of the honey bee (*Apis mellifera* L.) cross-pollinating population on male-sterile sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Apicultural Research*, 32(3-4):135-142.

Dill GM (2005). Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest management science*, 61(3):219-224.

Doublet V, Labarussias M, Miranda JR, Moritz RF y Paxton RJ (2015). Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology*, 17(4):969-983.

EFSA (2014). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of confirmatory data submitted for the active substance imidacloprid. *EFSA Journal*, 12(7):3741.

Eiri DM y Nieh JC (2012). A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *The Journal of Experimental Biology*, 215:2022-2029.

El Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M y Armengaud C (2008). Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(4):653-661.

Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W y Nauen R (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science*, 64(11):1099-1105.

Erber J, Masuhr T y Menzel R (1980). Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiological Entomology*, 5(4):343-358.

Esch H (1960). Über die körpertemperaturen und den wärmehaushalt von *Apis mellifica*. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 43(3):305-335.

Esslen J y Kaissling K-E (1976). Zahl und verteilung antennaler sensillen bei der honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Zoomorphologie*, 83(3):227-251.

EuropeanComission (2013) Commission Implementing Regulation (EU) No 485/2013 1, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances.

Faber T, Joerges J y Menzel R (1999). Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nature Neuroscience*, 2(1):74-78.

Fahrbach S y Robinson G (1995). Behavioral development in the honey bee: toward the study of learning under natural conditions. *Learning & Memory*, 2:199-224.

Fahrbach S y Robinson G (1996). Juvenile hormone, behavioral maturation, and brain structure in the honey bee. *Developmental neuroscience*, 18(1-2):102-114.

Farina WM, Grüter C, Acosta L y Mc Cabe S (2007). Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive. *Naturwissenschaften*, 94:55-60.

Farina WM y Wainselboim AJ (2001). Changes in the thoracic temperature of honeybees while receiving nectar from foragers collecting at different reward rates. *Journal of Experimental Biology*, 204(9):1653-1658.

Feng JC y Thompson DG (1990). Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 2. Persistence in foliage and soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(4):1118-1125.

Fewell JH (2003). Social insect networks. *Science*, 301(5641):1867-1870.

Frasnelli E, Anfora G, Trona F, Tessarolo F y Vallortigara G (2010). Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research*, 209:221-225.

Frings H y Frings M (1949). The loci of contact chemoreceptors in insects. A review with new evidence. *American Midland Naturalist*:602-658.

Galvanho JP, Carrera MP, Moreira DD, Erthal Jr M, Silva CP y Samuels RI (2013). Imidacloprid inhibits behavioral defences of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Behavior*, 26:1-13.

Gauthier M (2010) State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. En: Thany SH (ed.) *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, 97-115, Springer.

Gauthier M y Grünewald B (2012) Neurotransmitter systems in the honey bee brain: functions in learning and memory. En: Galizia GC, Eisenhardt D y Giurfa M (eds.) *Honeybee neurobiology and behavior*, 155-169, Springer.

Giesy JP, Dobson S y Solomon KR (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167:35-120.

Gill RJ, Ramos-Rodriguez O y Raine NE (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422):105-108.

Girolami V, Marzaro M, Vivan L, Mazzon L, Giorio C, Marton D y Tapparo A (2013). Aerial powdering of bees inside mobile cages and the extent of neonicotinoid cloud surrounding corn drillers. *Journal of Applied Entomology*, 137(1-2):35-44.

Girolami V, Marzaro M, Vivan L, Mazzon L, Greatti M, Giorio C, Marton D y Tapparo A (2012). Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication. *Journal of Applied Entomology*, 136(1- 2):17-26.

Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C y Tapparo A (2009). Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *Journal of Economic Entomology*, 102(5):1808-1815.

Godfray HCJ, Blacquière T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NE, Vanbergen AJ y McLean AR (2014). A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281:20140558.

Goodman L (2003) *Form and function in the honey bee*, International Bee Research Association.

Gordon DM (2007). Control without hierarchy. *Nature*, 446(7132):143-143.

Goulson D (2013). Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4):977-987.

Goyret J y Farina WM (2005). Non-random nectar unloading interactions between foragers and their receivers in the honeybee hive. *Naturwissenschaften*, 92:440-443.

Gregorc A y Ellis JD (2011). Cell death localization *in situ* in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99:200-207.

