



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Mecanismos comportamentales y fisiológicos que regulan la especialización de tareas en abejas recolectoras (*Apis mellifera*)

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires, área Ciencias Biológicas

Lic. Emilia Alejandra Moreno Coellar

Director de Tesis: Dr. Andrés Arenas

Consejero de Estudios: Dr. Walter Farina

Lugar de trabajo: Laboratorio de Insectos Sociales

Fecha de presentación: Buenos Aires, 02/02/2024

Mecanismos comportamentales y fisiológicos que regulan la especialización de tareas en abejas recolectoras (*Apis mellifera*)

Resumen

La división de tareas en las colonias de abejas es una propiedad emergente que surge de la interacción entre la predisposición genética y la regulación epigenética de las abejas obreras, que afecta su capacidad de responder a estímulos relacionados con tareas específicas y, en consecuencia, la probabilidad de aprenderlos. La división de tareas se puede explicar mediante el modelo de umbral de respuesta, que sugiere variabilidad en la sensibilidad de las obreras a los estímulos específicos de cada tarea. Los individuos con un umbral de respuesta relativamente bajo para los estímulos relacionados con una tarea tienden a enrolarse en ella con mayor probabilidad que aquellos con umbrales más altos (que comienzan a responder a intensidades de estímulo más altas). Un caso ampliamente estudiado de cómo las variaciones en la sensibilidad pueden dar lugar a la división de tareas es la especialización en la recolección de recursos en la abeja *Apis mellifera*, a través de la cual las forrajeras se especializan en recolectar polen (fuente de proteínas) ó néctar (fuente de carbohidratos). Esta especialización se ha correlacionado con variaciones en la sensibilidad a la sacarosa, un componente principal del néctar. Estudios previos muestran que las recolectoras de polen son más sensibles a la sacarosa que las de néctar, un resultado que aunque no se ajusta al modelo de umbrales de respuesta, se ha interpretado como adaptativo, al permitir que las recolectoras de néctar se inclinen por buscar fuentes de mayor calidad (más concentradas). Por otro lado, estos resultados tampoco explican porqué los individuos con altos niveles de respuesta a los azúcares prefieren recolectar polen. En este marco, el objetivo de mi tesis es entender los mecanismos comportamentales y fisiológicos que permiten que la sensibilidad a estímulos apetitivos (gustativos y olfativos) se ajuste según la predisposición recolectora de las abejas y su motivación por forrajar uno u otro recurso.

En el capítulo 2, estudié si la sensibilidad gustativa de las recolectoras fluctúa en función de los cambios en la motivación por el recurso floral (es decir, azúcares o polen) a lo largo del ciclo de recolección. Distinguiendo entre las recolectoras que arriban o parten (cargadas) de una fuente de polen o de solución de sacarosa, mostré que al inicio de la recolección, cuando están motivadas por el recurso, las forrajeras de néctar son más sensibles a la sacarosa que las de polen, y que al partir su sensibilidad disminuye. Mis resultados sugieren que, aunque la predisposición genética influye en la especialización, la motivación y/o el nivel de saciedad relacionados con el momento de la visita de forrajeo son factores relevantes en la interpretación de la especialización de la recolección a través del modelo de umbrales de respuesta.

En el capítulo 3, me propuse investigar si los cambios en la sensibilidad a la sacarosa asociados a la predisposición de las recolectoras y al momento de la visita de forrajeo afectan

el aprendizaje y la retención de memorias. Para esto, se condicionó la respuesta de la extensión de la probóscide (REP), explorando las diferencias en el desempeño de las recolectoras de polen y néctar al incluir polen como estímulo recompensado durante el protocolo de condicionamiento olfativo. Las recolectoras de néctar mostraron un mejor desempeño cuando se usó una recompensa de sacarosa en comparación con las recolectoras de polen. Sin embargo, el desempeño de las recolectoras de polen mejoró significativamente cuando el polen se incluyó como co-refuerzo a la recompensa de sacarosa al inicio de la visita de forrajeo, momento en que las recolectoras están más motivadas por el recurso y menos sensibles a la sacarosa.

Más allá del aprendizaje asociativo, las abejas también exhiben aprendizaje no asociativo si se les expone repetidamente a un estímulo biológicamente relevante. En el capítulo 4 investigué las diferencias en el desempeño durante el aprendizaje no asociativo que podrían contribuir a la especialización de las forrajeras. Para esto, estudié la habituación y deshabitación de la REP utilizando diversas combinaciones de concentraciones de sacarosa y sacarosa + polen como estímulos. Mis resultados indican que las recolectoras de polen mostraron un menor grado de habituación que las recolectoras de néctar y un mayor grado de deshabitación si el polen participaba como refuerzo adicional.

Además de las claves gustativas, las fuentes de alimento pueden presentar otros estímulos sensoriales que, en mayor o menor medida, predicen la presencia del alimento. En este sentido, los olores son fundamentales para asistir la búsqueda y recolección de recursos. En el capítulo 5 estudié las diferencias en la sensibilidad olfativa (aprendizaje y detección) de olores florales y de relevancia biológica entre recolectoras de polen y néctar utilizando el condicionamiento clásico de la REP y electroantenogramas (EAGs). Los resultados muestran que las recolectoras de polen son más sensibles para detectar los aromas florales linalol y nonanal que las recolectoras de néctar, y en concordancia con estos resultados, las recolectoras de polen tuvieron un mejor desempeño durante el aprendizaje en comparación con las recolectoras de néctar cuando se presentaron bajas concentraciones de los aromas florales. Los resultados de la detección de los aromas del polen y de la feromona de cría (E)- β -ocimene indican que existen diferencias en cómo los estímulos con relevancia biológica son procesados en los cerebros de las abejas con predisposiciones de recolección distintas.

Como conclusión, los resultados de esta tesis respaldan la idea de que las abejas recolectoras de polen y néctar difieren en la percepción de las recompensas florales y los estímulos relacionados con las fuentes de polen o néctar. Dicha percepción es dinámica y cambia rápidamente entre la llegada y la partida de una fuente de alimento, lo que conduce a diferencias interindividuales en los niveles de respuesta, aprendizaje y memoria que contribuyen a la especialización en la recolección al permitirle a las abejas amplificar o filtrar la información relevante para realizar su tarea.

Palabras clave: División del trabajo, Insectos sociales, Modelo de umbral de respuesta, Sensibilidad a la sacarosa, Aprendizaje asociativo y no asociativo.

Behavioral and physiological mechanisms regulating task specialization in forager bees (*Apis mellifera*)

Abstract

Task division in honeybee colonies is an emergent property arising from the interaction between genetic predisposition and the epigenetic regulation of worker bees, which affects their ability to respond to task-specific stimuli and, consequently, the probability of learning them. Task division can be explained by the response threshold model, which suggests variability in workers' sensitivity to task-specific stimuli. Individuals with a relatively low response threshold for task-related stimuli are more likely to engage in that task than those with higher thresholds (who begin to respond to higher stimulus intensities). A widely studied case of how variations in sensitivity can lead to task division is the specialization in resource collection in the honeybee *Apis mellifera*, wherein foragers specialize in collecting pollen (protein source) or nectar (carbohydrate source). This specialization has been correlated with variations in sensitivity to sucrose, a major component of nectar. Previous studies show that pollen foragers are more sensitive to sucrose than nectar foragers, a result that, although not fitting the response threshold model, has been interpreted as adaptive, allowing nectar foragers to prefer seeking higher quality (more concentrated) sources. On the other hand, these results do not explain why individuals with high sugar response levels prefer collecting pollen. Within this framework, the objective of my thesis is to understand the behavioral and physiological mechanisms that enable sensitivity to appetitive stimuli (gustatory and olfactory) to adjust according to the bees' foraging predisposition and motivation to forage for one resource or another.

In Chapter 2, I studied whether the gustatory responsiveness of foragers fluctuates based on changes in motivation for the floral resource (i.e., sugars or pollen) throughout the foraging cycle. Distinguishing between foragers arriving or departing (loaded) from a pollen or sucrose solution source, I showed that at the start of foraging, when they are motivated by the resource, nectar foragers are more responsive to sucrose than pollen foragers, and that their responsiveness decreases upon departure. My results suggest that although genetic predisposition influences specialization, motivation and/or satiety level related to the timing of the foraging visit are relevant factors in interpreting foraging specialization through the response threshold model.

In Chapter 3, I aimed to investigate whether changes in sucrose responsiveness associated with foragers' predisposition and the timing of the foraging visit affect learning and memory retention. To this end, the proboscis extension response (PER) was conditioned, exploring the differences in performance between pollen and nectar foragers by including

pollen as a rewarded stimulus during the olfactory conditioning protocol. Nectar foragers performed better when a sucrose reward was used compared to pollen foragers. However, pollen foragers' performance significantly improved when pollen was included as a co-reinforcer to the sucrose reward at the start of the foraging visit, a time when foragers are more motivated by the resource and less responsive to sucrose.

Beyond associative learning, bees also exhibit non-associative learning when repeatedly exposed to a biologically relevant stimulus. In Chapter 4, I investigated the differences in performance during non-associative learning that could contribute to forager specialization. To do this, I studied the habituation and dishabituation of the PER using various combinations of sucrose concentrations and sucrose + pollen as stimuli. My results indicate that pollen foragers showed a lower degree of habituation than nectar foragers and a greater degree of dishabituation if pollen was used as an additional reinforcement.

In addition to gustatory cues, food sources may present other sensory stimuli that, to a greater or lesser extent, predict the presence of food. In this sense, odors are crucial in aiding the search and collection of resources. In Chapter 5, I studied the differences in olfactory sensitivity (learning and detection) to floral and biologically relevant odors between pollen and nectar foragers using classical PER conditioning and electroantennograms (EAGs). The results show that pollen foragers are more sensitive to detecting the floral odors linalool and nonanal than nectar foragers, and in line with these results, pollen foragers performed better during learning when low concentrations of floral odors were presented. The results of detecting pollen odors and the brood pheromone (E)- β -ocimene indicate that there are differences in how biologically relevant stimuli are processed in the brains of bees with different foraging predispositions.

In conclusion, the results of this thesis support the idea that pollen and nectar foragers differ in their perception of floral rewards and stimuli related to pollen or nectar sources. This perception is dynamic and quickly changes between arrival and departure from a food source, leading to interindividual differences in response levels, learning, and memory that contribute to foraging specialization by allowing bees to amplify or filter relevant information to perform their tasks.

Key words: Division of labor, Foraging specialization, Learning performance, Response threshold model, Social insects, Sucrose sensitivity.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Laboratorio de Insectos Sociales por abrirme las puertas con tanto cariño. A Walter, Roxy y especialmente a Andrés, quien confía en mí una y otra vez, y me ha guiado y enseñado tanto.

A Héctor y a lxs chiquxs del laboratorio que compartieron conmigo estos años: Flor, Sol, Denu, Maru, Ceci, Diegui, Ivy, Facu, Nacho y Dani, gracias por enseñarme a tomar mate y por tantas risas. A mi amiga Rocío le doy gracias por ser parte de mi vida de tantas maneras.

Le agradezco profundamente a mi familia, a mi hija Analía (a quien le dedico esta tesis con todo mi corazón), a mi maravilloso compañero Wag y a la gata Manuela, con quienes nos acompañamos en la aventura de estudiar en Buenos Aires. Es un honor caminar con ustedes, mis amores.

A mi mamá y mi hermana gracias por ser contención y sostén. A mi hermano, mi prima, mi cuñado y al padre de mi hija gracias por el apoyo incondicional. A mis amigxs Shanta, Nico, Anita, Gordis, Sabi, Karlita, Jessy, Daniel, Juancher y Niki, son lo más, gracias por escucharme y darme ánimos tantos años. Lxs amo a todxs.

A Analía

Todos los seres vivos son, de cierta manera, un mismo cuerpo, una misma vida y un mismo yo que continúa pasando de forma en forma, de sujeto en sujeto, de existencia en existencia. Esta misma vida es la que anima el planeta, también ella nacida, escapada de un cuerpo preexistente-el Sol- y engendrada por metamorfosis de su materia hace 4,5 miles de millones de años. Todos nosotros somos un fragmento, un destello de luz. Energía, materia solar que intenta vivir de otro modo a como lo hizo en sus innumerables existencias anteriores. Y sin embargo, este origen común, o por decirlo mejor, el hecho de que seamos la carne de la Tierra y la luz del Sol que reinventan una nueva manera de decir "yo", no nos condena a una identidad. Por el contrario, es a causa de este parentesco mucho más profundo e íntimo (somos la Tierra y el Sol, somos su cuerpo, su vida) que estamos destinados a negar, en cada instante, nuestra naturaleza y nuestra identidad, y forzadxs a elaborar nuevas. Jamás la diferencia es una naturaleza, sino un destino y una tarea. Estamos obligadxs a devenir diferentes, estamos obligadxs a metamorfosearnos.

Tener en mí el cuerpo de mi padre y de mi madre, tener sus formas, tener su vida, significa por lo tanto tener en mí el cuerpo y la vida de una serie innumerable de vivientes, todos nacidos de otros vivientes, hasta las fronteras de la humanidad, y todavía más lejos. El nacimiento no es simplemente el surgimiento de lo nuevo, es también el extravío del futuro en un pasado sin límite.

Nosotrxs ya éramos, pero de manera diferente: el nacimiento no es un comienzo absoluto. Ya había algo antes de nosotrxs, ya éramos algo antes de nacer, había yo antes que yo. El nacimiento no es más que eso, la imposibilidad de ser por fuera de una relación de continuidad entre nuestro yo y el de otrxs, entre la vida humana y la vida no humana, entre la vida y la materia del mundo.

Emanuele Coccia, METAMORFOSIS, París, 2020.

Contenido

1. Introducción general	1
1.1 División de tareas en <i>Apis mellifera</i> L.....	2
1.1.2 Organización de la colonia	3
1.2 Recolección de recursos florales	11
1.2.1 Polen y néctar.....	11
1.2.2 Especialización de tareas entre abejas forrajeras	12
1.2.3 Diferencias en la sensibilidad a los estímulos.....	14
1.2.3 La visita de forrajeo	18
1.3 Percepción sensorial	19
1.3.1 Sistema olfativo.....	19
1.3.1 Sistema gustativo.....	23
1.4 Aprendizaje y memoria.....	25
1.4.1 Aprendizaje asociativo	26
1.4.2 Aprendizaje no asociativo.....	28
1.5 Objetivos e hipótesis	30
1.5.1 Objetivo general	30
1.5.2 Hipótesis y predicciones.....	30
2. Sensibilidad a la sacarosa en distintos momentos de la visita de forrajeo	33
2.1 Introducción	34
2.2 Metodología	36
2.1.1 Abejas	36
2.1.2 Umbráles de respuesta a la sacarosa	37
2.3 Análisis estadísticos	38
2.4 Resultados	39
2.5 Discusión	40
3. Aprendizaje asociativo en distintos momentos de la visita de forrajeo y con distintas recompensas florales	44
3.1 Introducción	45
3.2 Metodología	47
3.2.1 Abejas	47
3.2.2 Condicionamiento olfativo de la REP usando polen como co-refuerzo	48
3.2.3 Presentación de los estímulos olfativos	49
3.2.4 Experimentos	50
3.2.4.1 Experimento 3.1 Adquisición y extinción de memorias en forrajeras de polen al inicio y al final de la visita de forrajeo	50
3.2.4.2 Experimento 3.2 Adquisición y retención de memorias en forrajeras de polen y néctar al inicio de la visita de forrajeo	52
3.3 Análisis estadísticos	54
3.4 Resultados	55
3.4.1 Experimento 3.1 Adquisición y extinción de memorias en forrajeras de polen al inicio y al final de la visita de forrajeo	55
3.4.2 Experimento 3.2 Adquisición y retención de memorias en forrajeras de polen y néctar al inicio de la visita de forrajeo	57
3.5 Discusión	59
4. Aprendizaje no asociativo con distintos estímulos florales	63
4.1 Introducción	64

4.2 Metodología	66
4.2.1 Abejas	66
4.2.2 Habitación de la REP.....	66
4.2.3 Deshabitación de la REP	67
4.3 Análisis estadísticos	69
4.4 Resultados	70
4.4.1 Habitación de la REP.....	70
4.4.2 Deshabitación de la REP	72
5.5 Discusión.....	73
5. Sensibilidad olfativa en forrajeras de polen y néctar y su correlación con la especialización de tareas	77
5.1 Introducción	78
5.2 Metodología	81
5.2.1 Abejas	81
5.2.2 Estímulos olfativos	82
5.2.3 Experimentos	82
5.2.3.1 Experimento 5.1 Aprendizaje de aromas florales a concentraciones crecientes en recolectoras de polen y néctar	82
5.2.3.2 Experimento 5.2 Aprendizaje de olores de polen en recolectoras de polen y néctar	83
5.2.3.3 Experimento 5.3 Detección de aromas florales a concentraciones crecientes en recolectoras de polen y néctar	84
5.2.3.4 Experimento 5.4 Detección de volátiles de polen y (E)-β-ocimene en recolectoras de polen y néctar	85
5.3 Análisis estadísticos	87
5.4 Resultados	88
5.4.1 Experimento 5.1 Aprendizaje de aromas florales a concentraciones crecientes en recolectoras de polen y néctar	88
5.4.2 Experimento 5.2 Aprendizaje de olores de polen en recolectoras de polen y néctar	90
5.4.3 Experimento 5.3 Detección de aromas florales a concentraciones crecientes en recolectoras de polen y néctar	93
5.4.4 Experimento 5.4 Detección de volátiles de polen y (E)-β-ocimene en recolectoras de polen y néctar	95
5.5 Discusión	97
6. Consideraciones finales	102
6.1 Discusión general	103
6.2 Proyecciones	106
6.3 Publicaciones que se desprenden de esta tesis	107
7. Referencias bibliográficas	109

CAPÍTULO 1

Introducción general



Foto: Alex Wild

1.1 División de tareas en *Apis mellifera* L.

En todas las escalas biológicas, la variabilidad de los rasgos fenotípicos se considera beneficiosa para producir respuestas adaptativas en entornos fluctuantes (Kussell y Leibler, 2005), por lo que es fundamental entender y descifrar los mecanismos que generan y mantienen la variabilidad en los sistemas biológicos (Wolf *et al.*, 2015). En los animales que viven en grupos, la variabilidad entre individuos da lugar a la división del trabajo, fenómeno por el cual se desempeñan funciones distintas entre compañeros de grupo (Michener, 1974; Jeanne, 2016). Esta característica común de la vida social ha encontrado su máxima expresión en los insectos eusociales, como las termitas, la mayoría de las hormigas, varias especies de abejas y algunas especies de avispas, donde una casta fértil, la o las reinas, monopoliza la reproducción y es asistida por una casta de trabajadoras, esencialmente estériles, que se especializan en realizar distintas tareas según maduran en edad (Oster y Wilson, 1978). Esta correlación entre el comportamiento y la edad cronológica de la casta obrera se conoce como polietismo etario o temporal (Lindauer, 1952; Winston, 1987; West-Eberhard, 1987; 1996).

Las abejas corbiculadas de la familia Apidae (Hymenoptera) se dividen en cuatro tribus: Euglossini (abejas de orquídeas), Bombini (abejorros), Meliponini (abejas sin aguijón) y Apini (abejas de la miel), todas ellas pertenecientes a la subfamilia Apinae (Michener, 2000). La eusocialidad evolucionó dos veces en el grupo Apini + (Bombini + Meliponini), y la eusocialidad avanzada (el nivel más alto de organización social) evolucionó de manera independiente en los Meliponini y los Apini (da Silva, 2021). En las colonias de las abejas de la miel (Figura 1.1) *Apis mellifera* (Apidae, Apini) existe una casta reproductiva, la reina, que es asistida por una casta no reproductiva, las obreras (Wilson, 1971).

a



b



Figura 1.1. a) Abeja de la casta obrera y abeja reina realizando trophallaxis o contacto boca a boca.

Créditos: Alex Wild. b) Obreras de *Apis mellifera*.

1.1.1 Organización de la colonia

Después de emerger, las abejas obreras comienzan realizando tareas dentro del nido para luego realizar tareas fuera del mismo (Seeley, 1982). A los 3 días de edad adulta, además de atender a la reina, limpiar y sellar celdas y acicalar a sus compañeras de nido, las obreras

se desempeñan como nodrizas, alimentando y cuidando a la cría (huevos, larvas y pupas;

Figura 1.2).

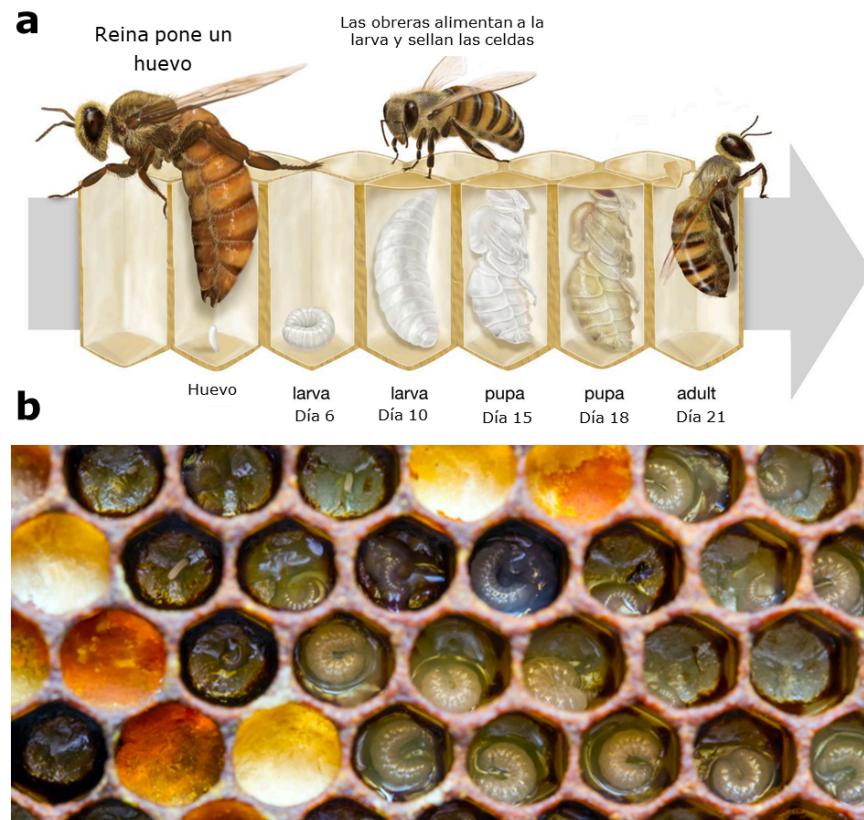


Figura 1.2. a) Ciclo de vida. Los huevos eclosionan en tres días y luego se desarrollan en larvas.

Todas las larvas son alimentadas con jalea real al principio, pero solo las futuras reinas continúan con esta dieta. Cuando están completamente desarrolladas, las larvas se transforman en pupas. Las reinas emergen en 16 días, las obreras en 21 días (en promedio), y los zánganos (machos) en 24 días (Enciclopedia Británica, 2024a). **b)** Huevos y larvas *A. mellifera* en distintos estadios de desarrollo dentro de sus celdas. Créditos: Alex Wild.

Las nodrizas digieren la mayoría del polen recolectado y lo usan para estimular la producción de la glándula hipofaringea que se encuentra en la cabeza, y que genera una jalea rica en proteína, fundamental para la nutrición de las larvas, la reina y el resto de obreras

(Wright *et al.*, 2018; Crailsheim, 1991; 1998; Nicholson, 2011). La transferencia de la jalea se realiza por medio de trofalaxia o contacto boca a boca (Figura 1.3), una interacción social que se da dentro del nido con el fin de propagar entre compañeras información cuantitativa y cualitativa relacionada al alimento (Goyret y Farina, 2005; Ramírez *et al.*, 2010), permitiéndoles monitorear el estado nutricional de la colmena.

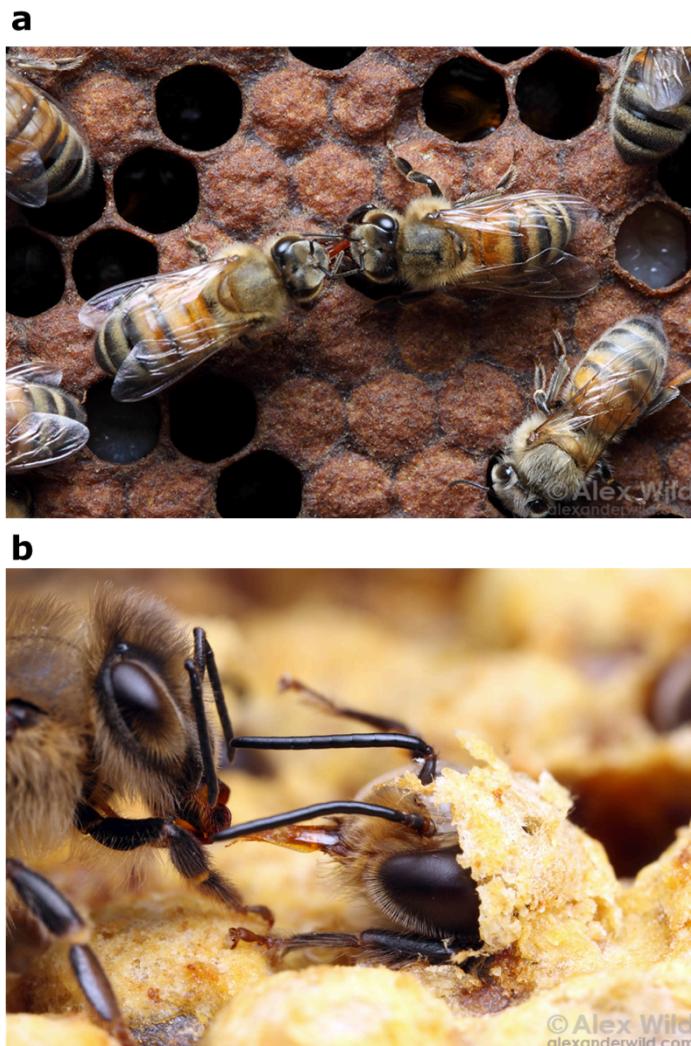


Figura 1.3. a) Abejas obreras realizando trofalaxia o contacto boca a boca. b) Abeja nodriza ofreciendo alimento líquido a un zángano (macho) recién emergido. Créditos: Alex Wild.

Alrededor de los 11 días de edad, las obreras se trasladan desde el centro del nido, en donde se encuentra la cría, hacia la periferia y comienzan a ocuparse principalmente del

procesamiento de alimentos (Figura 1.4). Allí, reciben el néctar que ingresan las recolectoras desde el exterior, lo procesan para transformarlo en miel y lo almacenan en las celdas de reserva de alimentos (Seeley, 1995). El polen que ingresa a la colmena es a su vez transformado en lo que se denomina pan de polen, un producto fácilmente digerible, que implica la adición de miel y secreciones glandulares ricas en azúcares (Herbert y Shimanuki, 1978; Carroll *et al.*, 2017).

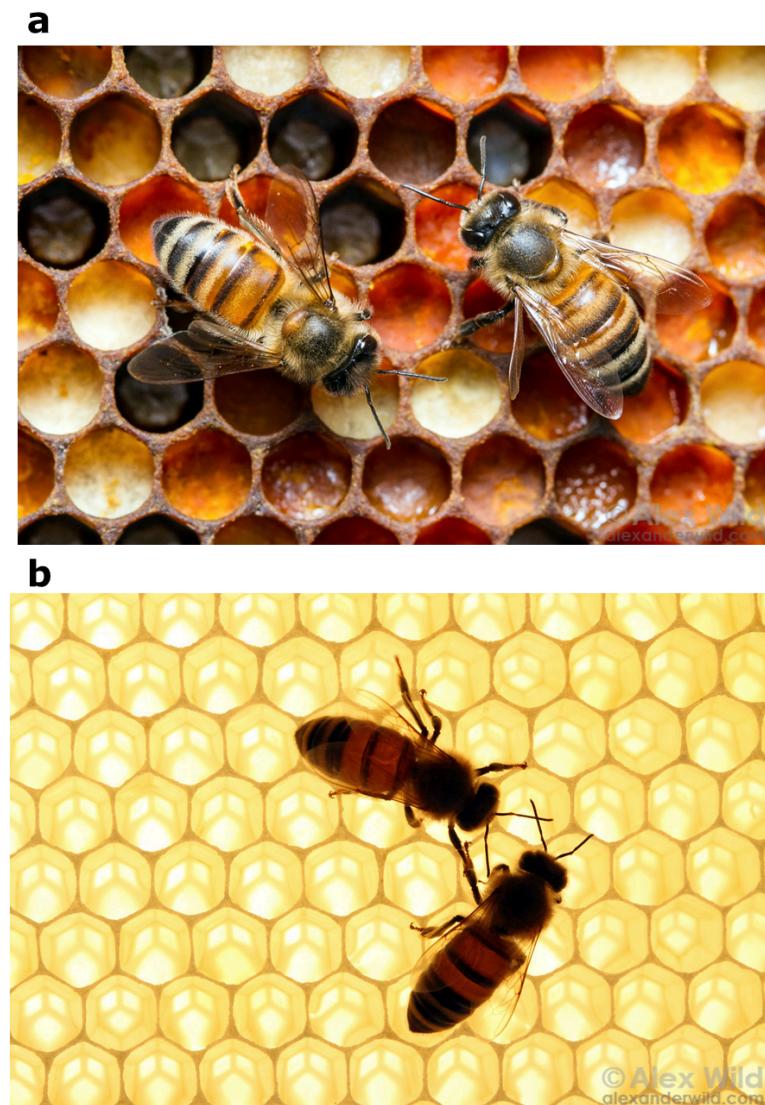


Figura 1.4. Abejas procesadoras de polen (**a**) y de néctar (**b**). Créditos: Alex Wild.

Aproximadamente a los 15 días de edad, las obreras participan en la defensa del nido y se comportan como guardianas o defensoras. Las abejas guardianas son obreras que patrullan la entrada de la colmena (Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003) e inspeccionan a todas las abejas que aterrizan en la entrada mediante anteneos (Breed *et al.*, 1992). Por otro lado, las defensoras o “picadoras”, responden ante una perturbación volando hacia el objetivo, persiguiéndolo y, a veces, picándolo (Breed *et al.*, 1990; Arechavaleta-Velasco y Hunt, 2003). A partir de los 17 días de edad aproximadamente, y hasta el final de su vida, las obreras se comportan como forrajeras (Figura 1.5), y se dedican a la búsqueda y recolección de recursos, como néctar, polen, agua o resinas fuera del nido (Lindauer, 1952; Seeley, 1982; 1995).

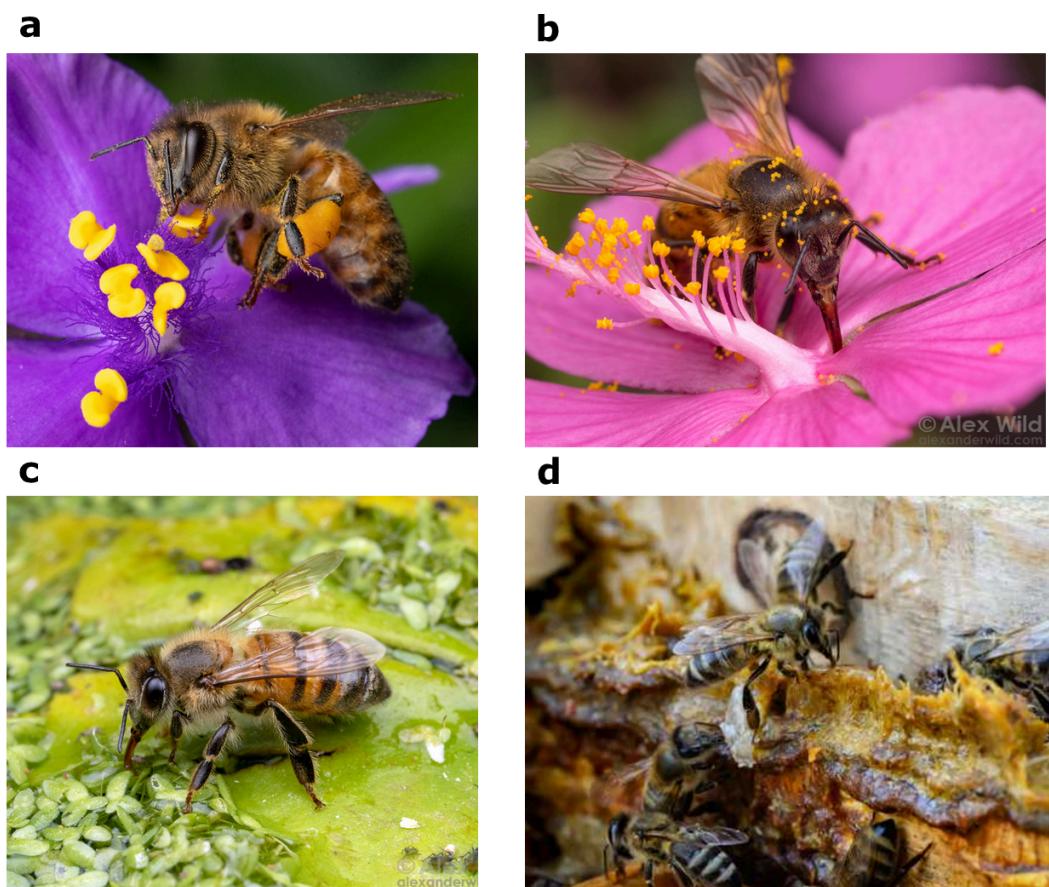


Figura 1.5. Abejas forrajeras de a) polen, b) néctar, c) agua. Créditos: Alex Wild, d) resinas. Créditos: BuzzAboutBees.Net.

En las colonias de *A. mellifera* es necesario mantener la coordinación de una serie de actividades y procesos de desarrollo, así como la comunicación entre sus miembros (Bortolotti y Costa, 2014). En este sentido, las feromonas, permiten la comunicación entre todas las castas de abejas (Winston, 1987). Las feromonas son sustancias químicas secretadas por las glándulas exocrinas y percibidas por otro individuo de la misma especie, induciendo una respuesta específica (Karlson y Lüscher, 1959). Están involucradas en casi todos los aspectos de la vida de la colonia de la abeja de la miel, incluyendo el cuidado cooperativo de la cría, la defensa del nido y la búsqueda de alimento en la casta obrera, así como en la dominancia reproductiva en la casta de la reina (Le Conte y Hefetz, 2008; Bortolotti y Costa, 2014). Las feromonas en las abejas de la miel a menudo se presentan como mezclas de múltiples componentes (Pankiw, 2004). Una de las más conocidas es la feromona producida por la cría, que permite que las larvas comuniquen su estado nutricional a las nodrizas y al resto de sus compañeras de nido. Las feromonas emitidas por las larvas en desarrollo cambian a medida que maduran en edad (Maisonnasse *et al.*, 2010; Maisonnasse *et al.*, 2009; Trouiller *et al.*, 1991). Las larvas jóvenes de la casta obrera, que requieren alimento rico en proteínas producido por las abejas nodrizas, emiten la feromona volátil (E)-β-ocimene (EBO) que estimula el comportamiento de recolección de polen (Pankiw *et al.*, 1998; Traynor *et al.*, 2015), mientras que larvas de más edad, alimentadas con dietas que tienen cuatro veces más contenido de azúcar y la mitad del contenido de proteínas (Kunert y Crailsheim, 1987), emiten predominantemente ésteres de ácidos grasos etílicos y metílicos no volátiles, conocidos colectivamente como feromona de éster de cría (BEP, por sus siglas en inglés) y cantidades menores de EBO (Trouiller *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 2016).

La transición de las tareas que se realizan dentro de la colmena a las que se realizan fuera, la recolección de recursos, está regulada tanto por factores intrínsecos como extrínsecos que producen cambios fisiológicos y comportamentales en las obreras (Robinson,

1992). Entre las principales influencias endógenas se encuentran la hormona juvenil (JH) y la vitelogénina (Vg). La JH promueve el envejecimiento (Flatt *et al.*, 2005) y media en el desarrollo, maduración y comportamiento social de las abejas melíferas (Amdam y Omholt, 2003; Rachinsky y Hartfelder, 1990). Por su lado la Vg es una proteína asociada con la reproducción que fue "co-optada" para otras funciones de la vida social (Amdam *et al.*, 2011). Es precursora de la yema de huevo, y sintetizada por los cuerpos grasos de los insectos, desde donde es secretada a la hemolinfa (Excels, 1974). Los niveles de Vg en los cuerpos grasos y en la hemolinfa cambian a medida que avanza el ciclo de vida de las obreras (Amdam *et al.*, 2011). Durante los meses del año en los que hay forrajeo, los niveles de Vg de las obreras se incrementan hasta encontrar su pico entre los 7-10 días de edad (nodrizas) (Amdam y Omholt, 2003), similar a los niveles de la fase de vitelogénesis en una hembra solitaria (Amdam *et al.*, 2004). Las abejas nodrizas utilizan la Vg para producir alimento para las larvas ya que provee aminoácidos y probablemente otros nutrientes necesarios para la producción de jalea por las glándulas hipofaríngeas (Amdam y Omholt, 2003). La JH y la Vg se regulan mutuamente (Amdam *et al.*, 2006; Amdam y Omholt, 2003). Amdam y Omholt (2003) propusieron el modelo del doble represor (DRH, por sus siglas en inglés; Figura 1.6), que propone que el inicio del forrajeo se desencadena cuando una disminución en la vitelogenina (que reduce la reserva de nutrientes y el mantenimiento somático) permite que la hormona juvenil aumente, fijando a la abeja en el estado de forrajera. En referencia a la 'doble' represión, el efecto de la Vg se suma a la evidencia de que el inicio del forrajeo está influenciado por una feromona represora de contacto. Esta feromona es producida por las recolectoras y actuaría inhibiendo las vías de señalización de la JH para reducir el reclutamiento de nodrizas a tareas de forrajeo (Leoncini, 2004). La regulación de la transición de tareas mediante la Vg confiere una ventaja adaptativa, al permitirle a la colonia retener a

las nodrizas saludables (ricas en nutrientes) en el nido, y asignar a las obreras con poca Vg (menos útiles para la crianza) a tareas de forrajeo (Amdam *et al.*, 2011).

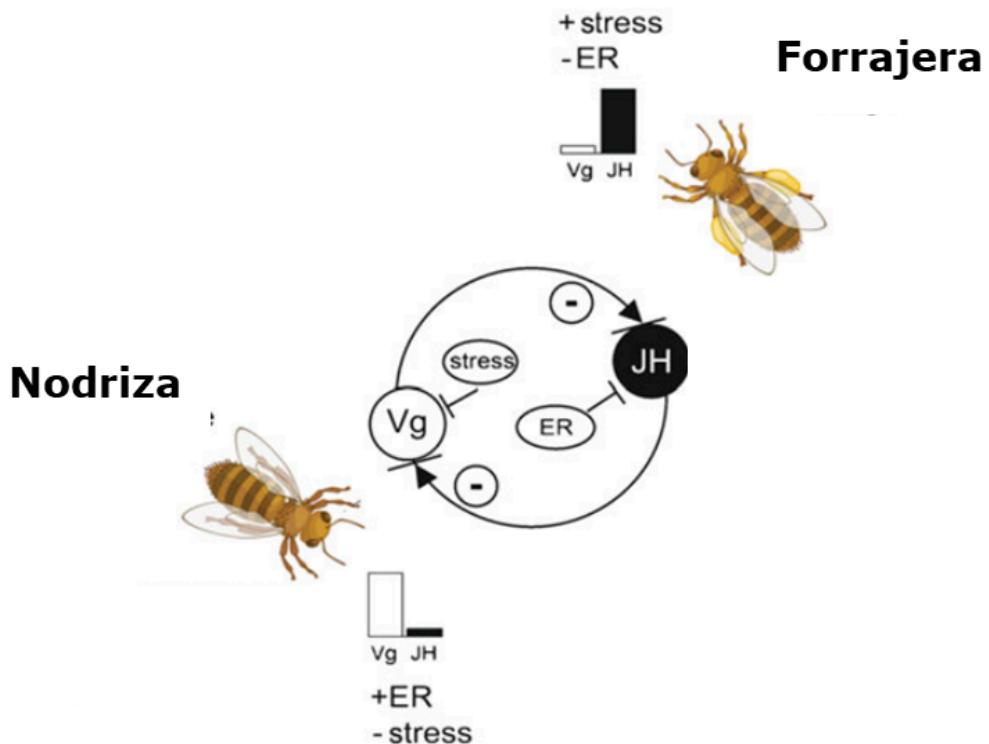


Figura 1.6. El modelo del doble represor (DRH). En las abejas nodrizas (izquierda), la vitelogenina (Vg, nivel indicado con barras blancas) y la presencia (+) de una feromona represora externa (ER) inhiben la producción de hormona juvenil (JH, nivel indicado con barras negras) y, en consecuencia, retarda el inicio de la actividad de forrajeo en ausencia de estrés nutricional. Si la señal de ER se reduce (-ER), las obreras con bajos niveles de Vg son más propensas a que sus niveles de JH aumenten y por lo tanto, a iniciar la recolección. A la vez, el estrés nutricional producido por falta de reservas en el nido reduce la Vg. La síntesis de Vg es suprimida por la JH, cerrando un ciclo de retroalimentación entre la Vg y la JH que fija a la obrera en el estado de forrajera (derecha).

Modificado de Amdam *et al.*, 2011.

1.2 Recolección de recursos florales

La búsqueda, recolección y procesamiento de alimentos son tareas altamente coordinadas que precisan de la transferencia de información entre los miembros de la colonia para que resulten eficientes. Los principales recursos que desencadenan el comportamiento de forrajeo en abejas de la miel son el polen y el néctar (Seeley, 1995), y aunque ambos recursos están generalmente disponibles al mismo tiempo en las plantas con flor (Free, 1969), las abejas forrajeras se especializan en recolectar un recurso u otro.

1.2.1 Polen y néctar

El polen es considerado la recompensa ancestral de las angiospermas (Crepet, 1979; Pettitt y Beck, 1967). Además de representar la única fuente de proteína para las colonias de abejas, también puede contener lípidos, vitaminas y minerales (Baker y Baker, 1975). Su composición puede diferir fuertemente según su origen botánico (Manning, 2001; Somerville y Nicol, 2006) e incluso puede presentar compuestos tóxicos, fago-estimulantes (Detzel y Wink, 1993; Kevan y Ebert, 2005; de Mesquita *et al.*, 2010) y/o compuestos que alteran la digestión (Schmidt *et al.*, 1985). A la hora de considerar los mecanismos que utilizarían las recolectoras para evaluar el polen hay que tener en cuenta que la mayoría de los nutrientes están alojados en el interior del grano, a los que solo se puede acceder luego de la digestión parcial o total del polen (Wilmsen, 2017). En este sentido el “pollenkit”, la capa más externa que recubre al grano de polen, podría proporcionar información sobre los constituyentes del polen, ya que en algunos casos su composición es similar a la de la fracción interna (Dobson, 1988). El polen presenta sus claves visuales, gustativas y olfativas en el “pollenkit” que está compuesto principalmente por lípidos saturados e insaturados (Dobson, 1988), carotenoides (Hesse, 1993; Lunau, 1995), flavonoides (Wiermann y Gubatz, 1992), proteínas e hidratos de

carbono (Weber, 1996). Las claves sensoriales presentes en el “pollenkit” facilitan la discriminación entre pólenes de distintas especies (Dobson y Bergström 2000; Cook *et al.*, 2005; Ruedenauer *et al.*, 2018).

Se sugiere que el néctar se origina a partir de exudados azucarados como subproductos de la necesidad de las plantas de excretar los niveles excesivos de solutos que se acumulan en las flores (De la Barrera y Nobel, 2004). Esta innovación evolutiva fue extremadamente exitosa, ya que hoy en día el néctar representa la recompensa floral más común (Simpson y Neff, 1983). El néctar es una mezcla de azúcares y representa la principal fuente de hidratos de carbono para adultos y larvas (Baker y Baker, 1975). El néctar es una solución compleja (Baker y Baker, 1983) que incluye azúcares, principalmente sacarosa, glucosa y fructosa (Beutler, 1935; Seeley, 1995), aminoácidos (Gardener y Gillman, 2001), volátiles y olores (Raguso, 2004), sales (Hiebert y Calder, 1983), vitaminas (Baker y Baker, 1983), carotenos (Rodriguez-Arce y Díaz, 1992), lípidos (Vogel, 1971) y también puede contener toxinas (Adler, 2000; Nicolson *et al.*, 2007; Wright, 2009). Las abejas prefieren a la sacarosa sobre el resto de azúcares del néctar (Barker and Lehner, 1974). La sacarosa no solo juega un rol en la nutrición sino que también actúa como recompensa para las forrajeras durante el aprendizaje de las características de las fuentes florales e influye en las decisiones relacionadas a la recolección (Scheiner *et al.*, 2004).

1.2.2 Especialización de tareas entre abejas forrajeras

La división de tareas entre las abejas forrajeras es uno de los aspectos más destacados del comportamiento social de las abejas de la miel. Basándose en la hipótesis del plan ovárico (West-Eberhard, 1987; 1996), la que propone que el ciclo ovárico de las hembras en insectos solitarios podría explicar el origen de la socialidad, se ha propuesto recientemente la hipótesis

del plan reproductivo o RGPH por sus siglas en inglés refiriéndose a “reproductive ground plan hypothesis” (Amdam *et al.*, 2004; 2006). La RGPH plantea que las respuestas sensoriales, el comportamiento alimentario y los ciclos reproductivos de las hembras están co-regulados a través de vías endocrinas conservadas que estaban presentes en ancestros solitarios, facilitando así la división avanzada del trabajo entre obreras con diferentes preferencias de forrajeo en especies eusociales. Altos niveles de vitelogenina están asociados con el forrajeo de polen en las abejas obreras, que, al igual que las hembras solitarias que atraviesan la fase de vitelogénesis, recolectan polen para almacenarlo en el nido (Figura 1.7). Este enfoque considera la relación entre la Vg y la preferencia de las forrajeras por recolectar polen como una 'huella' de las relaciones de rasgos ancestrales (Amdam *et al.*, 2004; Amdam *et al.*, 2011).