Grüter C, Balbuena M y Farina W (2009). Retention of long-term memories in different age groups of honeybee (*Apis mellifera*) workers. *Insectes Sociaux*, 56(4):385-387.

Grüter C y Farina W (2007). Nectar distribution and its relation to food quality in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes Sociaux*, 54(1):87-94.

Guerrieri F, Schubert M, Sandoz J-C y Giurfa M (2005). Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biology*, 3(4):e60.

Guez D, Belzunces LP y Maleszka R (2003). Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacology Biochemistry and behavior*, 75(1):217-222.

Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R y Belzunces LP (2001). Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7-and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 76:183-191.

Hall M y Halliday T (1998) *Behaviour and evolution*, Springer Verlag.

Hammer M (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*, 366:59-63.

Hammer M y Menzel R (1995). Learning and memory in the honeybee. *The Journal of neuroscience*, 15(3):1617-1630.

Harborne JB (1982) *Introduction to ecological biochemistry*, Academic Press.

Herbert LT, Vázquez DE, Arenas A y Farina WM (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *The Journal of Experimental Biology*, 217:3457-3464.

Hildebrand JG y Shepherd GM (1997). Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annual review of neuroscience*, 20(1):595-631.

Hladik ML, Vandever M y Smalling KL (2016). Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. *Science of The Total Environment*, 542:469-477.

Hothorn T, Bretz F, Westfall P y Heiberger RM (2008). Multcomp: simultaneous inference in general parametric models. R package version 1.0-0. *R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria*.

Hough P (2014) The trading and use of agrochemicals. En: Campbell WB y López-Ortíz S (eds.) *Sustainable food production includes human and environmental health*, 1-41, Springer.

Huang Z-Y y Robinson GE (1996). Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 39(3):147-158.

Hurst V, Stevenson PC y Wright GA (2014). Toxins induce 'malaise' behaviour in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Physiology A*, 200:881-890.

Jeschke P, Nauen R, Schindler M y Elbert A (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7):2897-2908.

Johnson B (2010a). Spatial effects, sampling errors, and task specialization in the honey bee. *Insectes Sociaux*, 57(2):239-248.

Johnson BR (2002). Reallocation of labor in honeybee colonies during heat stress: the relative roles of task switching and the activation of reserve labor. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51(2):188-196.

Johnson BR (2008a). Global information sampling in the honey bee. *Naturwissenschaften*, 95(6):523-530.

Johnson BR (2008b). Within-nest temporal polyethism in the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(5):777-784.

Johnson BR (2010b). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64:305-316.

Johnson RM, Pollock HS y Berenbaum MR (2009). Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology*, 102(2):474-479.

Jonker MJ, Svendsen C, Bedaux JJ, Bongers M y Kammenga JE (2005). Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(10):2701-2713.

Kaissling K-E (1974) Sensory transduction in insect olfactory receptors. En: Jaenicke L (ed.) *Biochemistry of sensory functions*, 243-273, Springer.

Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM (1991) *Principles of neural science*, Elsevier.

Kessler SC, Tiedeken EJ, Simcock KL, Derveau S, Mitchell J, Softley S, Stout JC y Wright GA (2015). Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature*10.1038/nature14414.

KleffmannGroup (2012) Informe del Mercado argentino de productos fitosanitarios.

Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C y Tscharntke T (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1608):303-313.

Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino G y Given K (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE*, 7(1):e29268.

Lambin M, Armengaud C, Raymond S y Gauthier M (2001). Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 48(3):129-134.

Leal WS (2013). Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58:373-391.

Li H, Wu F, Zhao L, Tan J, Jiang H y Hu F (2015). Neonicotinoid insecticide interact with honeybee odorant-binding protein: Implication for olfactory dysfunction. *International journal of biological macromolecules*, 81:624-630.

Lindauer M (1952). Ein beitrag zur frage der arbeitsteilung im bienenstaat. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 34(4):299-345.

Lindauer M (1971a) *Communication among social bees*, Harvard University Press.

Lindauer M (1971b). The functional significance of the honeybee waggle dance. *The American Naturalist*, 105(942):89-96.

Mackintosh NJ (2013) *Animal learning and cognition*, Academic Press.

Martinez A y Farina WM (2008). Honeybees modify gustatory responsiveness after receiving nectar from foragers within the hive. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62:529-535.

Masson C y Arnold G (1984). Ontogeny, maturation and plasticity of the olfactory system in the workerbee. *Journal of Insect Physiology*, 30(1):7-14.