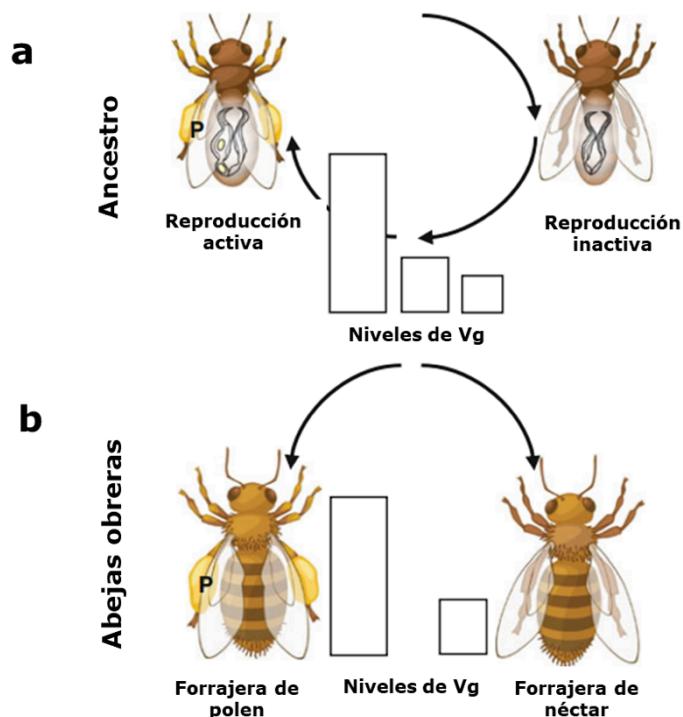


Figura 1.7. La hipótesis del plan reproductivo (RGPH) describe cómo la biología reproductiva de las hembras podría haber sido aprovechada en la especialización de tareas entre las abejas obreras

forrajeras. **a)** En los ancestros de las abejas de la miel, la progresión secuencial del ciclo reproductivo de las hembras está vinculada a cambios en los comportamientos relacionados a la alimentación. Durante los períodos sin reproducción activa, el ovario no estaba desarrollado (sin el ensanchamiento por la acumulación de yema) y el nivel de Vg (barras blancas) es bajo. Durante la reproducción, la expresión del gen *vg* aumentaba antes de la formación de la yema, y el polen es necesario para la provisión del nido. **b)** La Vg y el comportamiento de forrajeo están asociados de manera similar en las obreras de la abeja social, donde el pico del nivel de Vg tiene una influencia aparentemente directa en la recolección de polen. Modificado de Amdam *et al.*, 2011.

1.2.3 Diferencias en la sensibilidad a los estímulos

Se han propuesto diferentes modelos para explicar el origen de la división del trabajo de los insectos sociales (Beshers y Fewell, 2001). Según los modelos de umbrales de respuesta, las obreras difieren en su sensibilidad a los estímulos asociados a tareas específicas, lo que conduce al surgimiento de la división de tareas (Robinson, 1987). Esto significa que la probabilidad de que un individuo se comprometa a realizar una tarea específica está relacionada con las diferencias individuales en sus umbrales de respuesta (sensibilidad) a los estímulos asociados con esa tarea (Robinson y Page, 1989; Beshers y Fewell, 2001). Los individuos con un umbral de respuesta relativamente bajo para una tarea dada tienden a responder a intensidades de estímulo más bajas, mientras que los individuos con umbrales más altos, comienzan a responder a intensidades de estímulo más altas (Bonabeau *et al.*, 1996). Al responder a un estímulo con el comportamiento correspondiente, las obreras reducirán la intensidad del estímulo y, por lo tanto, reducen la probabilidad de que esta tarea sea desempeñada por compañeras de nido con umbrales más altos (Calabi, 1988; Camazine *et al.*, 2001). La variabilidad entre individuos es un componente clave de la división del trabajo e impacta directamente en las respuestas a nivel colectivo. Teóricamente,

en ausencia de variabilidad, las obreras podrían desempeñar la misma tarea simultáneamente mientras que desatienden otras, disminuyendo así la eficiencia del grupo (Jeanson, 2019).

El comportamiento higiénico de las colonias de abejas de la miel es un claro ejemplo para entender cómo las diferencias en la sensibilidad a los olores relacionados con las larvas enfermas o muertas permite la coordinación de las tareas de limpieza del nido. Las abejas obreras de *A. mellifera* poseen la capacidad de detectar, destapar y eliminar crías infectadas o parasitadas. En colonias seleccionadas genéticamente consideradas 'higiénicas', tales respuestas requieren menos tiempo que en las colonias 'no higiénicas' (Gramacho y Spivak, 2003; Spivak *et al.*, 2003). Esta mejora en el comportamiento higiénico se correlaciona positivamente con una mayor sensibilidad para detectar y responder a los olores anormales de la cría. Esto sugiere que las obreras más sensibles de una colonia serán las primeras en responder a las claves olfativas de las larvas o de las pupas afectadas, removiéndolas de sus celdas y contribuyendo a la limpieza de la colmena (Gramacho y Spivak, 2003; Spivak *et al.*, 2003).

Estudios en el comportamiento de defensa también proveen resultados que concuerdan con las predicciones del modelo de umbrales de respuesta. Cuando la entrada de la colmena es perturbada, las abejas de más edad son las primeras en mostrar comportamientos de defensa como la extensión del aguijón, siendo las abejas más jóvenes las que responden menos (Breed *et al.*, 1992). Esta respuesta comportamental se correlaciona con el incremento de la sensibilidad olfativa en abejas maduras ante la feromona de alarma (Robinson, 1987), una señal química que desencadena el comportamiento de defensa (Boch *et al.*, 1962) al disminuir el umbral de respuesta de picadura por el aumento de los niveles de serotonina y dopamina en el cerebro (Nouvian *et al.*, 2018). Sin embargo, Roussel y colaboradores (2009) observaron que las abejas guardianas son menos sensibles a una

descarga eléctrica en comparación con las abejas forrajeras, ya que responden extendiendo el aguijón solo a los voltajes altos, resultados que no coinciden con la predicción del modelo de umbrales. Esta baja sensibilidad de las guardianas a estímulos nocivos, sin embargo, podría ser adaptativa, si consideramos que las respuestas de defensa son costosas para la colonia y no deberían ser desencadenadas por agresiones de baja intensidad, sino más bien por situaciones riesgosas para el nido (Roussel *et al.*, 2009).

El ejemplo probablemente más estudiado en el que se evalúa la variación en las diferencias en la sensibilidad gustativa, específicamente a la sacarosa, y su influencia en el comportamiento es la especialización en la recolección de recursos entre forrajeras que recolectan polen y forrajeras que recolectan néctar (Page y Fondrk, 1995; Page *et al.*, 1998; Page *et al.*, 2006). La sensibilidad a la sacarosa tiene una base genética y se ve afectada por las condiciones ambientales y el estado interno de la abeja, ya que varía con la edad, casta, sexo, experiencia en la recolección, estado de saciedad (Page y Fondrk, 1998) estación del año (Scheiner *et al.*, 2003), estrés (manipulación), y exposición a feromonas (Pankiw y Page, 2003; Baracchi *et al.*, 2017, Baracchi *et al.*, 2020). Puede estimarse evaluando la concentración de solución de sacarosa más baja, que al contacto con las antenas (Minnich, 1932; Marshall, 1935; Kuwabara, 1957; Takeda, 1961; Page *et al.*, 1998; Pankiw y Page, 1999) tarsos o piezas bucales (Frings y Frings, 1949), desencadene el reflejo de extensión de la probóscide (REP; Kuwabara, 1957), una respuesta directamente relacionada con la ingesta de alimento líquido. Los umbrales de respuesta a la sacarosa (URAs) han sido ampliamente usados para estudiar la fisiología y el comportamiento de la abeja y son una ventana para comprender su percepción de azúcares (Pankiw y Page, 2001).

En el laboratorio, utilizando la REP como variable respuesta, estudios pioneros midieron los URAs de abejas recolectoras de polen y de néctar que llegaban a la colmena, al

final del evento de forrajeo. Los resultados de la investigación muestran que las abejas recolectoras de polen son más sensibles a la sacarosa, es decir que responden a una amplia gama de concentraciones, en comparación a las recolectoras de néctar (Page *et al.*, 1998). Estos resultados van en contra de la predicción del modelo de umbrales, a partir del cual se esperaría que las abejas especializadas en la recolección de néctar sean más sensibles a los azúcares. Estos hallazgos se interpretaron como adaptativos para la colmena, argumentando que estas diferencias permitirían que las recolectoras de néctar puedan enfocarse en recolectar de las fuentes energéticamente más productivas, por ejemplo que ofrecen néctar con altas concentraciones de azúcar. Sin embargo, estas diferencias en la sensibilidad no explican completamente por qué las recolectoras altamente sensibles a la sacarosa tienden a recolectar polen.

Los estudios sobre la sensibilidad a la sacarosa han llevado a la idea general de que una alta sensibilidad para una modalidad está correlacionada con una alta sensibilidad para otras modalidades (Page *et al.*, 2006). En algunos casos, la sensibilidad a la sacarosa se correlaciona con la sensibilidad a otros estímulos, como la luz (Erber *et al.*, 2006), olores o estímulos gustativos como los disponibles en el polen (Scheiner *et al.*, 2004). Una alta sensibilidad de las forrajeras de polen a una amplia gama de estímulos o claves relacionadas al polen podría explicar por qué las forrajeras de polen son más sensibles a la sacarosa que las forrajeras de néctar (Humphries *et al.*, 2005). Sin embargo, la idea de que las abejas sensibles a estímulos de una modalidad sensorial presentan una alta sensibilidad a todos los demás estímulos, incluidos los que pertenecen a otras modalidades sensoriales, podría implicar una división del trabajo subóptima (Roussel *et al.*, 2009). Roussel y colaboradores (2009) observaron que las abejas forrajeras aprendieron mejor que las guardianas durante un condicionamiento aversivo. Estos resultados indican que las abejas que presentan alta

sensibilidad a la sacarosa no presentan alta sensibilidad a los estímulos en todas las modalidades sensoriales o contextos comportamentales, desestimando la idea de que la sensibilidad es una característica general del individuo e independiente de la naturaleza del estímulo evaluado.

1.2.4 La visita de forrajeo

Las abejas recolectan néctar, polen, agua y resinas del ambiente que las rodea (Seeley, 1995). Para ello, pueden recorrer largas distancias, tanto en paisajes agrícolas como en entornos naturales (Winston, 1987; Seeley, 1995). Cada viaje de forrajeo implica visitar cientos de flores para recolectar unos pocos microlitros de néctar o unos pocos microgramos de polen antes de regresar a la colmena para descargar el recurso y luego partir nuevamente en otro viaje. Antes de dejar la colmena para iniciar otra visita de recolección, las forrajeras reciben néctar de sus compañeras de nido a través de trofalaxia, interacciones boca a boca a través de las cuales comparten el alimento (Beutler, 1950; von Frisch, 1967).

La concentración y volumen de azúcar en el buche o estómago de miel (Figura 1.8) depende de la distancia con la fuente y del tipo de forrajera (Harano *et al.*, 2013; Harano *et al.*, 2014; Harano *et al.*, 2016). El néctar actúa a manera de “combustible”, se almacena en el buche y se envía gradualmente al intestino medio, donde se absorben los azúcares para generar la energía necesaria para el vuelo (Blatt y Roces, 2001). Al final de la visita de recolección, una vez en la colmena, las recolectoras de néctar descargan el néctar recolectado de las flores a sus compañeras de nido mediante trofalaxia en la entrada de la colmena (von Frisch, 1965), mientras que las forrajeras de polen descargan el polen recolectado por cuenta propia en celdas cercanas a donde se aloja la cría (Camazine, 1993). Las forrajeras no ingieren el polen fresco en la fuente ya que no son capaces de digerirlo (Moritz y Crailsheim,

1987), sino que lo mezclan con el néctar que cargaron en el nido (Thorp, 1979) para convertirlo en “pellets” que serán transportados en las corbículas (Figura 1.7), estructuras externas ubicadas en las patas traseras (Thorp, 1979; 2000; Michener, 2007).

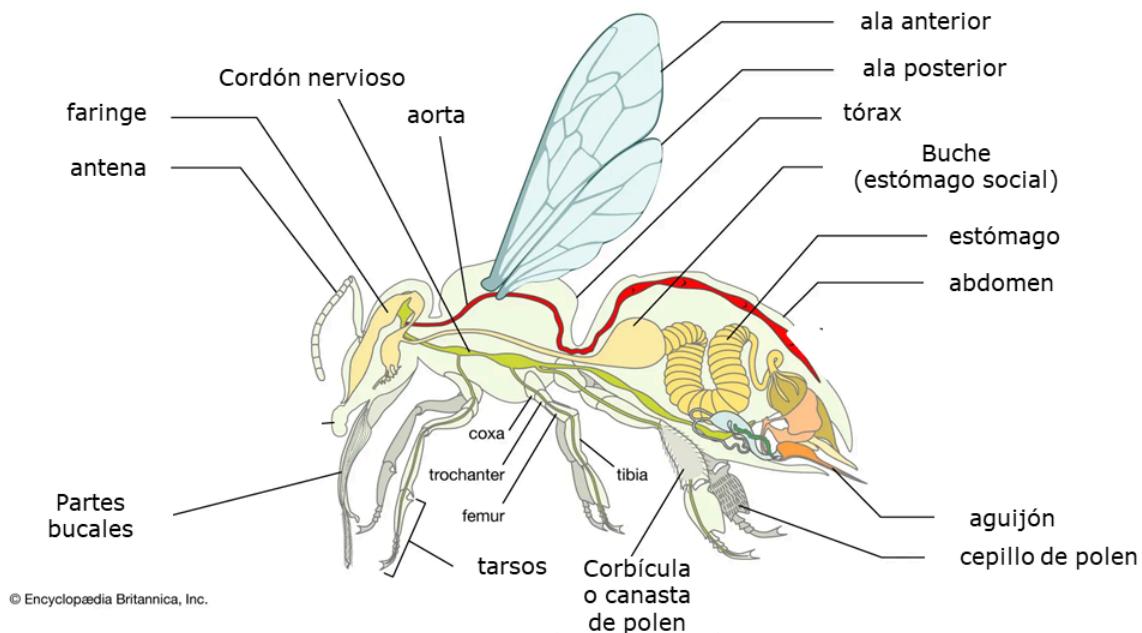


Figura 1.8. Anatomía de la abeja de la miel (Encyclopedia Británica, 2024b).

1.3 PERCEPCIÓN SENSORIAL

Los insectos utilizan órganos quimiosensoriales o quimiorreceptores ubicados en las antenas, partes bucales, alas, patas y ovopositores para adquirir información sobre su entorno (Paoli y Galizia, 2021).

1.3.1 Sistema olfativo

En los insectos, el sentido del olfato participa en diversas actividades cotidianas como la búsqueda y exploración de alimento, pareja y sitios para la oviposición, la detección de posibles peligros, así como en sus interacciones sociales (Sandoz, 2011). El sistema olfativo

de los insectos está altamente desarrollado y presenta una complejidad similar a la observada en los mamíferos (Hildebrand y Shepherd, 1997). Para evitar confusiones terminológicas, utilice los términos "odorante" o "aroma" para referirme a cualquier sustancia volátil que pueda ser percibida por el insecto, ya sea una mezcla o no, y "olor" para referirme a la entidad psicofísica creada en su cerebro (Paoli y Galizia, 2021).

Los receptores olfativos en los insectos se encuentran dentro de estructuras sensoriales llamadas sensilias olfativas, las que a su vez contienen neuronas receptoras olfativas (NROs) que expresan receptores olfativos (ROs) (Hallem *et al.*, 2006; Benton *et al.*, 2009). Las sensilias se clasifican según su morfología, y en las abejas de la miel, las sensilias antenales relacionadas con el olfato son predominantemente de tipo placoideas, chaeticas, basicónicas y tricoideas, siendo las placoideas las más relevantes para la función olfativa (Galizia, 2014; Paoli y Galizia, 2021; Figura 1.9).

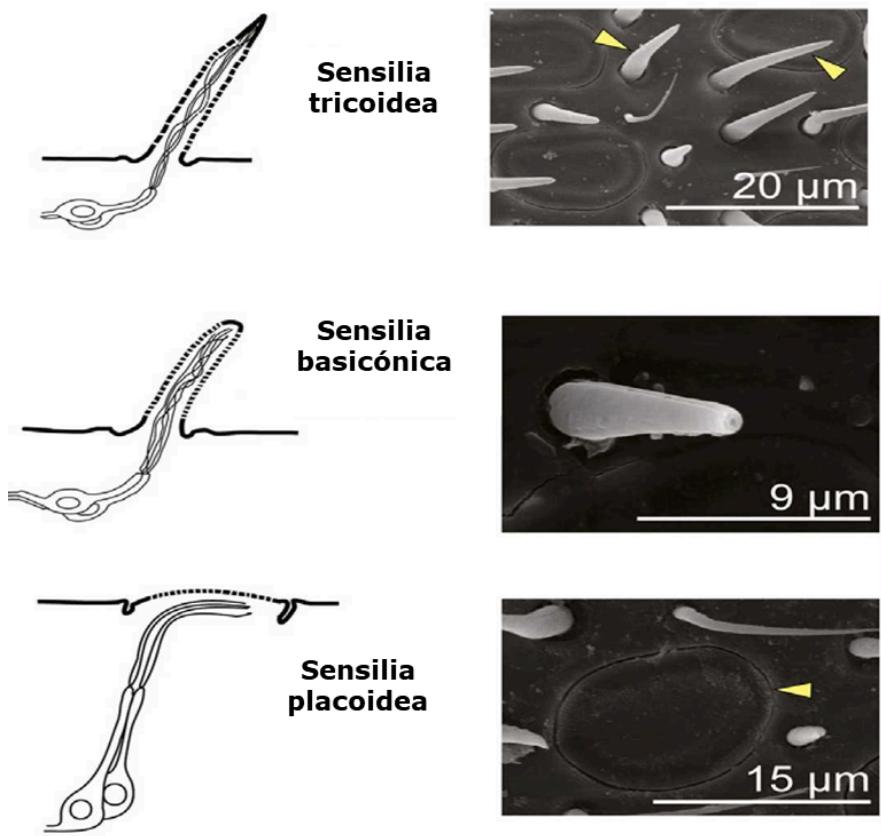


Figura 1.9. Dibujo esquemático e imágenes de microscopio electrónico de barrido de la superficie del extremo distal de la antena de la abeja *A. mellifera* mostrando sensilias antenales relacionadas con el olfato. Modificado de Ramirez *et al.*, 2023.

Los olores consisten en moléculas volátiles que son transportadas a través del aire (Mafra-Neto y Cardé, 1994). Estas moléculas llegan a las dendritas de las NROs después de difundir a través de la hemolinfa y alcanzar la membrana dendrítica. La hemolinfa evita que los terminales dendríticos de las NROs se sequen y contiene proteínas de unión a odorantes (PUO), proteínas quimio sensoriales (PQS) y enzimas degradadoras de odorantes (EDO) (Forêt y Maleszka, 2006; Iovinella *et al.*, 2018; ver Paoli y Galizia, 2021). Es probable que las PUO estén implicadas en facilitar la transición de los odorantes desde un medio gaseoso a uno líquido y en transportarlos hacia los receptores olfativos (Gomez-Diaz *et al.*, 2013; Leal, 2013). Las PQS cumplen un rol similar a las PUO en el transporte de estímulos químicos a través de mecanismos poco entendidos, y aunque estas proteínas se encuentran concentradas

en las sensillas antenales también se expresan en tejidos no relacionados con el olfato (Calvello *et al.*, 2005; Forêt *et al.*, 2007). Por otro lado, las EDO podrían desempeñar un papel en la degradación de los odorantes, lo que contribuiría a la terminación de la señal al limitar el tiempo de permanencia de los odorantes en el medio líquido y prevenir la saturación de los receptores olfativos (Iovinella *et al.*, 2018; Leal, 2013; Vogt *et al.*, 1985; ver Paoli y Galizia, 2021). La codificación olfativa comienza con la interacción entre un odorante y el sitio de unión de un receptor olfativo, lo que genera señales eléctricas (potenciales de acción) que se envían a lo largo de los axones hacia el cerebro (Paoli y Galizia, 2021). Los axones de las NROs convergen en el lóbulo antenal (LA), el primer centro de procesamiento del circuito olfativo en los insectos (Esslen y Kaissling, 1976; Galizia *et al.*, 1999; Robertson y Wanner, 2006). Desde el LA, la información olfativa se proyecta hacia regiones superiores del cerebro, como los cuerpos pedunculados (MBs por sus siglas en inglés, refiriéndose a mushroom bodies) y el protocerebro lateral (PL) (Galizia, 2014; Figura 1.10). En los MBs converge información proveniente de diversas modalidades sensoriales, incluyendo la olfativa, la visual y la táctil. Se ha demostrado que este centro de procesamiento está asociado con el aprendizaje olfativo y la formación de memorias olfativas (Erber *et al.*, 1980; Hammer y Menzel, 1995).

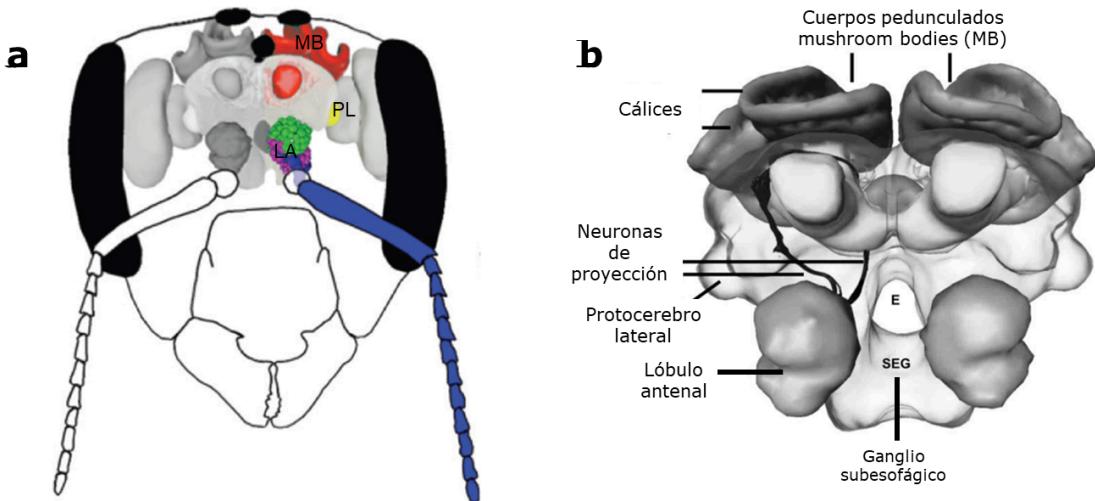


Figura 1.10. a) Esquema general del sistema olfativo de la abeja de la miel. Se muestra la antena (azul), el lóbulo antenal (verde y violeta), protocerebro lateral (amarillo) y los cuerpos pedunculados o MB (rojo). Cada MB consta de dos subunidades, los cálices. Modificado de Galizia y Rössler, 2010.
 b) Reconstrucción tridimensional del cerebro de *A. mellifera*. Modificado de Brito Sánchez, 2011.

1.3.2 Sistema gustativo

Por su lado, el sentido del gusto también es muy importante en la biología de los insectos, dado que les permite evaluar su alimento. En particular, el gusto permite a las abejas de la miel diferenciar entre sustancias neutras o aversivas y recursos alimenticios, tales como néctar y polen (de Brito Sánchez, 2011). Al recolectar recursos, 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 el gusto sea crucial para una abeja recolectora que debe explotar una fuente de alimento. En *A. mellifera*, las antenas, partes bucales y los segmentos distales (tarsos; Figura 1.8) del primer par de patas son las principales estructuras involucradas en la detección periférica del sabor y presentan sensilias con receptores gustativos (Whitehead y Larsen, 1976a; de Brito Sánchez, 2011). Las sensilias

gustativas son de tipo caéticas o basicónicas, y presentan un único poro en su ápice. Alojan de 3 a 5 neuronas receptoras gustativas, bañadas en hemolinfa en una cavidad definida por células sensoriales auxiliares, cuyas dendritas se proyectan hacia el ápice del pelo cuticular. En la mayoría de los casos, una célula mecanorreceptora está unida a la pared basal del pelo. Los sabores penetran en la sensilia a través del poro en el ápice. En la mayoría de los casos, la sensilia además aloja en su base un mecanorreceptor (Whitehead y Larsen, 1976a; Figura 1.11). La señal gustativa que allí se genera es transmitida a través de los axones de las neuronas hasta al sistema nervioso central para comenzar a ser procesado en la zona sub-esofágica, donde se encuentra el ganglio subesofágico (Fig 1.10), una región del cerebro relacionada con la entrada gustativa y también controla las salidas motoras de las partes bucales (de Brito Sánchez *et al.*, 2007).

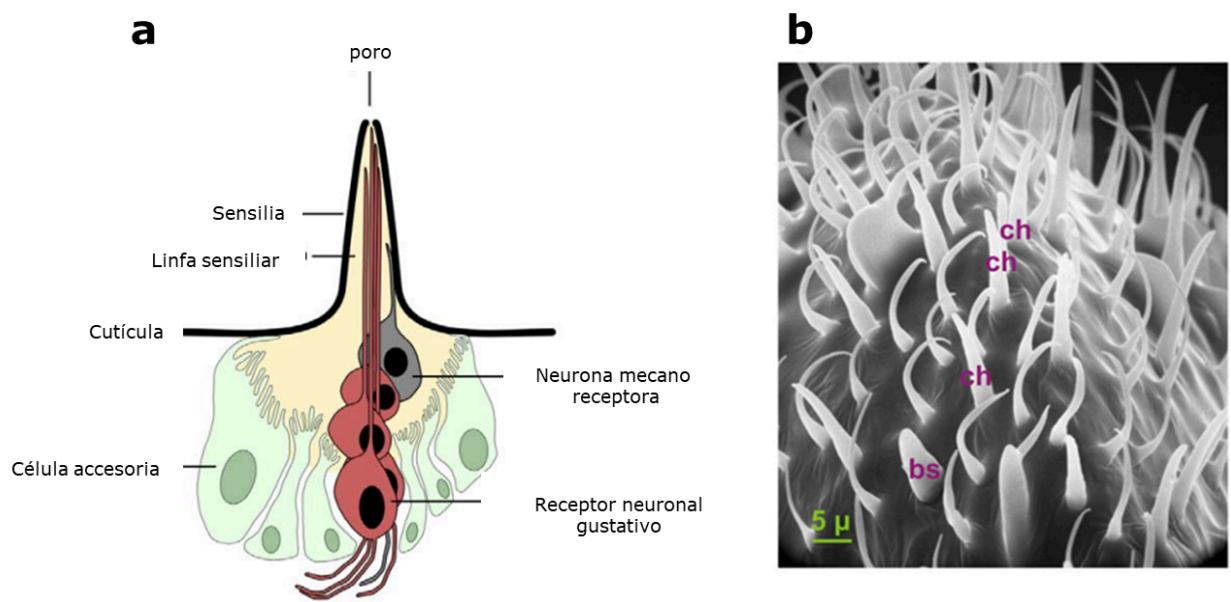


Figura 1.11. a) Dibujo esquemático de una sensilia caética. Modificado de Bestea *et al.*, 2021 b) Imagen de microscopio electrónico de barrido de la superficie del extremo distal de la antena de *A. mellifera* mostrando sensilas caéticas (ch) y basicónicas (bs). Modificado de de Brito Sánchez, 2011.

Estudios electrofisiológicos y comportamentales en antenas (de Brito *et al.*, 2005) y tarsos (de Brito Sánchez *et al.*, 2014) confirman que los receptores gustativos en estas estructuras presentan respuestas limitadas ante la estimulación con sustancias amargas. En contraste, los receptores gustativos que perciben sustancias dulces como la fructosa, sacarosa y glucosa son altamente sensibles en las antenas (de Brito Sánchez *et al.*, 2008), incluso más que los receptores ubicados en la probóscide y los tarsos (Whitehead y Larsen 1976b; de Brito Sánchez *et al.*, 2008). Esto destaca el rol fundamental que tienen las antenas como órganos gustativos al momento de evaluar una potencial fuente de alimento. Por otro lado, las células receptoras gustativas en los tarsos son altamente sensibles a soluciones salinas, como NaCl y KCl, (de Brito Sánchez *et al.*, 2014) y poseen células sensibles al agua (Di Lorenzo, 2009). Esta diferencia en la disposición de receptores en el cuerpo se puede deber a la evaluación previa al comportamiento de recolección: en el caso de la recolección de agua, las superficies son planas y el contacto se da directamente en los tarsos, mientras que la sacarosa, que se encuentra en los nectarios de las flores, requiere evaluación por parte de las antenas (de Brito Sánchez *et al.*, 2014). En el caso de las partes bucales, estas poseen un tipo de receptor adicional, cuya sensibilidad es desconocida, sin embargo, en otros insectos se postula que podría responder a proteínas (Dethier, 1961) o aminoácidos (Shiraishi y Kuwabara, 1970).

1.4 Aprendizaje y memoria en abejas

Se conoce como aprendizaje al cambio comportamental en un animal debido a cierta experiencia, lo que le permite reducir la incertidumbre acerca de su ambiente y le da la posibilidad de anticipar eventos relevantes, así como de filtrar aquellos que no lo son (Rescorla y Wagner, 1972; Giurfa, 2007; Mackintosh, 2013). El aprendizaje conlleva a la

formación de memorias, cuya adquisición y retención dependen de las necesidades individuales de cada animal y su entorno (Menzel, 1999). Dada la complejidad de los entornos naturales, los animales necesitan integrar múltiples modalidades sensoriales para formar memorias que les permitan predecir eventos importantes (Mackintosh, 1994). En la naturaleza, las abejas forrajeras aprenden las claves y características de las fuentes de alimento, como olores, colores, texturas y patrones, lo que les facilita la búsqueda al orientar su comportamiento hacia los recursos conocidos (von Frisch, 1967). El comportamiento recolector de la abeja se basa en dos tipos principales de aprendizaje: el asociativo y el no asociativo.

1.4.1 Aprendizaje asociativo

Las abejas asocian las claves sensoriales como olores, colores y otras características de las fuentes de alimento con las recompensas de néctar y polen. Estos eventos de asociaciones conducen a la formación de memorias que impactan en su orientación (Chaffiol *et al.*, 2005), respuesta de aterrizaje (Free, 1969; Arenas *et al.*, 2007; Arenas y Farina, 2008) e incluso desencadenan respuestas estereotipadas y discretas como la extensión de la probóscide (Takeda, 1961). Las claves olfativas de las flores que visitan las abejas forrajeras juegan un papel muy importante durante la recolección, ya que tras ser aprendidas, les permite orientarse y encontrar el recurso con mayor facilidad en los próximos vuelos de forrajeo (von Frisch, 1923; Seeley, 1995).

En el laboratorio, se ha estudiado el aprendizaje asociativo en el contexto comportamental utilizando distintos paradigmas. En particular, el condicionamiento clásico o pavloviano se basa en darle valor predictivo a un estímulo considerado previamente neutro. En este tipo de condicionamiento, los animales asocian el estímulo condicionado o EC (que

puede ser del tipo auditivo, visual, olfativo, entre otras modalidades) con un estímulo incondicionado o EI (que genera una respuesta de manera innata o refleja) (Pavlov, 1927). La abeja de la miel asocia el estímulo condicionado, por ejemplo, un aroma floral, que por sí solo no produce respuesta alguna, con el estímulo incondicionado, por ejemplo, solución azucarada, que al contacto con las antenas produce la respuesta de extensión de la probóscide (REP). Así, cuando se presenta el aroma sola, la abeja responde extendiendo la probóscide, anticipando la recompensa. Este proceso de asociación se conoce como condicionamiento clásico olfativo (Figura 1.12).



Figura 1.12. Condicionamiento olfativo clásico. Tomado de Bestea *et al.*, 2021.

El aprendizaje con azúcares se puede explicar a partir de la excitación que genera una recompensa energética. La vía que codifica la recompensa de azúcar involucra una única neurona octopaminérgica conocida como “VUMmx1” (neurona media ventral impar del neurómero maxilar 1). Esta neurona se proyecta desde el ganglio subesofágico, donde recibe entradas gustativas de los receptores de sacarosa, y converge con la vía de procesamiento olfativo a nivel del lóbulo antenal, primer centro de relevamiento de estímulos olfativos, pero también a nivel del protocerebro lateral y los cuerpos pedunculados o MB (ver Giurfa, 2007; Figura 1.13). Si bien no descartamos que la VUMmx1 esté involucrada en el procesamiento del polen, cabe la posibilidad de que ambos recursos sean procesadas por vías diferentes.

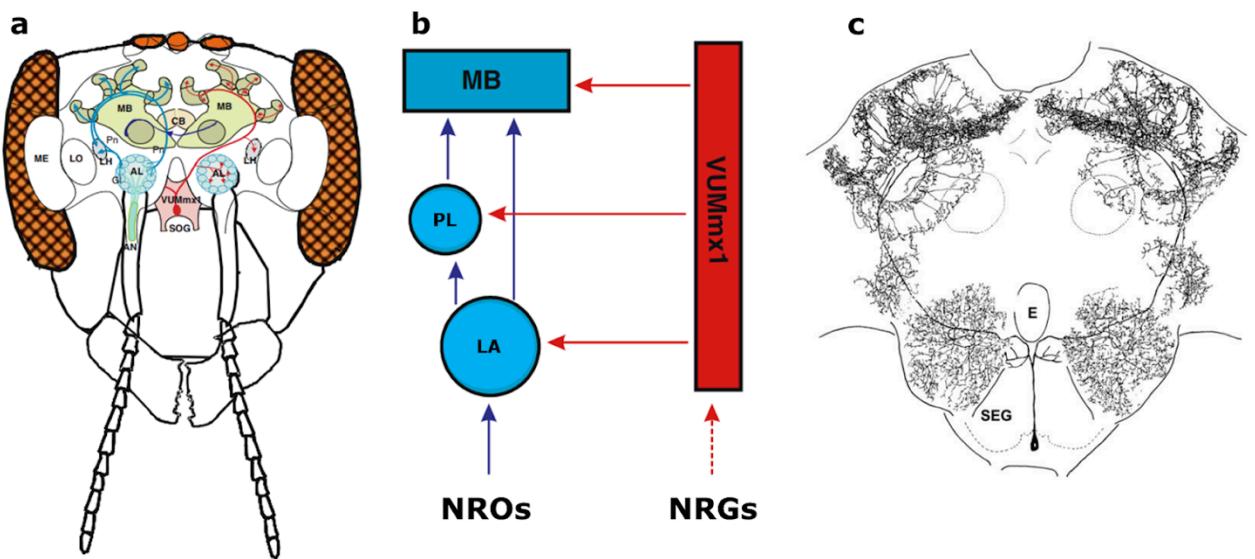


Figura 1.13 a) Esquema de una vista frontal del cerebro de la abeja que muestra las vías centrales olfativas (en azul a la izquierda) y gustativas (en rojo a la derecha). b) Esquema de la localización y distribución de las vías olfativa y gustativa. Las neuronas receptoras olfativas (NROs) envían información al cerebro a través del nervio antenal. En el lóbulo antenal (LA), estas neuronas sinaptan a nivel de los glomérulos con interneuronas locales y neuronas de proyección que transmiten la información olfativa a centros de orden superior, el protocerebro lateral (PL) y los cuerpos pedunculados o mushroom bodies (MB). La vía gustativa: este circuito está parcialmente representado por la neurona VUMmx1, que converge con la vía olfativa en el LA, el PL y los MB. La línea discontinua entre las neuronas receptoras gustativas NRGs y VUMmx1 indica que ésta parte del circuito es actualmente desconocida. Modificado de Giurfa, 2007. c) Esquema de la morfología de la VUMmx1 mostrando su conectividad entre las etapas principales del circuito olfativo. Modificado de Brito Sánchez, 2011.

1.4.2 Aprendizaje no asociativo

El aprendizaje no asociativo permite a los animales filtrar e ignorar información que no es relevante. La habituación, un tipo de aprendizaje no asociativo considerado el pilar base

de otras formas de aprendizaje (Rankin *et al.*, 2009), se caracteriza por la exposición frecuente y sostenida en el tiempo a un estímulo, lo que produce una disminución gradual en la probabilidad o en la intensidad de una respuesta innata (Thompson y Spencer, 1966). La habituación se distingue de la fatiga o de la adaptación sensorial porque la respuesta puede ser restaurada a sus niveles iniciales (deshabituada) ya sea pasivamente con el paso del tiempo (recuperación espontánea), con la presentación del mismo estímulo a concentraciones más altas o de otro estímulo que sea equivalente (Thompson y Spencer, 1966).

En las abejas de la miel, la presentación repetida de solución de sacarosa a bajas concentraciones induce la habituación de la respuesta refleja de extensión de probóscide o REP, y esta respuesta puede ser deshabituada por la presentación de solución de sacarosa de alta concentración (Scheiner, 2004). Es interesante que el grado de habituación en abejas forrajeras y abejas jóvenes correlaciona con su sensibilidad a la sacarosa: abejas más sensibles a la sacarosa se habitúan menos y presentan un grado mayor de deshabitación en comparación a las abejas menos sensibles a la sacarosa (Scheiner, 2004). Hasta ahora, no existe evidencia acerca del rol del polen como estímulo en la habituación y deshabitación de abejas forrajeras.

Es necesario investigar la especialización en las tareas de recolección de polen y néctar entre las abejas forrajeras, tomando en cuenta su motivación por obtener la recompensa deseada, es decir el momento de la visita de forrajeo. Este enfoque permitirá ampliar nuestro entendimiento sobre la sensibilidad de las recolectoras hacia la sacarosa. Además, existe una carencia de información sobre la sensibilidad de las recolectoras ante los estímulos relacionados con el polen y sobre el papel del polen como recompensa o refuerzo durante el aprendizaje asociativo y no asociativo.

1.5 OBJETIVO E HIPÓTESIS

1.5.1 Objetivo general.

Estudiar la relevancia de la motivación por recolectar el recurso deseado y el rol del polen como recompensa del aprendizaje en la especialización de la recolección de *Apis mellifera*.

1.5.2 Hipótesis y predicciones

1.5.2.1 Sensibilidad a la sacarosa en distintos momentos de la visita de forrajeo.

Evaluaremos la hipótesis de que la sensibilidad a la sacarosa, la cual determina la especialización del forrajeo, depende de la motivación por recolectar el recurso deseado (néctar o polen). Predigo que la sensibilidad a la sacarosa de las recolectoras que visitan a una fuente de néctar será mayor ($>$ proporción de REP) cuando arriban que cuando abandonan la fuente, ya que al inicio de la visita estarían muy motivadas por obtener azúcares para el nido, pero perderían esta motivación al aproximarse el final de la visita, conforme la recolectora se va saciendo. Por el contrario, las forrajeras de polen van a ser menos sensibles a la sacarosa ($>$ proporción de REP) al arribar a la fuente que al abandonarla, ya que al inicio de la visita su conducta no estaría motivada por la obtención de azúcares sino por la obtención de polen para la colonia, mientras que al final, su respuesta estaría influenciada por la necesidad de obtener azúcares para reponer energía luego de la recolección de polen.

1.5.2.2 Aprendizaje asociativo en distintos momentos de la visita de forrajeo y con distintas recompensas florales.

Evaluaremos la

hipótesis de que el desempeño durante el condicionamiento olfativo, el cual está determinado por la sensibilidad a la recompensa (sacarosa o polen), depende de la motivación por recolectar el recurso deseado (néctar o polen). En un primer experimento evaluaré únicamente a recolectoras de polen al inicio y al final de la visita de forrajeo. Predigo que, en un condicionamiento olfativo en donde la recompensa es la sacarosa, las recolectoras de polen se desempeñarán mejor ($>$ proporción de REP) al final de la visita de forrajeo, cuando están hambreadas y por lo tanto más sensibles a la sacarosa, que al inicio, cuando están motivadas por obtener polen y su sensibilidad a la sacarosa es menor. En un segundo experimento evaluaré a ambos tipos de recolectoras al inicio de la visita. Predigo que las recolectoras de polen condicionadas a partir de una doble recompensa (sacarosa + polen), van a desempeñarse mejor ($>$ proporción de REP) que aquellas condicionadas a partir de una recompensa de sacarosa sola, ya que el polen es el recurso que motiva su comportamiento y al cual las recolectoras de polen deberían permanecer sensibles al arribar a la fuente. Por otra parte, el desempeño de las recolectoras de néctar será similar ($=$ proporción de REP) ya sea que el polen participe, o no, como co-refuerzo durante el condicionamiento, debido a que en ningún momento de la visita recolectora, el polen representa un estímulo excitatorio (que pueda ser percibido como recompensa) para las recolectoras de néctar.

1.5.2.3 Aprendizaje no asociativo con distintos estímulos

florales. Evaluaremos la hipótesis de que el desempeño durante la habituación y la deshabitación, el cual está determinado por la sensibilidad a la recompensa, depende de la predisposición de las abejas por recolectar néctar o polen. Predigo que las recolectoras de polen mostrarán una reducción de la habituación ($>$ proporción de REP) y un mayor grado de deshabitación ($>$ proporción de REP) que las recolectoras de néctar cuando el

polen participe como co-refuerzo de la sacarosa, ya que serían más sensibles al polen, el que actuaría como un estímulo excitatorio entre las recolectoras de polen pero no entre las de néctar.

1.5.2.4 Sensibilidad olfativa en forrajeras de polen y néctar y su correlación con la especialización de tareas. Evaluaremos la hipótesis que propone que la especialización del forrajeo se correlaciona con la sensibilidad olfativa de las recolectoras. Predigo que las recolectoras de polen se van a desempeñar mejor al adquirir memorias olfativas ($>$ proporción de REP) que las recolectoras de néctar, tanto en los condicionamientos en los que se utilice aromas florales como en los condicionamientos en los que se utilice olores del polen. Por otro lado, predigo que las respuestas de las antenas de las recolectoras de polen ante la presentación de aromas florales (sobre todo a concentraciones bajas) así como ante olores emitidos por el polen y la cría, tendrán amplitudes mayores ($>$ mV) que las respuestas de las recolectoras de néctar.

CAPÍTULO 2

Sensibilidad a la sacarosa en distintos momentos de la visita de forrajeo.

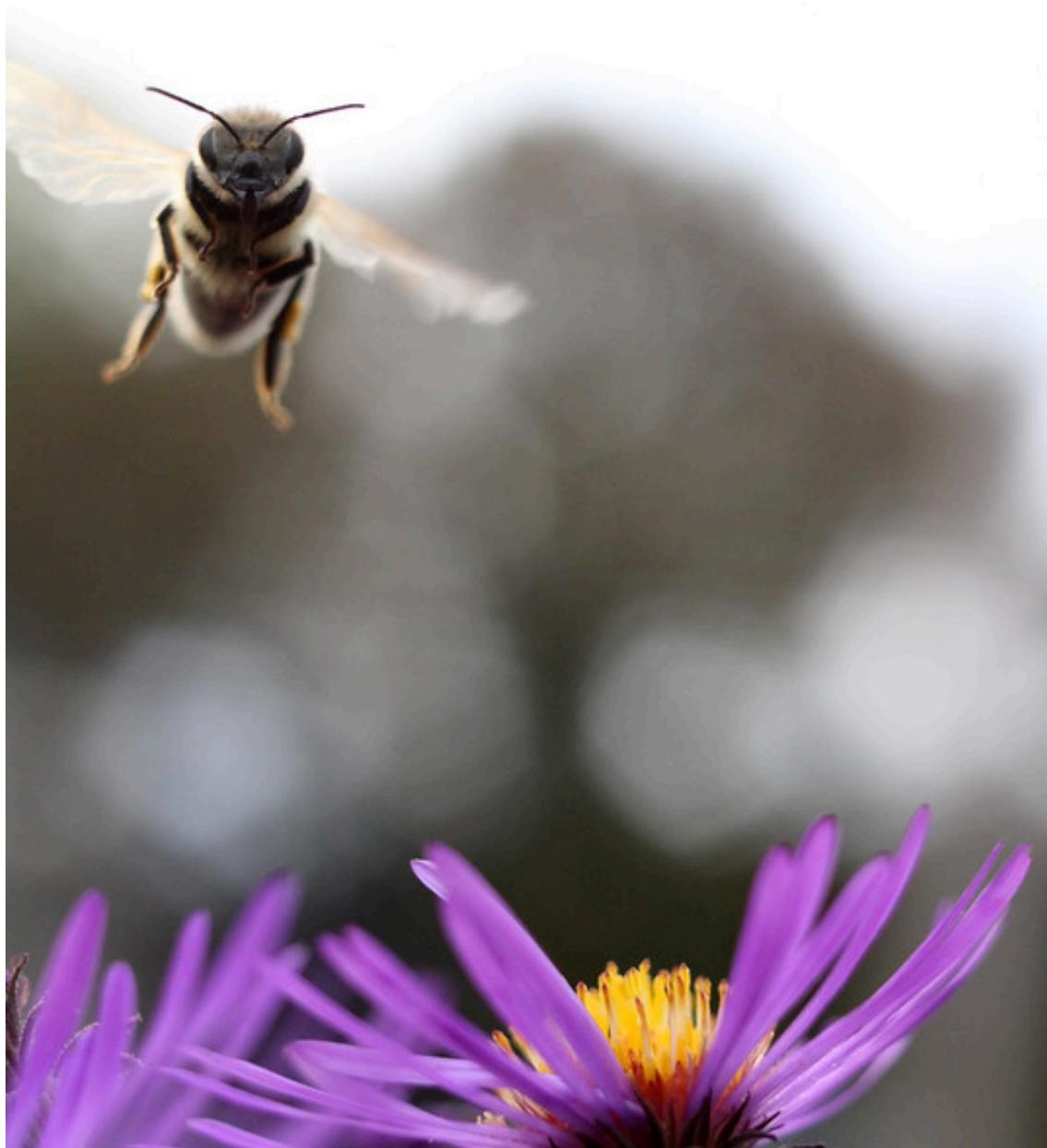


Foto: Alex Wild

2.1 INTRODUCCIÓN

El caso mejor estudiado de cómo las variaciones en la sensibilidad pueden dar lugar a la división de tareas, es probablemente la especialización en la recolección de recursos en la abeja *Apis mellifera*. Page y Fondrk (1998) capturaron abejas recolectoras en la entrada de la colmena, y observaron que las recolectoras de polen eran más sensibles que las recolectoras de néctar al responder a una amplia variedad de concentraciones de solución de sacarosa, mientras que las forrajeras de néctar principalmente responden a soluciones de sacarosa altamente concentradas. Esta diferencia en los umbrales de respuesta al azúcar (URAs) se ha interpretado como adaptativa, con el argumento de que una baja sensibilidad a la sacarosa entre las recolectoras de néctar podría sesgar la búsqueda de fuentes productivas que proporcionen a la colonia una mayor ganancia de energía (Page y Fondrk, 1998). Sin embargo, las diferencias en la sensibilidad a la sacarosa no explican completamente por qué las recolectoras altamente sensibles a la sacarosa tienden a recolectar polen, y contradicen la hipótesis que plantea el modelo de umbral de respuesta.