Masson C y Arnold G (1987) Organization and plasticity of the olfactory system of the honeybee, *Apis mellifera*. En: Menzel R y Mercer A (eds.) *Neurobiology and Behavior of Honeybees*, 280-295, Springer Verlag.

Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M y Sattelle DB (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11):573-580.

Matthews G (2008) *Pesticides: Health, Safety and the environment*, John Wiley & Sons.

McQuillan HJ, Barron AB y Mercer AR (2012). Age-and behaviour-related changes in the expression of biogenic amine receptor genes in the antennae of honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Physiology A*, 198:753-761.

Medrzycki P, Giffard H, Aupinel P, Belzunces L, Chauzat M-P, Classen C, Colin ME, Dupont T, Girolami V y Johnson R (2013) Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. En: Dietemann V, Ellis J y Neumann P (eds.) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research Journal of Apicultural Research 52(4): http://dxdoiorg/103896/IBRA152414*.

Medrzycki P, Montanari R, Bortolotti L, Sabatini AG, Maini S y Porrini C (2003). Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 56(1):59-62.

Mizunami M, Weibrecht JM y Strausfeld NJ (1993) A new role for the insect mushroom bodies: place memory and motor control, *Proceedings of the workshop on Locomotion Control in Legged Invertebrates on Biological neural networks in invertebrate neuroethology and robotics*.

Morgan SM, Huryn VMB, Downes SR y Mercer AR (1998). The effects of queenlessness on the maturation of the honey bee olfactory system. *Behavioural brain research*, 91(1):115-126.

Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R y Pettis JS (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE*, 5(3):e9754.

Nagata K, Song J-H, Shono T y Narahashi T (1998). Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor-channel by the nitromethylene heterocycle imidacloprid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285(2):731-738.

Nandula VK, Reddy KN, Duke SO y Poston DH (2005). Glyphosate-resistant weeds: Current status and future outlook. *Outlooks on Pest Management*, 16(4):183.

Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U y Schmuck R (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Management Science*, 57:577-586.

Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, Della Vedova G, Cattonaro F, Caprio E y Pennacchio F (2012). Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog*, 8(6):e1002735.

Nixon H y Ribbands C (1952). Food transmission within the honeybee community. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 140(898):43-50.

Núñez J (1982). Honeybee foraging strategies at a food source in relation to its distance from the hive and the rate of sugar flow. *Journal of Apicultural Research*, 21(3):139-150.

Núñez JA (1970). The relationship between sugar flow and foraging and recruiting behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Animal Behaviour*, 18:527-538.

Nusse R y Varmus HE (1992). *Wnt* genes. *Cell*, 69(7):1073-1087.

Page R, Erber J y Fondrk M (1998). The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 182:489-500.

Page RE y Erber J (2002). Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften*, 89:91-106.

Palmer MJ, Moffat C, Saranzewa N, Harvey J, Wright GA y Connolly CN (2013). Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nature Communications*, 4:1634.

Pankiw T, Nelson M, Page Jr RE y Fondrk MK (2004). The communal crop: modulation of sucrose response thresholds of pre-foraging honey bees with incoming nectar quality. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55:286-292.

Park W (1925). The storing and ripening of honey by honeybees. *Journal of Economic Entomology*, 18(2):405-410.

Pavlov IP (1927) *Conditional reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*, H. Milford.

Peng Y-C y Yang E-C (2016). Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Scientific reports*, 6:19298.

Pettis JS, Johnson J y Dively G (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99:153-158.

Pírez N y Farina WM (2004). Nectar-receiver behavior in relation to the reward rate experienced by foraging honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55(6):574-582.

Powles SB (2008). Evolution in action: glyphosate-resistant weeds threaten world crops. *Outlooks on Pest Management*, 19(6):256-259.

Ragsdale NN (1999). The role of pesticides in agricultural crop protection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 894(1):199-205.

Ramirez-Romero R, Chaufaux J y Pham-Delegue M (2005). Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie*, 36:601-611.

Ramírez G, Fagundez C, Grosso JP, Argibay P, Arenas A y Farina WM (2016). Odor experiences during preimaginal stages cause behavioral and neural

plasticity in adult honeybees. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10:105.

Ramírez GP, Martínez AS, Fernández VM, Corti Bielsa G y Farina WM (2010). The influence of gustatory and olfactory experiences on responsiveness to reward in the honeybee. *PLoS ONE*, 5(10):e13498.

Raney T (2004). El estado mundial de agricultura y la alimentacion 2003-2004. *Coleccion FAO: Agricultura (FAO)*.

Ray S y Ferneyhough B (1997). The effects of age on olfactory learning and memory in the honey bee *Apis mellifera*. *NeuroReport*, 8:789-793.

Rehder V (1989). Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee. *Journal of Comparative Neurology*, 279(3):499-513.

Relyea RA (2005). The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological applications*, 15(4):1118-1124.

Ribbands R (1955). The scent language of honey bees. *Annual Report Smithsonian Institution*, 4243:369-377.

Rinkevich FD, Margotta JW, Pittman JM, Danka RG, Tarver MR, Ottea JA y Healy KB (2015). Genetics, synergists, and age affect insecticide sensitivity of the honey bee, *Apis mellifera*. *PloS one*, 10(10):e0139841.

Riveros AJ y Gronenberg W (2010). Sensory allometry, foraging task specialization and resource exploitation in honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(6):955-966.

Robertson HM y Wanner KW (2006). The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome research*, 16(11):1395-1403.

Robinson GE (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annual review of entomology*, 37(1):637-665.

Robinson GE, Underwood BA y Henderson CE (1984). A highly specialized water-collecting honey bee. *Apidologie*, 15(3):355-358.

Rortais A, Arnold G, Halm M-P y Touffet-Briens F (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36:71-83.

Ruhman MA, Bireley Sr R y Alder Sr D (2016) *Preliminary pollinator assessment to support the registration review of imidacloprid*, Washington D.C.

Sandoz J-C (2012) Olfaction in honey bees: From molecules to behavior. En: Galizia GC, Eisenhardt D y Giurfa M (eds.) *Honeybee neurobiology and behaviour*, 235-252, Springer.

Scheiner R, Page RE y Erber J (2004). Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 35(2):133-142.

Schmuck R, Schöning R, Stork A y Schramel O (2001). Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Science*, 57:225-238.

Schneider CW, Tautz J, Grünewald B y Fuchs S (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 7(1):e30023.

Seeley T (1995) *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*, Harvard University Press.

Seeley TD (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 11(4):287-293.

SENASA (1999) *Reevaluación del Imidacloprid por posibles efectos adversos en abejas domésticas Apis mellifera*, CA de Buenos Aires.

SENASA (2014) Miel argentina de alta calidad endulza al mundo. *SENASA comunica*.

Singh S (2013). Guttation: path, principles and functions. *Australian Journal of Botany*, 61(7):497-515.

Skinner B (1938) *The behavior of organisms*, Appleton-Century-Crofts.

Smirle MJ y Winston ML (1988). Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. *Canadian Journal of Zoology*, 66(9):1938-1942.

Snodgrass RE (1984) *Anatomy of the honey bee*, Cornell University Press.

Squire LR y Kandel ER (2000) *Memory: From mind to molecules*, Macmillan.

Stabentheiner A, Pressl H, Papst T, Hrassnigg N y Crailsheim K (2003). Endothermic heat production in honeybee winter clusters. *Journal of Experimental Biology*, 206(2):353-358.

Strambi C, Cayre M y Strambi A (1999). Neural plasticity in the adult insect brain and its hormonal control. *International review of cytology*, 190:137-174.

Suchail S, De Sousa G, Rahmani R y Belzunces LP (2004). In vivo distribution and metabolisation of ^{14}C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Management Science*, 60:1056-1062.

Suchail S, Guez D y Belzunces LP (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7):1901-1905.

Suchail S, Guez D y Belzunces LP (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11):2482-2486.

Takeda K (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 6(3):168-179.

Tapparo A, Giorio C, Marzaro M, Marton D, Soldà L y Girolami V (2011). Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(6):1564-1568.

Tapparo A, Marton D, Giorio C, Zanella A, Solda` L, Marzaro M, Vivan L y Girolami V (2012). Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. *Environmental science & technology*, 46(5):2592-2599.

Tate T, Spurlock J y Christian F (1997). Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33(3):286-289.

Teeters BS, Johnson RM, Ellis MD y Siegfried BD (2012). Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(6):1349-1354.

Thompson HM (2010). Risk assessment for honey bees and pesticides—recent developments and 'new issues'. *Pest management science*, 66(11):1157-1162.