Dentro de la colmena, las recolectoras ingieren néctar por trofalaxia como combustible antes de salir del nido (Beutler, 1950; Harano *et al.*, 2013; 2014), por lo que técnicamente no necesitan ingerir alimentos durante la actividad de forrajeo. Ambos tipos de abejas recolectoras parten del nido con cargas de néctar que difieren en su volumen y concentración de azúcares (Harano *el at.*, 2016). Las forrajeras de polen además de usar el néctar como combustible, lo usan como “pegamento” para poder aglutinar en las corbículas los granos de polen recolectados (Beutler, 1950; Harano *et al.*, 2013). Siendo la recolección de polen la que genera demandas de azúcar sustancialmente más altas, es esperable que existan variaciones considerables en los niveles de saciedad de azúcar entre las recolectoras

de polen y las de néctar a lo largo del ciclo de forrajeo. Teniendo en cuenta esto, podemos pensar que los niveles de respuesta a la sacarosa aumentan en las recolectoras que regresan al nido cargadas de polen, pero también hambrientas de azúcares, dada la alta demanda energética que impone la recolección de este recurso. Por otro lado, la sensibilidad de las recolectoras de néctar disminuiría al regresar a la colmena debido a su estado de saciedad alto después de la recolección. Además de las diferencias previamente informadas entre recolectoras de néctar y polen capturadas al final de la visita de forrajeo (Page y Fondrk, 1995; Page *et al.*, 1998; Page *et al.*, 2006), queda por estudiar la sensibilidad a la sacarosa en las recolectoras de néctar y polen al inicio de la visita de forrajeo, cuando se encuentran altamente motivadas por recolectar el recurso deseado.

En este contexto, es esperable que las interacciones entre factores internos y externos, como la predisposición genética, el estado motivacional, el nivel de saciedad de azúcar y la percepción de claves contextuales provenientes de la fuente de alimento y de la colmena, modulen los umbrales de respuesta a la sacarosa. Evaluaremos la hipótesis de que la sensibilidad a la sacarosa, la cual determina la especialización del forrajeo, depende de la motivación por recolectar el recurso deseado (néctar o polen). Predigo que la sensibilidad a la sacarosa de las recolectoras que visitan a una fuente de néctar será mayor ($> \text{prop de REP}$) cuando arriban que cuando abandonan la fuente, ya que al inicio de la visita estarían muy motivadas por obtener azúcares para el nido, pero perderían esta motivación al aproximarse el final de la visita, conforme la recolectora se va saciando. Por el contrario, las forrajeras de polen van a ser menos sensibles a la sacarosa ($> \text{prop de REP}$) al arribar a la fuente que al abandonarla, ya que al inicio de la visita su conducta no estaría motivada por la obtención de azúcares sino por la obtención de polen para la colonia, mientras que al final, su respuesta

estaría influenciada por la necesidad de obtener azúcares para reponer energía luego de la recolección de polen.

2.2 METODOLOGÍA

Realicé el experimento durante las temporadas de verano 2020-2021 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina ($34^{\circ}32'S$, $58^{\circ}26'W$). Llevé a cabo todos los ensayos siguiendo las pautas de cuidado animal del Instituto Nacional de Salud (1985) y las leyes vigentes de Argentina. Utilicé abejas europeas *A. mellifera ligustica*.

2.2.1 Abejas

Para estimar la sensibilidad a la sacarosa de forrajeras de polen y de néctar con distintos niveles de motivación recolectora, capturé abejas que llegaban (al inicio de la visita) o partían (al final de la visita) de alimentadores artificiales que ofrecían solución de sacarosa o polen. Para esto, comencé entrenando a un grupo de recolectoras para que visitaran una estación de forrajeo ubicada a 50 m de cada colmena (3 colmenas en total), donde les ofrecí solución de sacarosa al 10% p/p y polen en alimentadores *ad libitum* separados entre sí por una distancia de 20 cm, y dispuestos en una plataforma de madera (30 cm x 40 cm). Elegí solución de sacarosa a una concentración relativamente baja (10% p/p) para minimizar las diferencias en la sensibilidad gustativa entre recolectoras. Utilicé polen triturado proveniente de muestras multiflorales recolectadas por abejas (proporcionadas y caracterizadas por las cooperativas Pampero, Amuyen y CoopSol). La mayoría de las muestras de polen fueron obtenidas de la misma temporada en la que realizamos los experimentos.

Capturé a cada tipo de recolectora al inicio (una vez que aterrizaron en el alimentador, antes de la recolección del recurso) o al final (una vez que terminaron la recolección, limpiaron sus antenas y estaban listas para volar) de la visita de forrajeo. De esta manera, obtuve 4 grupos diferentes de recolectoras: i) abejas recolectoras de polen ($n=57$) y ii) néctar ($n=44$) al inicio de la visita de forrajeo, y iii) abejas recolectoras de polen ($n=44$) y iv) néctar ($n=45$) al final de la visita. Ofrecimos agua con un palillo de madera hasta que las abejas estaban saciadas antes de colocarlas en la incubadora (30°C , 60% de humedad relativa y oscuridad) durante 30 a 45 minutos.

2.2.2 Umbrales de respuesta a la sacarosa

La sensibilidad a la sacarosa se cuantificó mediante el reflejo de extensión de la probóscide, una respuesta innata que se desencadena al tocar las antenas de la abeja con una solución de sacarosa suficientemente concentrada. No alimentamos a las abejas durante los ensayos para no modificar su motivación para responder. Las abejas fueron evaluadas en orden secuencial, comenzando desde la concentración más baja hasta la más alta de la solución de sacarosa (0,1- 0,3- 1- 3- 10- 30 y 50%), con un intervalo entre ensayos de 2 minutos (Figura 2.1). Proporcionamos agua a las abejas entre los ensayos de sacarosa para prevenir respuestas causadas por la sed (Page y Fondrick, 1998).

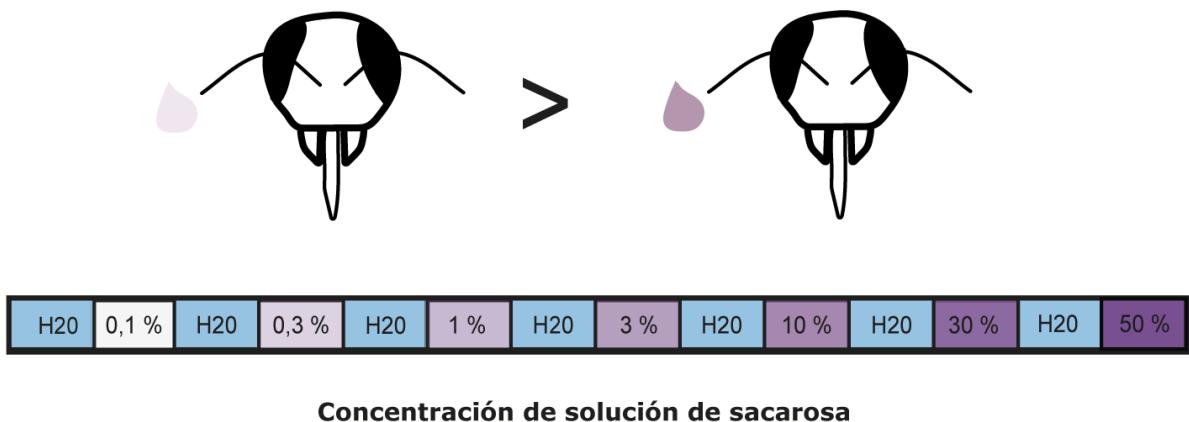


Figura 2.1. Protocolo de umbrales de respuesta a la sacarosa o URAs. Las antenas de abejas inmovilizadas son estimuladas con una serie de soluciones de sacarosa de concentraciones crecientes (0,1- 0,3- 1- 3- 10- 30 y 50%) para determinar qué solución provocaba la extensión de la probóscide. La respuesta de las abejas a las distintas concentraciones fue puesta a prueba en orden secuencial, comenzando desde la presentación de solución de agua con sacarosa de concentración más baja hasta la más alta. Entre cada presentación, se proporcionó agua a las abejas para evitar respuestas a la solución de sacarosa causadas por la sed. El intervalo entre dos presentaciones sucesivas fue de 2 minutos.

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Utilicé modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) asumiendo una distribución Bernoulli y utilizando la función “glmer” del paquete ‘lme4’ (Bates *et al.*, 2015). Asigné valores de 1 cuando se produjo la REP y valores de 0 cuando no ocurrió. Analicé la proporción de REP en abejas inmovilizadas considerando a el tipo de recolectora (un factor de dos niveles correspondiente a recolectoras de polen y néctar), el momento del ciclo forrajeo (un factor de dos niveles correspondiente a inicio y final) y la concentración de sacarosa (variable continua) como efectos fijos. Las abejas individuales y los días

experimentales se consideraron como efectos aleatorios. Se realizaron contrastes *post hoc* en los modelos de ambos experimentos para evaluar los efectos y la significancia entre los factores fijos mediante la función “*emmeans*” del paquete ‘*emmeans*’ versión 1,4 (Lenth, 2019) con un nivel de significancia del 0,05.

2.4 RESULTADOS

Nuestro análisis mostró que el tipo de recolectora interactúa con el momento de la visita de forrajeo afectando la sensibilidad a la sacarosa ($\chi^2 = 75,89$; gl = 1; p <0,001; Figura 2.2). Las recolectoras de polen presentaron una mayor sensibilidad a la sacarosa (umbrales de respuesta más bajos) que las recolectoras de néctar al final de la visita, ya que detectamos proporciones significativamente más altas de REP en todo el rango de concentraciones de sacarosa evaluadas (Figura 2.2). Por otro lado, y en consonancia con la predicción del modelo de umbral de respuesta, observamos que las recolectoras de polen eran menos sensibles (umbrales más altos) que las recolectoras de néctar cuando llegaban a los alimentadores con el recurso deseado, al inicio de la visita. Dentro de cada tipo de recolectora, las recolectoras de polen fueron más sensibles a la sacarosa al final de la visita (z ratio = -7,830; gl = Inf; p <0,0001; Figura 2.2), mientras que las recolectoras de néctar mostraron una mayor sensibilidad a la sacarosa al inicio de la visita (z ratio = 3,935; gl = Inf; p <0,0005; Figura 2.2).

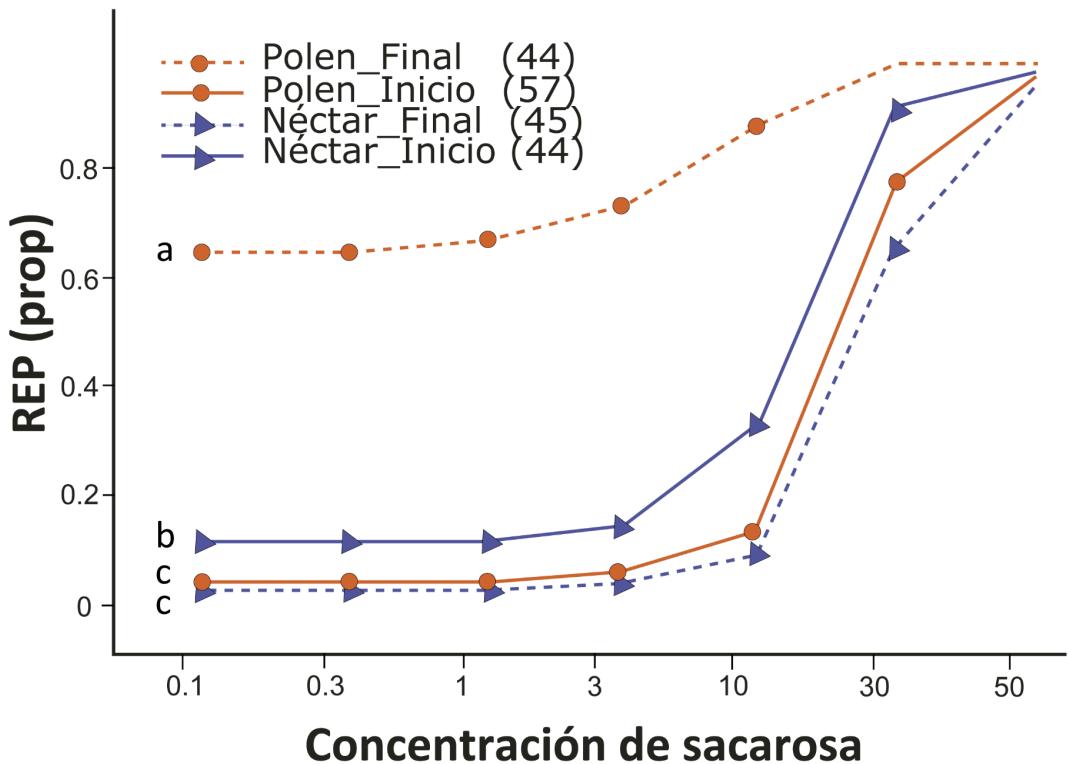


Figura 2.2. Proporción de REP (prop) de abejas forrajeras de polen (línea naranja) y néctar (línea azul) en respuesta a las concentraciones crecientes de solución de sacarosa. Las líneas punteadas corresponden a las abejas que dejan el alimentador de polen al final de la visita de forrajeo, mientras que las líneas sólidas corresponden a las abejas forrajeras que llegan a los alimentadores de polen y de néctar al inicio de la visita. Los símbolos (círculos o triángulos) indican los valores medios predichos por el modelo. Las distintas letras indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$). El tamaño de la muestra se indica en paréntesis.

2.5 DISCUSIÓN

El modelo de umbral de respuesta ha sido sumamente influyente para explicar la división del trabajo y su relación con la organización social en colonias de insectos sociales (Page y Fondrk, 1995; Page *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2013; Smith, 2016; Farina y Balbuena,

2020). Sin embargo, el mismo modelo puede resultar insuficiente para explicar la división del trabajo si no se tiene en cuenta el estado interno o fisiológico del individuo. A partir de la evidencia presentada aquí, la motivación y/o el nivel de saciedad relacionados con el momento de la visita de forrajeo, parecen ser factores relevantes para determinar la sensibilidad a la sacarosa de las recolectoras de polen y néctar.

La mayoría de las investigaciones establecieron diferencias en la sensibilidad a la sacarosa entre las forrajeras de néctar y polen que regresaron al nido después de recolectar (final de la visita de forrajeo), pero solo unos pocos estudios analizaron las respuestas de las forrajeras que partieron de la colmena (Page y Fonderck, 1998; Pankiw *et al.*, 2001). Page y Fonderck (1998) mostraron que la sensibilidad a la sacarosa de abejas no recolectoras de polen que salían del nido era aproximadamente un 25% más baja que cuando ingresaban. Además, las recolectoras de polen que ingresaban a la colmena presentaron una sensibilidad a la sacarosa un 47% mayor en comparación con las que salían. En otro estudio, Pankiw y colaboradores (2001) evaluaron la sensibilidad a la sacarosa en las recolectoras que salían de la colmena en busca de polen y regresaban cargadas con el recurso. Encontraron que la recolección de polen no afectaba la REP; sin embargo, los umbrales de respuesta de las recolectoras de polen que llegaban al nido eran menores que los de aquellas recolectoras que salían del nido. Estas diferencias entre los umbrales de las recolectoras que entran y salen del nido es consistente con mis resultados y respaldan la idea de que existe una interacción entre el momento de la visita de forrajeo y la predisposición a la recolección.

En base a mis resultados, sugiero que la sensibilidad a la sacarosa cambia rápidamente entre la llegada y la partida de una fuente de alimento (eventos que transcurren en unos pocos minutos). Estos cambios podrían explicarse por variaciones rápidas en los niveles de aminas

biogénicas (o sus receptores) en el cerebro de la abeja que afectan la sensibilidad gustativa de acuerdo con la motivación de la abeja por encontrar el recurso deseado (Huang *et al.*, 2022; Arenas *et al.*, 2021). Estudios previos (Huang *et al.*, 2022) demostraron que la motivación de las recolectoras varía a lo largo de las diferentes fases del ciclo de forrajeo, lo que se evidencia a través de cambios significativos en los niveles cerebrales de dopamina en las recolectoras de néctar. Los niveles de dopamina son altos en las recolectoras de néctar que dejan la colmena y que llegan a una fuente de azúcar productiva (de alta concentración), pero disminuyen tras completar su objetivo (es decir, cuando las abejas ya han ingerido suficiente solución de sacarosa y se disponen a regresan cargadas a la colmena).

En este contexto, un experimento reciente, en el cual se cuantificó la expresión génica de los receptores de octopamina (OA) y tiramina (TYR) en recolectoras capturadas inmediatamente después de aterrizar en alimentadores artificiales (al inicio de la visita de forrajeo), mostró que había una expresión más alta del gen receptor *AmoctaR1* en el cerebro de las recolectoras de polen en comparación con las recolectoras de néctar (Arenas *et al.*, 2021). Curiosamente, las recolectoras de polen y néctar capturadas al final de la visita de forrajeo no difieren en la expresión de *AmoctaR1*, pero sí mostraron diferencias en la expresión del gen receptor *Amtyr1* en la zona sub-esofágica. Una comparación cualitativa entre las recolectoras de polen capturadas al llegar a los alimentadores y las capturadas en la entrada de la colmena sugiere un aumento en los niveles de expresión del gen *AmoctaR1* al inicio de la visita de forrajeo, niveles que disminuyen a medida que las recolectoras se cargan del recurso. Una vez dentro de la colmena, los niveles de expresión de este gen podrían aumentar nuevamente, llevando a las forrajeras a reanudar la recolección de polen (Arenas *et al.*, 2021).

En los últimos años, se ha observado que los neuropéptidos también desempeñan un papel importante en orquestar los procesos fisiológicos y comportamentales, al actuar como neurohormonas, neuromoduladores y neurotransmisores (Strand, 1999). Se observó que el comportamiento de recolección de néctar y de polen provocan cambios rápidos en la abundancia de ciertos neuropéptidos en el cerebro de las abejas (Brockmann *et al.*, 2009). Esto abre la posibilidad de que estos neuropéptidos participen en la transición entre la recolección de néctar y polen, una estrategia que le permite a las colmenas aumentar la colecta de polen en función de los requerimientos del nido y la calidad/disponibilidad de fuentes en el ambiente (Fewell *et al.*, 1991; Fewell y Winston, 1992; Arenas y Kohlmaier, 2019). Por lo tanto, es probable que perfiles específicos de aminas biogénicas, niveles de expresión de sus receptores, o incluso variaciones de otros actores moleculares que median en las respuestas de alimentación (por ejemplo, el neuropéptido F; Bestea *et al.*, 2022) sean responsables de conducir a las recolectoras de polen y néctar a lo largo de las diferentes fases del ciclo de forrajeo (Arenas *et al.*, 2021).

A partir de los resultados de este capítulo, y de la evidencia de que la sensibilidad diferencial a los estímulos que actúan como recompensa afecta el aprendizaje, es relevante preguntarnos si las diferencias observadas en los niveles de respuesta al azúcar correlacionan (o no) con el desempeño durante un condicionamiento clásico en el que la sacarosa, pero también el polen pueden participar como refuerzo.