Thompson HM, Levine SL, Doering J, Norman S, Manson P, Sutton P y von Mérey G (2014). Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10(3):463-370.

Tilman D (1999). Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11):5995-6000.

Tomizawa M y Casida JE (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 48:339-364.

Tomizawa M y Casida JE (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45:247-268.

Tosi S, Démares FJ, Nicolson SW, Medrzycki P, Pirk CW y Human H (2016). Effects of a neonicotinoid pesticide on thermoregulation of African honey bees (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of insect physiology*, 93:56-63.

Trapp S (2004). Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environmental Science and Pollution Research*, 11(1):33-39.

Traynor KS, Pettis JS, Tarpy DR, Mullin CA, Frazier JL y Frazier M (2016). In-hive pesticide exposome: Assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Scientific Reports*, 6.

United Nations DoEaSA, Population Division (2015) *World Population Prospects: The 2015 Revision, Methodology of the United Nations Population Estimates and Projections*,

Vaknin Y, Gan-Mor S, Bechar A, Ronen B y Eisikowitch D (2000). The role of electrostatic forces in pollination. *Plant Systematics and Evolution*, 222(1-4):133-142.

vanEngelsdorp D y Meixner MD (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103:S80-S95.

Vázquez DE (2015) *Evaluación de los efectos del glifosato sobre el desarrollo larval de la abeja doméstica (Apis mellifera)*, Universidad de Buenos Aires.

Venables WN y Ripley BD (2002) *Modern Applied Statistics with S*, Springer.

Vergoz V, McQuillan HJ, Geddes LH, Pullar K, Nicholson BJ, Paulin MG y Mercer AR (2009). Peripheral modulation of worker bee responses to queen mandibular pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49):20930-20935.

Vojvodic S, Boomsma JJ, Eilenberg J y Jensen AB (2012). Virulence of mixed fungal infections in honey bee brood. *Frontiers in zoology*, 9(1):1.

von Frisch K (1923). Uber die'Sprache'der Bienen. *Zoologische Jahrbucher Abteilung fur Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere*, 40:1-186.

von Frisch K (1967) *The dance language and orientation of bees*, Harvard University Press.

Wang S, Zhang S, Sato K y Srinivasan MV (2005). Maturation of odor representation in the honeybee antennal lobe. *Journal of insect physiology*, 51(11):1244-1254.

Whitehead A y Larsen J (1976a). Ultrastructure of the contact chemoreceptors of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 5(4):301-315.

Whitehead AT y Larsen JR (1976b). Electrophysiological responses of galeal contact chemoreceptors of *Apis mellifera* to selected sugars and electrolytes. *Journal of Insect Physiology*, 22(12):1609-1616.

Williams GS, Alaux C, Costa C, Csáki T, Doublet V, Eisenhardt D, Fries I, Kuhn R, McMahon DP, Medrzycki P, Murray TE, Natsonopoulou ME, Neumann P, Oliver R, Paxton RJ, Pernal SF, Shutler D, Tanner G, van der Steen JJM y Brodschneider R (2013) Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. En: Dietemann V, Ellis JD y Neumann P (eds.) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research Journal of Apicultural Research*, 52(1):http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04.

Williamson SM, Baker DD y Wright GA (2013). Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Invertebrate Neuroscience*, 13:63-70.

Williamson SM, Willis SJ y Wright GA (2014). Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology*, 23(8):1409-1418.

Williamson SM y Wright GA (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *The Journal of Experimental Biology*, 216:1799-1807.

Wilson EO (1971) *The insect societies*, Belknap Press of Harvard University Press.

Winston ML (1987) *The biology of the honey bee*, Harvard University Press.

Wright GA, Softley S y Earnshaw H (2015). Low doses of neonicotinoid pesticides in food rewards impair short-term olfactory memory in foraging-age honeybees. *Scientific reports*, 5.

Wu JY, Anelli CM y Sheppard WS (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE*, 6(2):e14720.

Wu JY, Smart MD, Anelli CM y Sheppard WS (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of invertebrate pathology*, 109(3):326-329.

Yamamoto I (1999) Nicotine to nicotinoids: 1962 to 1997. En: Yamamoto I y Casida JE (eds.) *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*, 3-27, Springer.

Yang E-C, Chang H-C, Wu W-Y y Chen Y-W (2012). Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE*, 7(11):e49472.