CAPÍTULO 3

**Aprendizaje asociativo en distintos momentos de la visita de
forrajeo y con distintas recompensas florales.**

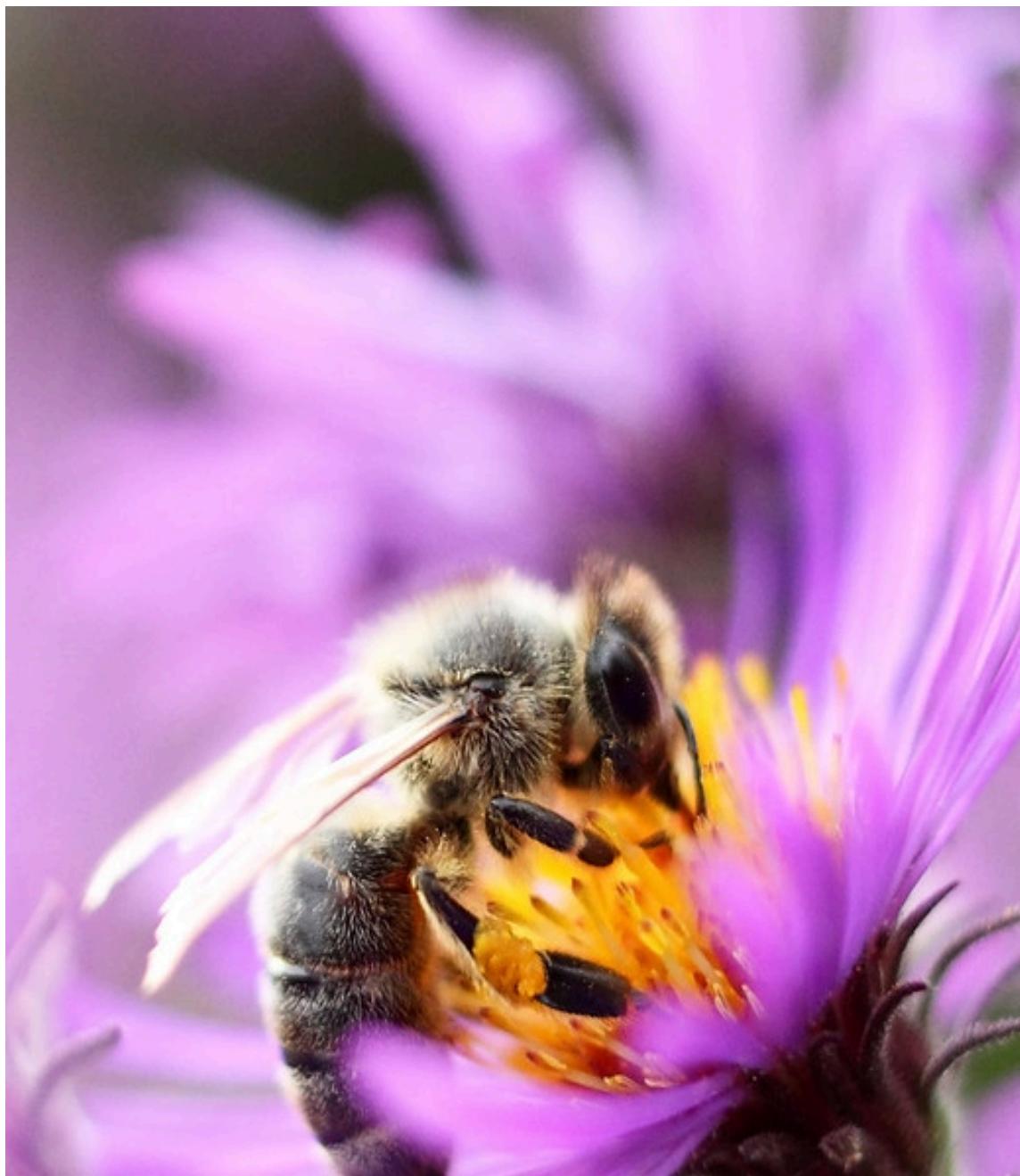


Foto: Alex Wild

3.1 INTRODUCCIÓN

La división de tareas es una propiedad emergente de la colonia que surge de la interacción entre la predisposición genética y la regulación epigenética de las abejas obreras, lo que finalmente afecta su nivel de respuesta y, por lo tanto, la probabilidad de aprender estímulos relacionados con dicha tarea (Scheiner *et al.*, 2001a; 2001b; 2005). El aprendizaje conlleva a la formación de memorias, cuya adquisición y retención dependen de las necesidades individuales y de su entorno (Menzel, 1999). En el caso del aprendizaje asociativo, mientras las abejas forrajeras realizan visitas sucesivas al mismo tipo de flor, las asociaciones repetidas entre los estímulos y la recompensa dan lugar a la formación de memorias. Las memorias producto del aprendizaje influyen directamente en el comportamiento de orientación (Chaffiol *et al.*, 2005) y de aterrizaje de las recolectoras (Free, 1969; Arenas *et al.*, 2007; Arenas y Farina, 2008; 2012) optimizando así la eficiencia de forrajeo (Menzel, 1985; Greggers y Menzel, 1993).

El desempeño durante el aprendizaje de las abejas puede cuantificarse utilizando el condicionamiento pavloviano de la respuesta de extensión de la probóscide (REP) (Bitterman *et al.*, 1983; Giurfa y Sandoz, 2012), una respuesta refleja que se desencadena frente a la estimulación de las antenas con una solución de azúcar suficientemente concentrada, y que puede ser condicionada olfativamente en abejas inmovilizadas (Bitterman *et al.*, 1983). El nivel al que las abejas responden a los estímulos juega un papel fundamental en su desempeño durante el aprendizaje, ya que la intensidad tanto del estímulo condicionado como del estímulo incondicionado es relevante para establecer una asociación (Rescorla y Wagner, 1972; Pelz *et al.*, 1997). Bajo condiciones de laboratorio, y utilizando la REP como variable respuesta, Scheiner y colaboradores compararon el desempeño durante el aprendizaje olfativo

y táctil en abejas forrajeras y pre forrajeras con distintos umbrales de respuesta a la sacarosa. Estos experimentos muestran que el desempeño de una abeja durante el aprendizaje olfativo o táctil correlaciona con su sensibilidad a la sacarosa: las abejas con una alta sensibilidad a la sacarosa muestran mejores desempeños en la adquisición y retención de memorias en comparación con las abejas que tienen umbrales a la sacarosa más altos (Scheiner *et al.*, 1999; 2001a; b; 2005). Scheiner y colaboradores (2004) mostraron que las abejas pueden extender su probóscide cuando se las estimula con polen recolectado a mano desde la flor (Scheiner *et al.*, 2004) o con polen recolectado por abejas (Grüter *et al.*, 2008), lo que es consistente con el hecho de que las recolectoras utilizan la probóscide y las mandíbulas para recolectar el polen. Sin embargo, esta respuesta es poco estable y las abejas suelen dejar de responder al polen al cabo de unos pocos eventos, por lo que es necesario evaluar otros protocolos que nos permitan estudiar el rol del polen como estímulo excitatorio de forma más confiable.

En este capítulo propongo estudiar si los cambios en la sensibilidad a la sacarosa asociados a la predisposición de las recolectoras y al momento de la visita de forrajeo afectan el desempeño durante el condicionamiento olfativo. Planteo además la posibilidad de que existan diferencias entre el desempeño de las recolectoras de polen y de néctar cuando se incluye al polen como estímulo recompensado. Para esto recurriré a realizar una estimulación simultánea con polen + sacarosa (esto es, polen en tarsos y solución de sacarosa en antenas) que me permita obtener una REP estable a lo largo de los eventos de entrenamiento. Evaluaremos la hipótesis de que el desempeño durante el condicionamiento olfativo, el cual está determinado por la sensibilidad a la recompensa (sacarosa o polen), depende de la motivación por recolectar el recurso deseado (néctar o polen). En un primer experimento se evaluó únicamente a recolectoras de polen al inicio y al final de la visita de forrajeo. Predigo

que, en un condicionamiento olfativo en donde la recompensa es la sacarosa, las recolectoras de polen se desempeñarán mejor ($>$ proporción de REP) al final de la visita de forrajeo, cuando están hambreadas y por lo tanto más sensibles a la sacarosa, que al inicio, cuando están motivadas por obtener polen y su sensibilidad a la sacarosa es menor. En un segundo experimento se evaluará a ambos tipos de recolectoras al inicio de la visita. Predigo que las recolectoras de polen condicionadas a partir de una doble recompensa (sacarosa + polen), van a desempeñarse mejor ($>$ proporción REP) que aquellas condicionadas a partir de una recompensa de sacarosa, ya que el polen es el recurso que motiva su comportamiento y al cual las recolectoras de polen debería permanecer sensible al arribar a la fuente. Por otra parte, el desempeño de las recolectoras de néctar será similar ya sea que el polen participe, o no, como co-refuerzo durante el condicionamiento, debido a que en ningún momento de la visita recolectora, el polen representa un estímulo excitatorio (que pueda ser percibido como recompensa) para las recolectoras de néctar.

3.2 METODOLOGÍA

Realicé el experimento 1 durante las temporadas de verano de 2022-2023 y el experimento 2 durante las temporadas de verano de 2020-2021 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina ($34^{\circ}32'S$, $58^{\circ}26'W$). Llevé a cabo ambos experimentos siguiendo las pautas de cuidado animal del Instituto Nacional de Salud (1985) y las leyes vigentes de Argentina. Utilicé abejas europeas *A. mellifera* ligustica.

3.2.1 Abejas

Para los experimentos 1 y 2, entrené a las obreras para que visitaran una estación de forrajeo al inicio y al final de la visita, como indico en el capítulo anterior. En ambos experimentos,

las abejas fueron enfriadas y retiré las cargas de polen de sus patas traseras. Posteriormente, fueron inmovilizadas de tal manera que pudieran mover únicamente sus antenas, partes bucales y patas delanteras. Todas las abejas fueron alimentadas con solución de sacarosa al 10% p/p hasta estar saciadas y fueron mantenidas en una incubadora (30°C, 60% de humedad relativa y en oscuridad) durante 30 minutos aproximadamente antes de empezar los protocolos de condicionamiento.

3.2.2 Condicionamiento olfativo de la REP usando polen como co-refuerzo

Desarrollé un procedimiento alternativo al condicionamiento olfativo clásico con recompensa de sacarosa, en el que se realizó un condicionamiento con refuerzo doble y simultáneo, presentando solución de sacarosa en las antenas y polen recolectado a mano en los tarsos del primer par de patas como co-refuerzo. Este procedimiento nos permite obtener respuestas estables a lo largo de los eventos de entrenamiento sucesivo (Figura 3.1).

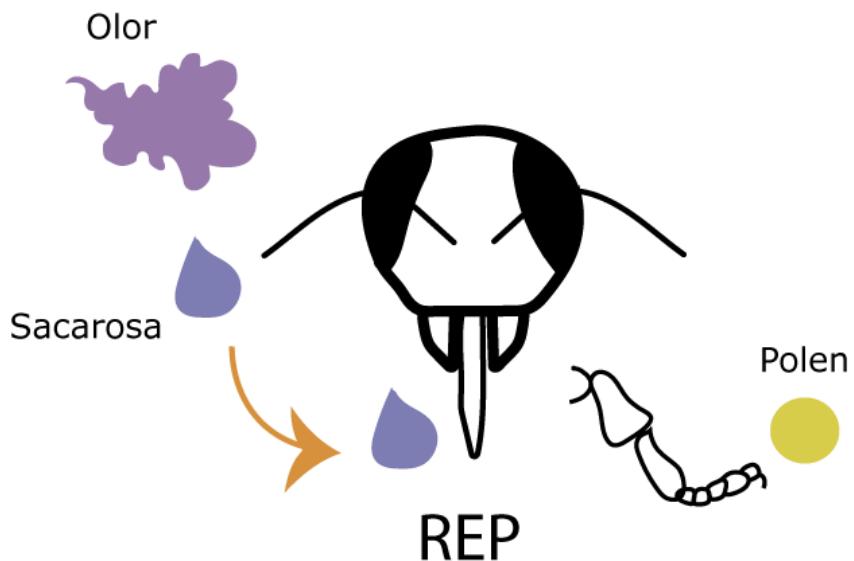


Figura 3.1. Protocolo de condicionamiento olfativo clásico con doble refuerzo. Se presenta el olor (estímulo condicionado, EC, azul) en las antenas al mismo tiempo que la solución de sacarosa

(estímulo incondicionado, EI, violeta) para inducir la respuesta de extensión de la probóscide (REP). Como recompensa, la solución de sacarosa se ofrece también en la probóscide, mientras que el polen (amarillo) se aplica en los tarsos del primer par de patas como co-refuerzo.

3.2.3 Presentación de los estímulos olfativos

Para la presentación del estímulo condicionado (EC), utilizamos un olfatómetro, que mediante un sistema de válvulas controladas por una computadora, enviaba un flujo continuo de aire limpio (50 ml s^{-1}) hacia la cabeza de la abeja inmovilizada al mismo tiempo que una corriente de aire secundaria ($6,25 \text{ ml s}^{-1}$) enviaba el olor (LIO 0,1 M), como se observa en la figura 3.2. En un papel filtro ($30 \times 3 \text{ mm}$) impregné una alícuota del olor ($2\mu\text{L}$) y lo coloqué dentro de una jeringa (10 ml) conectada a la corriente de aire secundaria. Cada evento duró 55 segundos. Durante los primeros 20 segundos se liberó aire limpio, seguido del olor (6 segundos) y finalmente durante 29 segundos se realizó una nueva exposición al aire limpio.



Figura 3.2. Presentación de estímulos olfativos usando el olfatómetro. Crédito INSSOC.

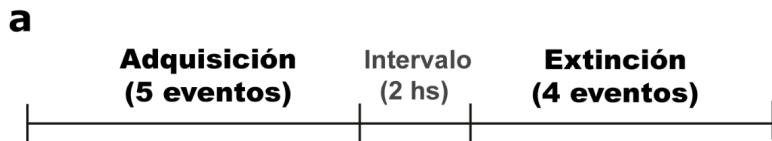
Durante los procedimientos *pareados*, los últimos 3 segundos de la presentación del olor se sobrelapan con la presentación de la sacarosa + co-refuerzo (polen o celulosa, según el tratamiento). Mientras que durante los procedimientos *no pareados*, les entregamos el refuerzo entre 3 y 5 segundos después de la presentación olor + sacarosa. Medimos la REP durante los primeros 3 segundos de la presentación de olor. Para ambos experimentos, las abejas que respondieron a estímulos mecánicos (flujo de aire) durante los primeros 20 s de aire limpio fueron excluidas del análisis. También se excluyeron aquellos individuos que extendieron su probóscide cuando se les presentó el olor en el primer ensayo de condicionamiento (es decir, abejas que mostraron una respuesta espontánea), ya que no podemos determinar si esta es una respuesta innata o indica una asociación previa (no controlada) entre el olor y la recompensa.

3.2.4 Experimentos

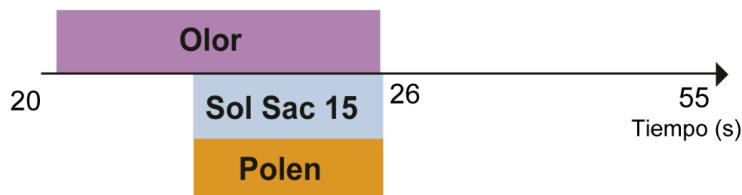
3.2.4.1 Experimento 3.1. Adquisición y extinción de memorias en forrajeras de polen al inicio y al final de la visita de forrajeo

Las memorias olfativas se formaron durante 5 eventos de adquisición utilizando solución de sacarosa 15% p/p como recompensa, seguidos de 4 eventos de extinción. Durante la adquisición de memorias, el estímulo olfativo fue presentado i) pareado a la sacarosa + polen (PP), ii) pareado a la sacarosa + no pareado al polen (NP), iii) pareado a sacarosa + celulosa (PC). A pesar de ser un compuesto inerte, las partículas de celulosa (que son de tamaño similar a los granos de polen) podrían proporcionar una estimulación táctil que refuerza el aprendizaje y la memoria de las abejas que se acercan a la fuente de polen. Los ensayos de extinción consistieron en la presentación del estímulo condicionado (LIO 0,1 M)

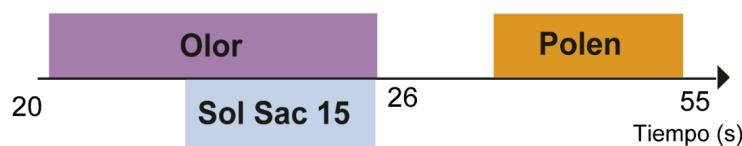
sin recompensa de sacarosa 2 horas después de finalizar el protocolo de adquisición (Figura 3.3). Evaluamos a los 6 grupos de forrajeras de polen: al inicio de la visita bajo el protocolo no pareado al polen (n=34), pareado al polen (n=53) y pareado a la celulosa (n=38); al final de la visita bajo el protocolo no pareado al polen (n=38), pareado al polen (n=50) y pareado a la celulosa (n=35).



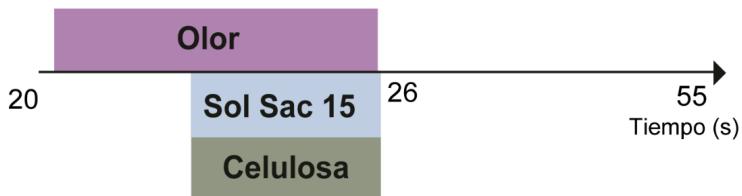
b Procedimiento pareado (PP)



c Procedimiento no pareado (NP)



d Procedimiento pareado con celulosa (PC)



e Extinción

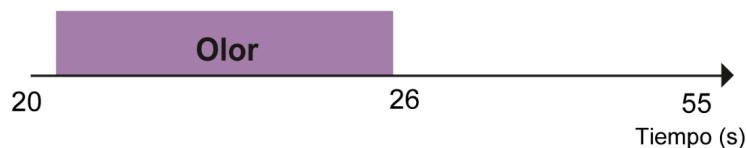
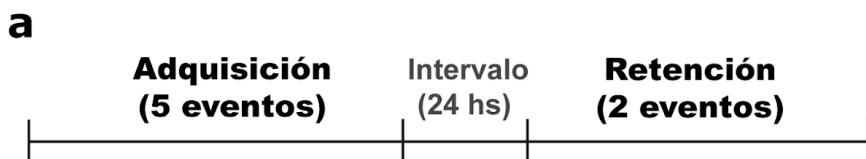


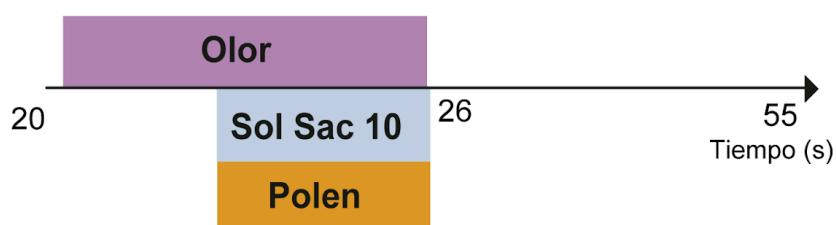
Figura 3.3. Experimento 3.1 a) **Protocolo general.** Las abejas fueron condicionadas olfativamente en 5 eventos de adquisición y 4 eventos de extinción que duraron 55 segundos. El intervalo entre eventos fue de 20 min. b) **Procedimiento pareado con polen (PP).** La estimulación consistió en presentar el olor en la antena pareado a la presentación de solución de sacarosa (10%p/p) como recompensa en la probóscide y al contacto de un palillo de madera envuelto en una capa de algodón cubierta con polen de kiwi en los tarsos del primer par de patas. c) **Procedimiento no pareado (NP).** El olor se presentó pareado a la sacarosa (15% p/p) pero no pareado a la presentación del polen. d) **Procedimiento pareado con celulosa (PC).** El olor se presentó pareado a la sacarosa (15% p/p) y a la celulosa. e) **Extinción.** La extinción de las memorias se evaluó tras la sola presentación del EC.

3.2.4.2 Experimento 3.2 Adquisición y retención de memorias en forrajeras de polen y néctar al inicio de la visita de forrajeo

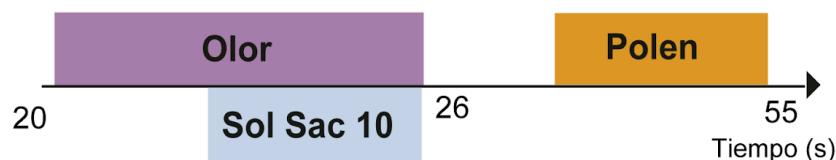
Las memorias olfativas se formaron durante 5 eventos de adquisición usando solución de sacarosa 10% p/p como recompensa, seguido de dos eventos de retención. Durante la adquisición, el EC fue presentado i) pareado a sacarosa + polen (PP) y ii) pareado a sacarosa + no pareado al polen (NP). Además, se puso a prueba si el tipo de recolectora y el tipo de recompensa afectan las memorias olfativas 24 horas después del entrenamiento. Para esto, los grupos de abejas condicionadas fueron alimentados hasta saciarse con solución de sacarosa y después se mantuvieron en la incubadora por 24 horas. Los ensayos de retención consistieron en dos eventos al azar: en el primero se presentó el estímulo condicionado (LIO 0,1M; EC) seguido de la presentación del estímulo olfativo novedoso (NONA 0,1M; EN) con un intervalo de 20 minutos y sin recompensa de sacarosa (Figura 3.4). Evaluamos a los 4 grupos de forrajeras al inicio de la visita: Forrajeras de polen bajo el protocolo pareado (n=38) y no pareado (n=49); forrajeras de néctar bajo el protocolo pareado (n=36) y no pareado (n=44).



b Procedimiento pareado (PP)



c Procedimiento no pareado (NP)



d Retención

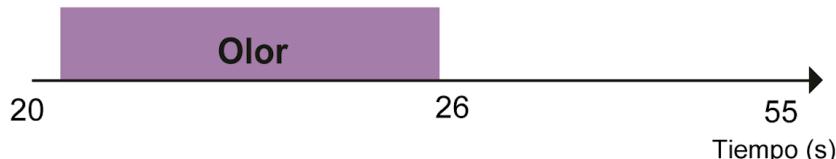


Figura 3.4 Experimento 3.2 a) Protocolo general. Las abejas fueron condicionadas olfativamente a 5 eventos de adquisición y a 2 eventos de retención. Cada evento duró 55 segundos con un intervalo de 20 min entre eventos. **b) Procedimiento pareado (PP).** La estimulación consistió en la presentación del olor recompensado (LIO; EC+) en la antena pareado a solución de sacarosa (10%p/p) en la probóscide y al contacto de un palillo de madera envuelto en una capa de algodón cubierta con polen de kiwi en los tarsos del primer par de patas. **c) Procedimiento no pareado (NP).** El olor se presentó pareado a la sacarosa (10%p/p) pero no pareado al polen. **d) Retención.** Pusimos a prueba la retención de memorias 24 horas después del entrenamiento. Presentamos, al azar, el olor

recompensado (LIO) o el olor novedoso (NONA) con un intervalo de 20 min entre eventos. Cada evento duró 55 segundos.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en R (<http://www.R-project.org/>). Analizamos la REP mediante modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) asumiendo una distribución Bernoulli. Se utilizó la función “glmer” del paquete ‘lme4’ (Bates *et al.*, 2015). La significancia de los factores fue determinada mediante la prueba de *chi-cuadrado de Wald* a través de la función Anova del paquete ‘car’ (Fox, 2019). Se asignaron valores de 1 cuando se produjo la REP y valores de 0 cuando no ocurrió. Analizamos la proporción de REP durante la adquisición de memorias teniendo en cuenta el tipo de recolectora (un factor de dos niveles correspondiente a recolectoras de polen y néctar), el tratamiento (un factor de dos niveles correspondiente a pareado con polen y no pareado con polen para el experimento 3.2, un factor de tres niveles correspondiente a pareado con polen, pareado con celulosa y no pareado con polen para el experimento 3.1,) y el evento (un factor de 4 niveles correspondientes a los eventos de entrenamiento para el experimento 3.2 y una variable continua para el experimento 3.1) como factores fijos. No usamos los datos de los 5 eventos de adquisición pues el primer evento siempre fue 0. Se incluyó el factor momento de la visita de forrajeo para el experimento 3.2 (un factor de dos niveles correspondiente a inicio y final) como efecto fijo. Las abejas individuales y los días experimentales se consideraron como efectos aleatorios para ambos experimentos. Se realizaron contrastes *post hoc* en los modelos para evaluar los efectos y la significancia entre los factores fijos utilizando la función "emmeans" del paquete 'emmeans' versión 1.4 (Lenth, 2019) con un nivel de significancia de 0,05.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Experimento 3.1 Adquisición y extinción de memorias en forrajeras de polen al inicio y al final de la visita de forrajeo

Para evaluar cómo el nivel de respuesta del polen cambia en función a la fase del ciclo de forrajeo condicioné olfativamente a las abejas forrajeras utilizando polen + sacarosa como recompensas. Para esto, capturé a forrajeras que llegaban al alimentador de polen (al inicio del ciclo de recolección) o que abandonan el alimentador (al final del ciclo de recolección) y a continuación procedí a condicionarlas olfativamente en el paradigma de la REP. Después del procedimiento de adquisición de memoria, puse a prueba la extinción de memorias mediante la presentación del olor solo, sin recompensa. El análisis de adquisición mostró que la proporción de REP fue influenciada por ambos, el momento del ciclo de recolección y el tipo de refuerzo ($\chi^2 = 17,4799$; $gl = 2$; $p = 0,00016$). Utilizando el refuerzo doble (PP), observé que las forrajeras de polen adquirieron las memorias olfativas igual cuando llegaban y cuando partían de la fuente (z ratio = 0,145; $gl = \text{Inf}$; $p = 1$). Sin embargo, cuando el olor se presentó pareado a la sacarosa pero no pareado al polen (NP), observamos que la adquisición (proporción de REP) era menor al inicio que al final de la visita, es decir cuando llegaban al alimentador que cuando lo dejaban después de recolectar (z ratio = -4,212; $gl = \text{Inf}$; $p = 0,004$). El desempeño durante la adquisición (proporción de REP) de ambos tipos de forrajeras, las que llegan y las que se van del alimentador, bajo el protocolo pareado con celulosa (CP) no mostró diferencias en comparación con el desempeño de las abejas que llegan evaluadas bajo el protocolo no pareado con polen (NP) (Inicio: z ratio = -1,630; $gl = \text{Inf}$; $p = 0,5784$; Final: z ratio = -0,357; $gl = \text{Inf}$; $p = 0,9992$).

Para la extinción de memorias, los análisis detectaron una interacción triple entre el momento del ciclo de forrajeo, el tratamiento y el evento ($\chi^2 = 7,9720$; gl = 2; p = 0,018). Como para la adquisición de memorias, las forrajeras de polen con el doble refuerzo extinguieron sus memorias olfativas de igual manera cuando llegaban que cuando abandonaban la fuente (z ratio = -0,733; gl = Inf; p = 0,977). El desempeño (proporción de REP) durante la extinción de memorias bajo el procedimiento no pareado fue menor cuando las abejas llegaban que cuando partían (z ratio = -5,002; gl = Inf; p < 0,001). Cuando las abejas llegaban al alimentador, la extinción de memorias de las abejas condicionadas para el procedimiento pareado con polen (PP) era mayor que las abejas condicionadas bajo el procedimiento no pareado con polen (NPP) (z ratio = -5,9; gl = Inf; p < 0,001) y que de las abejas condicionadas bajo el procedimiento pareado con celulosa (z ratio = -3,123; gl = Inf; p = 0,0221). Nuestros resultados indican que la contribución del polen como recompensa en la adquisición y retención de memorias es más importante cuando las abejas llegan a la fuente (están altamente motivadas por recolectar el recurso) que cuando abandonan la fuente después de terminar la recolección (Figura 3.5).

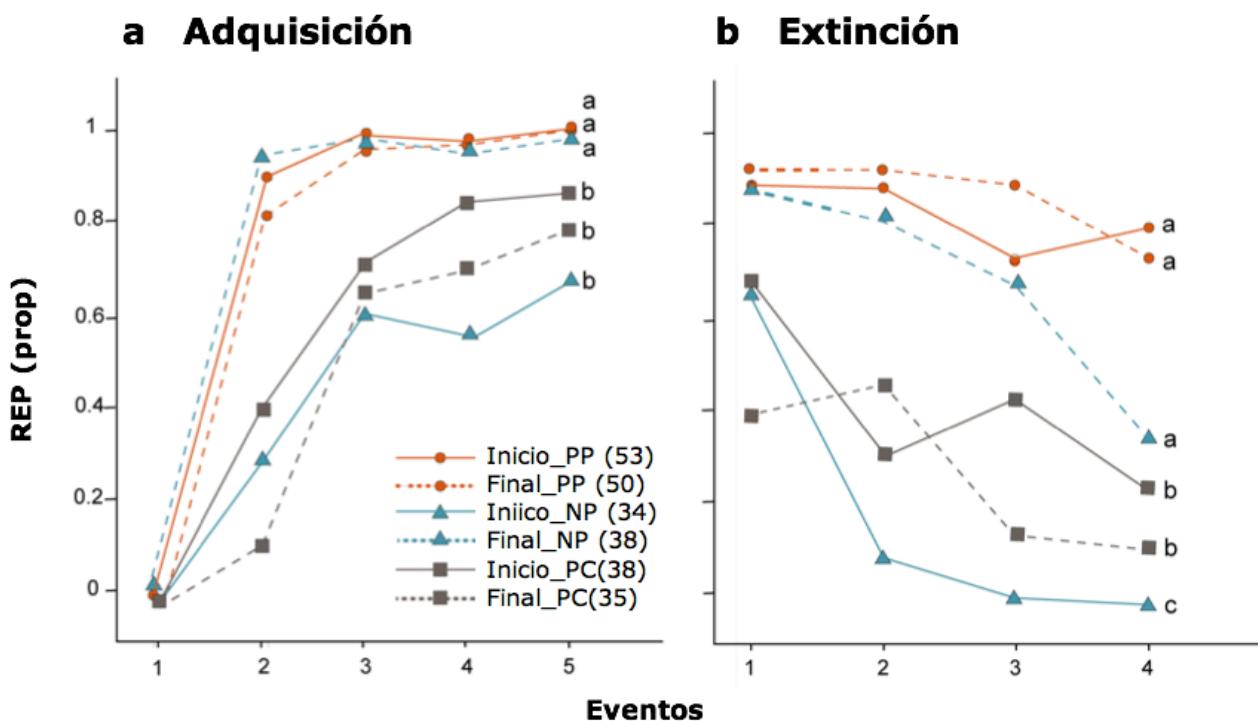


Figura 3.5. Experimento 3.1. Proporción de REP (prop) de abejas forrajeras de polen durante 5 eventos de adquisición (**a**) y 4 eventos de extinción (**b**), cuando las forrajeras llegaban al alimentador (líneas sólidas) o lo dejaban (líneas punteadas). El polen fue utilizado como refuerzo de manera pareada (PP; línea anaranjada con círculos) o no pareada (NP; línea azul con triángulos) a la presentación de solución de sacarosa. Celulosa (PC; línea gris con cuadrados) fue utilizada en lugar de polen pareado a la solución de sacarosa. Las distintas letras indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$). El tamaño de la muestra se indica en paréntesis.

3.4.2 Experimento 3.2 Adquisición y retención de memorias en forrajeras de polen y néctar al inicio de la visita de forrajeo

El análisis para la adquisición detectó diferencias significativas entre tratamientos ($\chi^2=33,7811$; $gl=3$; $p=2,204e-07$) así como una interacción entre el tipo de forrajera y el tratamiento ($\chi^2=7,7825$; $gl=1$; $p=0,005276$). Cuando utilizamos el polen pareado a la sacarosa

como refuerzo (PP), observamos que las forrajeras de polen se desempeñan de manera similar a las forrajeras de néctar durante el condicionamiento (z ratio=-1,526; gl =Inf; $p=0,4219$; Fig. 3.6a). Sin embargo, cuando el polen se presentó de manera no pareada a la sacarosa (NP) observamos que las abejas recolectoras de néctar se desempeñaban mejor ($>$ proporción de REP) que las recolectoras de polen (z ratio=2,861; gl =Inf; $p=0,0219$; Fig. 3.6a). La proporción de REP durante la adquisición de memorias en abejas forrajeras de polen bajo el procedimiento pareado fue mayor que bajo el no pareado (z ratio=4,020; gl =Inf; $p=0,0003$; Figura 3.6a). Sin embargo, el desempeño durante la adquisición en las forrajeras de néctar bajo el protocolo pareado fue similar que el desempeño bajo el procedimiento no pareado (z ratio=1,069; gl =Inf; $p=0,7082$; Figura 3.6b). Finalmente, nuestro análisis detectó diferencias significativas en la retención de memorias olfativas entre el olor condicionado (LIO) y el olor novedoso (NONA) ($\chi^2 = 5,5047$; gl =1; $p =0,01897$), sin ninguna diferencia relacionada al tipo de forrajera ($\chi^2=0,9922$; gl=1; $p=0,3191$) o al tratamiento ($\chi^2=0,3852$; gl=1; $p=0,5348$).

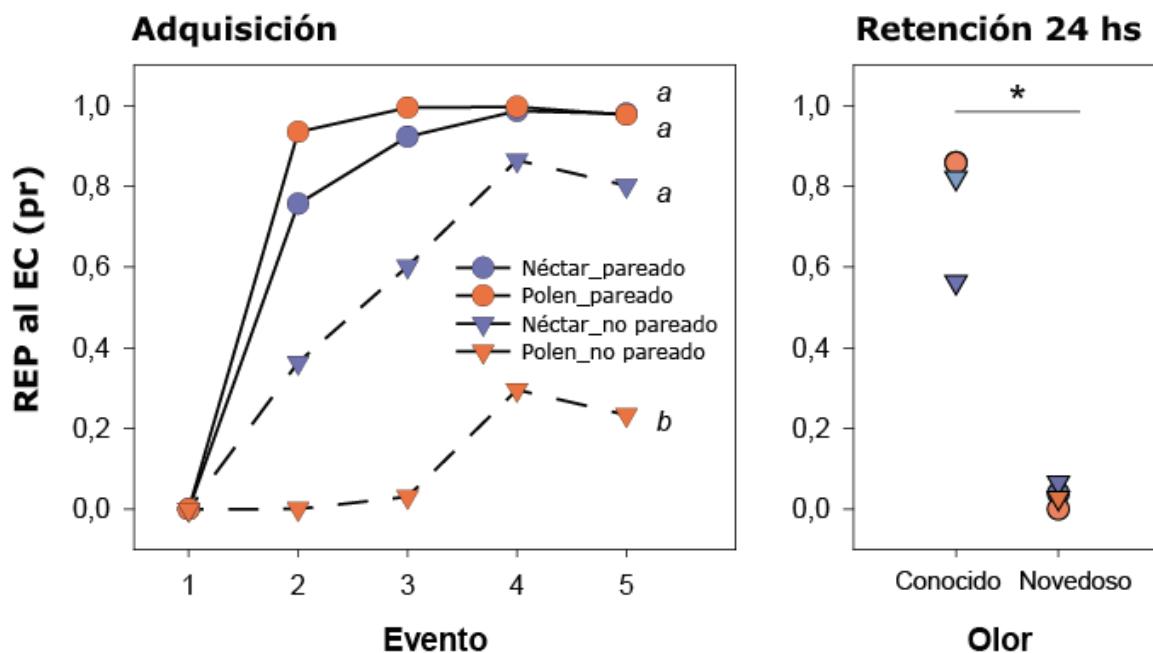


Figura 3.6. Experimento 3.2 Proporción de REP en forrajeras de polen (naranja) y néctar (azul) durante **(a)** adquisición y **(b)** retención de memorias olfativas. El polen fue utilizado de manera pareada (PP; círculos) o no pareada (NP; triángulos) con el olor (EC+). Las distintas letras indican diferencias estadísticas (* p <0,05). El tamaño de la muestra se indica en paréntesis.

3.5 DISCUSIÓN

Las diferencias interindividuales en los niveles de respuesta y aprendizaje son fundamentales para la asignación de tareas en las colonias de *A. mellifera*. Aquí, observé que las forrajeras de polen y néctar muestran diferencias en su desempeño durante un condicionamiento olfativo de la REP según el momento de la visita de forrajeo y el tipo de recompensa que las forrajeras desean recolectar.

Cuando ambos grupos de forrajeras son capturados al inicio de la visita de forrajeo, las recolectoras de polen muestran un desempeño de adquisición y retención más bajo que las forrajeras de néctar durante un condicionamiento que usaba sacarosa como recompensa (NP) (Exp 3.2; Figura 3.6). No obstante, cuando el polen se presentó como co-refuerzo a la sacarosa (PP), las forrajeras de polen mejoraron su desempeño durante el condicionamiento a niveles similares a los logrados por las forrajeras de néctar, mientras que las forrajeras de néctar no cambiaron su desempeño ante la presencia de polen (Exp 3.2. Figura 3.6), lo que sugiere que el polen no es percibido de la misma manera por ambos tipos de forrajeras. En este sentido, bajo condiciones de saciedad similares (recolectoras de polen que llegan a la colmena y recolectoras de néctar que llegan a un alimentador), Nery y colaboradores (2020) observaron que, durante un condicionamiento olfativo donde se utilizaba polen como co-refuerzo en los tarsos, las recolectoras de polen aprendieron mejor que las recolectoras de

néctar, diferencias que no se detectaron cuando las forrajeras fueron condicionadas solo con sacarosa como recompensa (Nery *et al.*, 2020)

Dentro del grupo de forrajeras de polen, las abejas mejoraron su desempeño con polen (PP) cuando fueron capturadas al inicio de la visita de forrajeo en comparación a cuando fueron capturadas al final de la visita (Exp 3.1; Figura 3.5a). Esto sugiere que la contribución del polen como recompensa para las recolectoras de polen es mayor al llegar, que al abandonar la fuente. Es interesante notar que la presentación de celulosa también mejoró el rendimiento de las abejas al llegar al alimentador (evidenciado principalmente durante la extinción de la memoria (Exp 3.1; Figura 3.5b), lo que sugiere que una estimulación táctil con partículas inertes de tamaño similar a los granos de polen también se percibe como un estímulo excitatorio.

Polen como recompensa para las forrajeras

Si consideramos que el polen podría ser percibido como una recompensa para las abejas recolectoras de polen, es importante determinar qué aprenden las abejas acerca del polen. Las claves relacionadas con el polen, como colores, texturas, sabores e incluidos sus olores, pueden atraer a las recolectoras de forma innata (Dobson y Bergstrom, 2000), y/o después de ser aprendidas a partir de la dieta que consumen desde edades tempranas dentro del nido (Arenas y Farina, 2014). La mayoría de los estudios que abordan la percepción, el aprendizaje y la memoria en las abejas de la miel han utilizado la sacarosa como recompensa, con solo un número limitado de estudios que investigan el papel del polen como refuerzo (Grüter *et al.*, 2008; Arenas y Farina, 2012; 2014; Nicholls y Hempel de Ibarra, 2013). A pesar de la escasa evidencia, tanto el polen como el néctar han sido frecuentemente considerados como refuerzos equivalentes.

Mientras que las vías de recompensa del azúcar operan tanto antes como después de la ingestión (Sandoz *et al.*, 2002; Muth *et al.*, 2018), es menos probable que el polen actúe a través de la ingestión, ya que las abejas forrajeras rara vez consumen polen debido a su incapacidad para digerirlo (Moritz y Crailsheim, 1987). Mis hallazgos experimentales demostraron que el polen presentado en los tarsos mejora el desempeño durante el aprendizaje en las forrajeras de polen, lo que indica que funciona como un refuerzo a través de la estimulación quimiotáctil pre-ingestiva de los receptores de los tarsos. Hasta ahora, se conoce poco sobre cómo las abejas detectan los distintos componentes del polen que las estimulan, tales como proteínas, aminoácidos, lípidos o ácidos grasos (Kim y Smith, 2000; Pernal y Currie, 2001; 2002; Arenas y Farina, 2012).

Solo se han identificado 13 genes de receptores gustativos en *A. mellifera* (Robertson y Wanner, 2006), lo cual es relativamente bajo en comparación con los 25 genes de receptores gustativos detectados en el abejorro *Bombus terrestris* (Sadd *et al.*, 2015) que ha demostrado habilidades para seleccionar polen de mayor calidad mediante la evaluación individual de señales quimiotáctiles (Ruedenauer *et al.*, 2015; 2019). Es probable que componentes nutricionales (Pernal y Currie, 2002) y/o componentes no nutricionales del polen (Lepage y Boch, 1968; Schmidt, 1985) puedan ser percibidos como refuerzo durante el aprendizaje. Estudios que utilizaron claves relacionadas con el polen como estímulos condicionados (Cook *et al.*, 2005; Ruedenauer *et al.*, 2018; Pietrantuono *et al.*, 2019) determinaron que las abejas pueden percibir tanto claves quimiotáctiles como olfativas del polen, y podrían utilizarlas para diferenciar entre tipos de pólenes. Se necesitan más estudios para investigar el mecanismo a través del cual estos estímulos son procesados y codificados en el cerebro de las abejas. Nuestros resultados sugieren que en los tarsos de las patas delanteras, las abejas recolectoras de polen tienen receptores que detectan claves relacionadas con el polen. Sería muy interesante buscar receptores candidatos en los tarsos de las

recolectoras de polen y néctar, y correlacionar su presencia o densidad con la predisposición recolectora de la abeja (Riveros y Gronenberg, 2010; Russell *et al.*, 2017).

Al igual que para el néctar, las abejas recolectoras también extienden su probóscide cuando son estimuladas con polen (Scheiner *et al.*, 2004; Arenas and Farina, 2012; Grüter *et al.*, 2008); sin embargo, esta respuesta no es estable, y las abejas dejan de responder al polen después de unos pocos eventos. Con el protocolo de doble refuerzo logré obtener una respuesta estable durante un condicionamiento olfativo, sin embargo, la REP podría no ser el paradigma más apropiado para evaluar respuestas relacionadas con la recolección de polen, ya que la REP es una respuesta estrechamente asociada con la ingesta de alimento líquido. Hasta ahora, y aunque las abejas utilicen la probóscide y las mandíbulas para la recolección de polen, sigue siendo objeto de debate si la información aprendida con el polen puede ser evocada a través de la REP. Por lo tanto, no descartamos la posibilidad de que haya otros procedimientos más adecuados para explorar la sensibilidad al polen en las abejas de la miel.

Los resultados de estos experimentos, en conjunto, respaldan la predicción de que el polen provoca respuestas más intensas en las abejas especializadas en la recolección de polen que en aquellas especializadas en la recolección de néctar. Esta respuesta diferencial a los estímulos recompensantes de las flores podría permitir una mejor adquisición y retención de las claves ambientales que predicen la presencia del recurso deseado (Scheiner *et al.*, 2001a; 2001b; 2005), aumentando así la eficiencia de forrajeo.

CAPÍTULO 4

Aprendizaje no asociativo con distintos estímulos florales.



Foto: Alex Wild

4.1 INTRODUCCIÓN

El aprendizaje es crucial para cualquier animal, ya que permite adaptar su comportamiento a entornos cambiantes (Giles y Rankin, 2009). Los procesos de aprendizaje pueden agruparse en dos categorías principales: aprendizaje no asociativo (por ejemplo, sensibilización, habituación) y aprendizaje asociativo (por ejemplo, condicionamiento). El aprendizaje no asociativo es el resultado de la exposición repetida del animal a un determinado estímulo (o evento). La habituación es un tipo de aprendizaje no asociativo que permite filtrar los estímulos irrelevantes. Cuando un individuo se enfrenta a un estímulo repetitivo sin ninguna consecuencia, ese estímulo se vuelve irrelevante. Durante la habituación, la presentación repetida del estímulo incondicionado (EI) conduce a una reducción gradual en la intensidad o probabilidad de una respuesta (Thompson y Spencer, 1966). El sistema nervioso abarca un espectro de respuestas conductuales producto de la habituación, que van desde reflejos básicos hasta la liberación de hormonas o la modulación de la actividad de neuronas motoras (Rakin *et al.*, 2009). Por lo tanto, este tipo de aprendizaje tiene un valor adaptativo importante al evitar que los animales continúen respondiendo a estímulos que carecen de verdadero significado biológico (Rakin *et al.*, 2009).

La habituación se distingue de la simple fatiga o de la adaptación sensorial porque la respuesta habituada puede restaurarse a sus niveles iniciales mediante la presentación de los mismos estímulos a intensidades más altas, o con una estimulación novedosa equivalente, un proceso conocido como deshabitación (Thompson y Spencer, 1966). En las abejas de la miel, la presentación repetida de una solución de sacarosa de baja concentración induce la habituación de la REP. A su vez, la habituación de la REP puede ser deshabitada mediante la presentación de una solución de sacarosa de mayor concentración (Scheiner, 2004). Es importante destacar que, el grado de habituación en las abejas de la miel se correlaciona con

su sensibilidad a la sacarosa: las abejas forrajeras, altamente sensibles a la sacarosa, muestran menos habituación y un mayor grado de deshabitación en comparación con abejas pre forrajeras, con menor sensibilidad a la sacarosa (Scheiner, 2004). Hasta ahora, no hay evidencia disponible sobre el papel del polen como estímulo habituante o deshabitante. Además, no se han explorado posibles diferencias en el grado de habituación y/o deshabitación entre las recolectoras de polen y néctar.

Dado que la respuesta a las recompensas de néctar y polen está influenciada por el estado interno de la abeja, el cual resulta de la interacción entre la fase de la visita de forrajeo y su predisposición a recolectar néctar o polen, mi objetivo es investigar las diferencias en el desempeño durante el aprendizaje no asociativo que podrían contribuir a la división del trabajo entre los distintos tipos de abejas forrajeras. Con este fin, investigué la habituación y deshabitación de abejas recolectoras capturadas al comienzo de su visita de forrajeo, un momento crítico ya que la sensibilidad gustativa de la abeja está ajustada para favorecer la recolección de polen o néctar. Para esto, sometimos a las recolectoras a la habituación de la REP utilizando diversas combinaciones de concentraciones de sacarosa y sacarosa + polen como estímulos.

Evaluaremos la hipótesis de que el desempeño durante la habituación y la deshabitación, el cual está determinado por la sensibilidad a la recompensa, depende de la predisposición de las abejas por recolectar néctar o polen. Predigo que las recolectoras de polen mostrarán una reducción de la habituación ($>$ proporción REP) y un mayor grado de deshabitación ($>$ proporción REP) que las recolectoras de néctar cuando el polen participe como co-refuerzo de la sacarosa, ya que serían más sensibles al polen, el que actuaría como un estímulo excitatorio entre las recolectoras de polen pero no entre las de néctar.

4.2 METODOLOGÍA

Realicé el experimento durante las temporadas de verano 2022-2023 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina ($34^{\circ}32'S$, $58^{\circ}26'W$). Llevé a cabo todos los ensayos siguiendo las pautas de cuidado animal del Instituto Nacional de Salud (1985) y las leyes vigentes de Argentina. Utilicé abejas europeas *A. mellifera* ligustica.

4.2.1 Abejas

Entrené a las obreras para que visitaran una estación de forrajeo al inicio y al final de su visita de forrajeo, al igual que indiqué en capítulos anteriores.

4.2.2 Habitación de la REP

Habituamos la REP de las abejas forrajeras utilizando un procedimiento que consistía en la presentación repetida de 25 eventos de i) solución de sacarosa 10% p/p en ambas antenas pareado con el contacto en el primer par de tarsos de un palillo de madera envuelto en una capa de algodón y cubierto con polen de kiwi recolectado a mano (S10% + P) o ii) solución de sacarosa 10% p/p en ambas antenas (S10%) pareado con el contacto de un palillo de madera envuelto en una capa de algodón limpia como control de la estimulación mecánica (Figura 4.1)

Las abejas no fueron alimentadas durante el procedimiento. La presentación de cada evento duró 1 segundo y fue seguida de un intervalo entre eventos sucesivos de 10 segundos. Cuando ocurría la REP, le asignamos valores de 1, y cuando no ocurría le asignamos valores

de 0. Después de 25 eventos de habituación esperamos 2 minutos antes de empezar con 5 eventos de deshabitación

Analizamos a 4 grupos de abejas: forrajeras de polen bajo el protocolo de sacarosa + polen (n=36) y sacarosa sola (n=38); forrajeras de néctar bajo el protocolo de sacarosa + polen (n=35) y sacarosa sola (n=44).

4.2.3 Deshabitación de la REP

Los ensayos de deshabitación que se realizaron en abejas habituadas con sacarosa 10% p/p + polen consistieron en la presentación repetida (5 eventos) de i) solución de sacarosa 50% p/p + polen (S50% + P) o ii) solución de sacarosa sola 50% p/p (S50%). Finalmente, la deshabitación en las abejas habituadas con solución de sacarosa 10% p/p consistió en la presentación de i) solución de sacarosa 10% p/p + polen (S10% + P) o ii) solución de sacarosa sola 50% p/p (S50%; Figura 4.1).

La razón para poner a prueba abejas habituadas con S10% p/p versus S50% p/p fue establecer el nivel de deshabitación producto de un incremento en la concentración de sacarosa. Por otro lado, la presentación de S10% + P nos permitió cuantificar las propiedades deshabitantes del polen al “cancelar” el efecto de la sacarosa. Dentro del grupo de abejas habituadas con S10% + P, los ensayos S50% y S50% + P nos permitieron poner a prueba en qué medida la sacarosa era suficiente para deshabituar abejas habituadas con polen.

Analizamos a 8 grupos de abejas: el grupo forrajeras habituadas con S10 + P se dividió en 2 subgrupos, las deshabitadas con sacarosa 50 + polen (polen_n=18; néctar_n=18) o con sacarosa 50 (polen_n=18; néctar_n=17). El grupo de forrajeras habituadas bajo el protocolo sacarosa 10 fueron se dividió también en 2 subgrupos, las

deshabituadas con sacarosa 10 + polen (polen_n=21; nectar_n=20) o con sacarosa 50 (polen_n=17; nectar_n=23).

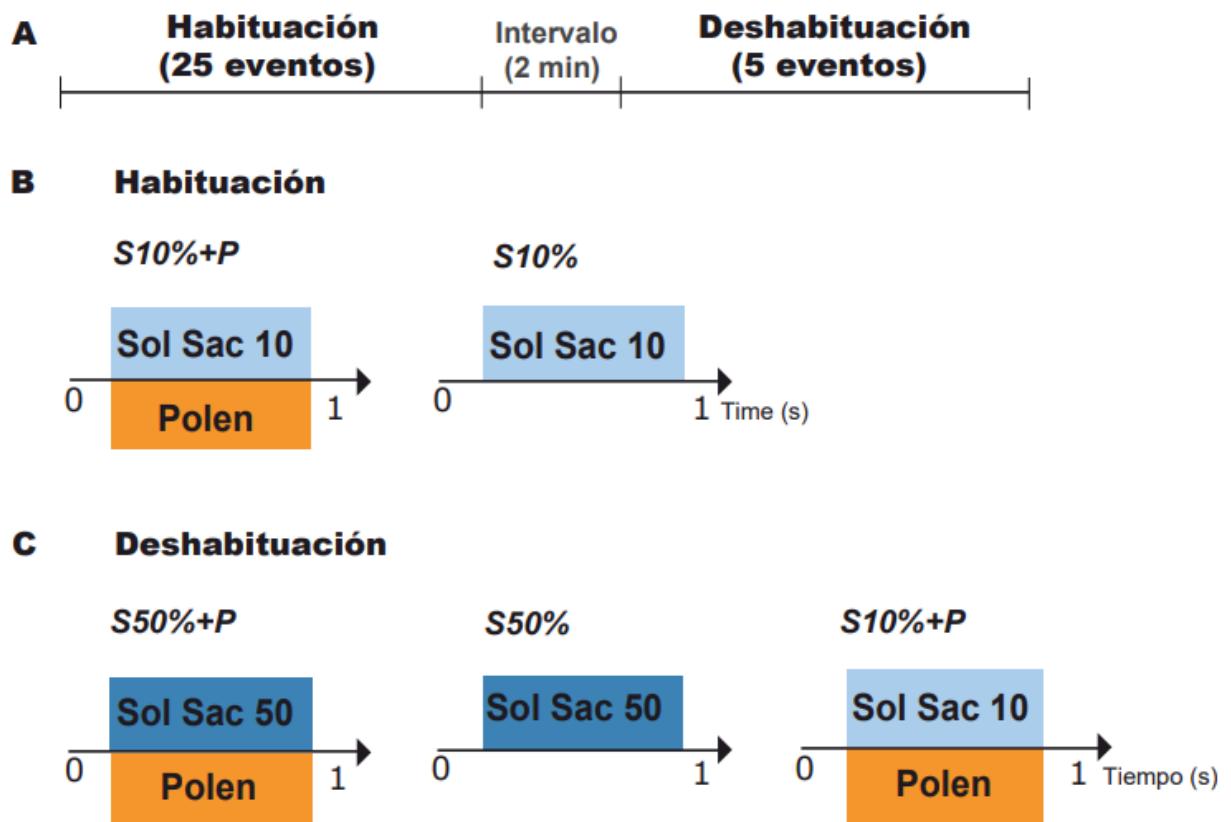


Figura 4.1 a) Protocolo de aprendizaje no asociativo. Las abejas forrajeras fueron sometidas a 25 eventos de habituación seguidos de 5 eventos de deshabituación. Cada evento duró 1 segundo y fue seguido de un intervalo entre eventos de 10 segundos. **b) Protocolo de habituación: Sacarosa + polen (S10%+P).** Cada evento de habituación de la serie S10%+P consistió en la presentación de solución de sacarosa 10% p/p en ambas antenas pareada con el contacto de un palillo (envuelto en una capa de algodón) cubierto de polen en los tarsos del primer par de patas. **Sacarosa (S10%).** Cada evento de habituación de la serie S10% consistió en la presentación de solución de sacarosa 10% p/p en ambas antenas pareado con el contacto de un palillo de madera envuelto en una capa de algodón limpia como control para la estimulación mecánica. **c) Protocolo de deshabitación: Protocolo en**

abejas habituadas con S10%+P. Cada evento de deshabitación para abejas habituadas en la serie **S10%+P** consistió en la presentación de solución de sacarosa 50% + polen (S50%+P) o solución de sacarosa 50% sola (S50%). **Protocolo en abejas habituadas con S10%.** Cada evento de deshabitación para abejas habituadas en la serie **S10%** consistió en la presentación de solución de sacarosa 10% + polen (S10%+P) o solución de sacarosa 50% sola (S50%).

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Analizamos la proporción de REP por medio de modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) asumiendo una distribución binomial y usando la función “glmer” del paquete ‘lme4’ (Bates *et al.*, 2015). Utilizamos la proporción de los 25 eventos de habituación juntos como variable respuesta. Consideramos al tipo de forrajera (un factor de dos niveles que corresponden a forrajeras de polen y de néctar) y tratamiento (un factor de dos niveles que corresponde al estímulo habituante: S10% y S10% + P) como efectos fijos. Cada día experimental fue considerado como efecto aleatorio.

Para la deshabitación, utilizamos la proporción de los 5 eventos juntos como la variable respuesta y la proporción del tratamiento de habituación como covariable. Analizamos de manera separada las abejas habituadas con S10% de las abejas habituadas con S10% + P. Para el primer grupo (S10%), consideramos tipo de forrajera (un factor de dos niveles que corresponden a forrajeras de polen y de néctar) y estímulo deshabitante (un factor de dos niveles que corresponde a S10% y S10% + P) como efectos fijos. Para el segundo grupo (S10% + P), consideramos al tipo de recolectora (un factor de dos niveles que corresponde a recolectoras de néctar y polen) y al estímulo deshabitante (un factor de dos niveles que corresponde a S50% y S50% + P) como efectos fijos. Cada día experimental fue

considerado como efecto aleatorio. Se realizaron contrastes *post hoc* en los modelos de ambos experimentos para evaluar los efectos y la significancia entre los factores fijos mediante la función “emmeans” del paquete ‘emmeans’ versión 1.4 (Lenth, 2019) con un nivel de significancia del 0,05.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Habitación de la REP

Al evaluar la habitación en recolectoras de polen y de néctar observamos una disminución en la proporción de REP a lo largo de los 25 eventos de habitación en ambos grupos (Fig 4.2a). La habitación ocurrió más rápido en abejas habituadas con S10% + P que en abejas habituadas con S10%. Consistentemente, nuestro análisis para habitación detectó una interacción entre el tipo de recolectora y el tipo de refuerzo ($\chi^2 = 6,3244$; gl = 1; p = 0,011). Cuando usamos S10% + P como estímulo, las forrajeras de polen se habituaron menos (mostraron una proporción de REP mayor) que las forrajeras de néctar (z ratio = -3,872; gl = Inf; p = 0,0001; Figura 4.2b), mientras que la proporción de REP ante la estimulación con S10% fue similar entre ambos tipos de forrajeras (z ratio = -0,452; gl = Inf; p = 0,6512; Figura 4.2b).

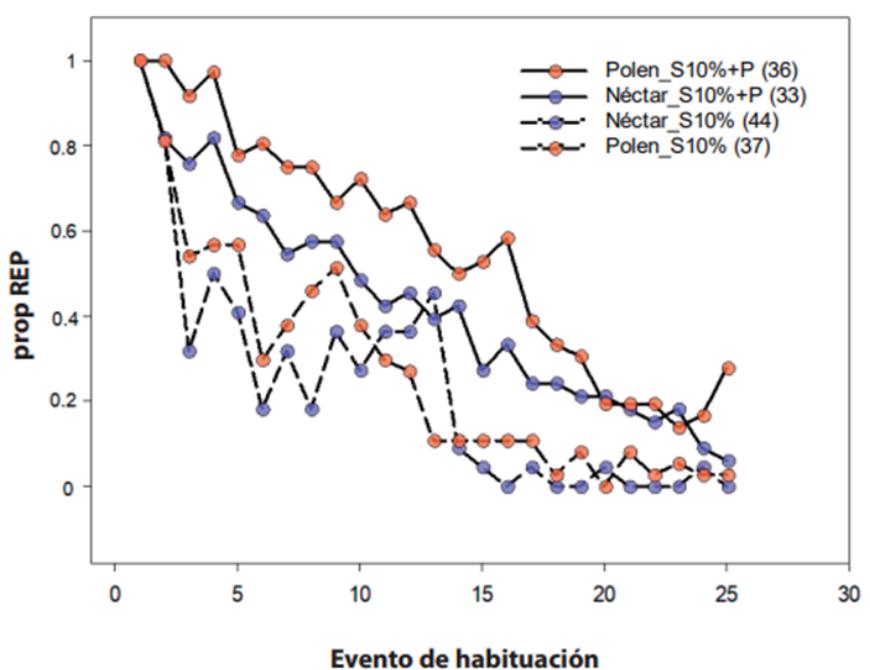
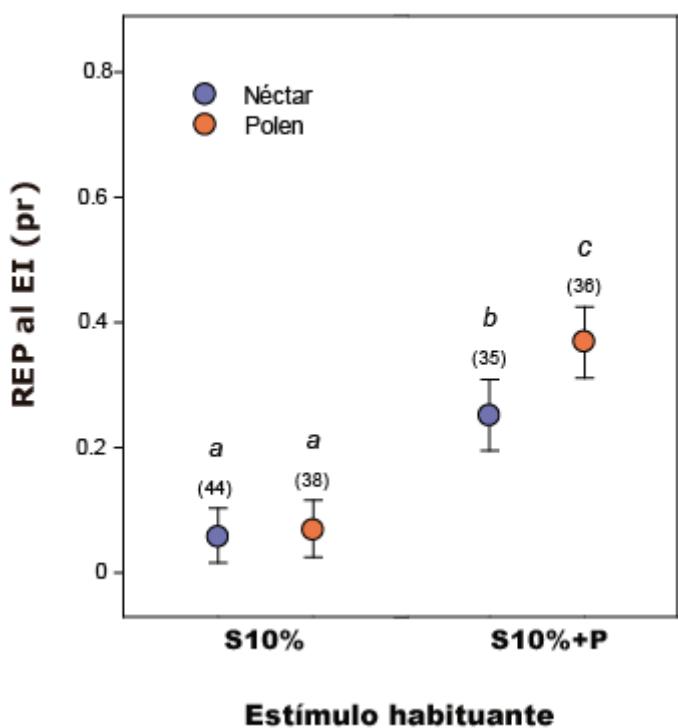
a**b**

Figura 4.2. Habitación de la REP. **a)** Proporción de REP a lo largo de 25 eventos de habitación (datos observados) en forrajeras de polen (naranja) y néctar (azul). Utilizamos solución de sacarosa + polen como estímulos. **b)** Proporción de REP de todos los eventos de habitación en forrajeras de polen (naranja) y néctar (azul). Los círculos indican los valores medios (predichos por el modelo) y las barras muestran los intervalos de confianza del 95%. Las distintas letras indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$). El tamaño de la muestra se indica en paréntesis.

4.4.2 Deshabitación de la REP

En los análisis de deshabitación para las abejas habituadas con S10% detectamos una interacción entre el tipo de recolectora y el estímulo deshabitante ($\chi^2 = 3,84$; $gl = 1$; $p = 0,049$). Nuestro análisis detectó que el desempeño durante la deshabitación de las recolectoras de polen y las de néctar eran similares cuando usamos S50% (z ratio = -1,78; $gl=Inf$; $p = 0,073$). Sin embargo, el desempeño durante la deshabitación de las recolectoras de polen fue mayor que el de las recolectoras de néctar cuando utilizamos S10% + P (z ratio = -5,305; $gl = Inf$; $p < 0,0001$) mostrando la relevancia del polen como estímulo excitatorio en las recolectoras de polen. Los análisis de deshabitación en abejas habituadas con S10% + P no detectaron diferencias entre los tipos de forrajeras ($\chi^2 = 0,45$; $gl = 1$; $p = 0,5012$) o entre los estímulos deshabitantes ($\chi^2 = 0,0003$; $gl = 1$; $p = 0,98$; Figura 4.3).

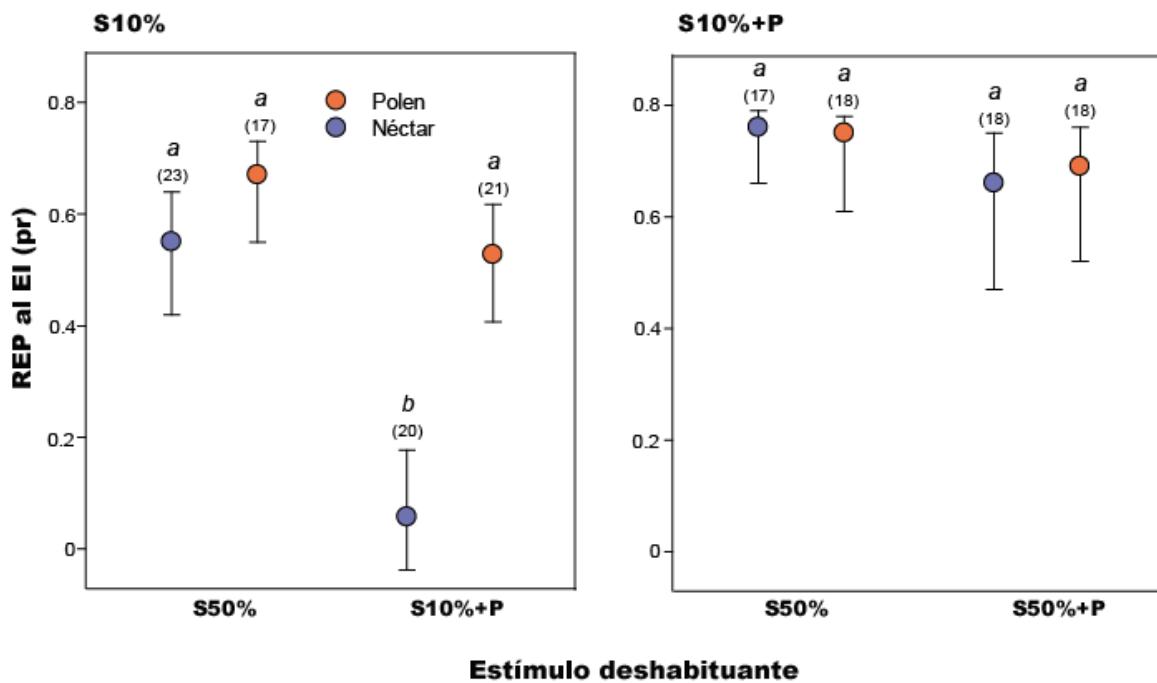


Figura 4.3 Deshabitación de la REP. Proporción de REP de 5 eventos de deshabitación (predichos) en forrajeras de polen (naranja) y néctar (azul) habituadas con S10% (izquierda) y con S10%+P (derecha). Los círculos indican los valores medios (predichos por el modelo) y las barras muestran los intervalos de confianza del 95%. Las distintas letras indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$). El tamaño de la muestra se indica en paréntesis.

4.5 DISCUSIÓN

Las diferencias interindividuales en la capacidad de responder y aprender son fundamentales para la asignación de tareas en la colonia. En este sentido, los individuos participan en tareas mediadas por estímulos ante los que muestran una sensibilidad aumentada (Robinson y Page, 1989; Beshers y Fewell, 2001; Pérez *et al.*, 2013; Balbuena y Farina, 2020; Mattiacci, 2023). Como mencionamos en el capítulo anterior, las recolectoras de polen y néctar muestran diferencias en su desempeño durante el aprendizaje asociativo

según el tipo de recompensa ofrecida (Capítulo 3). Estas diferencias en la respuesta a los estímulos recompensantes del polen podría permitir una mejor adquisición y retención de las claves ambientales que predicen la presencia del recurso deseado (Scheiner *et al.*, 2001a; 2001b; 2005), aumentando así la eficiencia de forrajeo. De manera consistente, durante el aprendizaje no asociativo, las recolectoras de polen mostraron una habituación disminuida y una deshabitación aumentada en comparación con las recolectoras de néctar cuando el polen participaba como estímulo habituante y/o deshabitante. Nuestros resultados sugieren que el ajuste de la sensibilidad a la recompensa deseada permite que los individuos amplifiquen (o filtre) la información que es importante (o no) para realizar cierta tarea.

Al igual que en el aprendizaje asociativo, la habituación también muestra una correlación con la sensibilidad a la sacarosa, siendo las abejas más sensibles a la sacarosa las que se habitúan a una tasa más baja (Scheiner, 2004). Además, las recolectoras de polen mostraron un menor grado de habituación que las recolectoras de néctar y un mayor grado de deshabitación si el polen participaba como refuerzo adicional. Sin embargo, algunos resultados no estuvieron completamente alineados con lo se esperaba. Por ejemplo, la habituación a una solución de sacarosa al 10% p/p (S10%) no fue menor (fue similar) entre las recolectoras de néctar y de polen. La probabilidad de respuesta a una solución de sacarosa al 10% p/p se estimó en alrededor de 0,1 para las recolectoras de polen y 0,3 para las recolectoras de néctar al llegar a la fuente de alimento (Figura 2.1, Capítulo 2). Esta diferencia, dependiendo de la variabilidad de los datos, podría no ser lo suficientemente sustancial como para producir un impacto en la habituación. Realizar más experimentos de habituación utilizando un rango más amplio de concentraciones podría mejorar la precisión experimental para detectar estas diferencias entre los tipos de recolectoras. Del mismo modo, la falta de diferencias en la respuesta al tratamiento de sacarosa al 50% p/p durante la

deshabituación podría atribuirse al hecho de que ambos grupos de recolectores exhiben probabilidades de respuesta similares (cerca de 0,85) cuando se les presenta una solución de sacarosa altamente concentrada (Figura 2.1, Capítulo 2).

Polen como recompensa para las forrajeras

El valor como recompensa de una fuente de polen puede ir más allá de la evaluación quimiotáctil del recurso en tarsos y antenas, sino que también puede incluir el éxito con el que las abejas acumulan polen en las corbículas (Ford *et al.*, 1981). El éxito o eficiencia de la recolección podría medirse a través del volumen que alcanzan las cargas de polen dentro de las corbículas. De esta manera el desplazamiento de las setas individuales en la superficie externa de la tibia de las patas traseras (Ford *et al.*, 1981), podría funcionar como sensores capaces de medir el tamaño de la carga de polen en formación. Aunque la importancia del desplazamiento de las setas como refuerzo aún debe investigarse, es posible que después de la estimulación quimiotáctil de las antenas y tarsos durante la visita de forrajeo, la ausencia de polen en las corbículas sea un factor clave que desmotiva a las forrajeras a continuar recolectando, que lleve a la devaluación de la fuente de polen y por ende, conduzca a la habituación. Por otro lado, los resultados me permiten especular que las recolectoras de néctar se habituarían con mayor facilidad que las de polen a la presencia de claves relacionadas con el polen. Este proceso sería funcional por ejemplo en especies de plantas como *Papaver*, *Rosa* y *Solanum* (Vogel, 1983) cuyas flores sólo ofrecen polen como recompensa. En el caso de fuentes que ofrecen ambos recursos, las recolectoras de néctar podrían beneficiarse de aprender las claves relacionadas con el polen como estímulos condicionados que se presentan recompensados con néctar y usarlos para guiar su comportamiento de búsqueda.

A pesar de que el aprendizaje no asociativo ha sido poco estudiado en contexto de la división del trabajo, las respuestas de habituación de las abejas frente a distintas recompensas florales sugieren que este proceso juega un rol importante en la especialización de la recolección. Dada la capacidad de las recolectoras de habituarse diferencialmente a los azúcares y al polen según su predisposición por recolectar uno u otro recurso, los resultados presentados en este capítulo sientan las bases para futuros estudios sobre la modulación de la respuesta de habituación en el contexto recolector.

CAPÍTULO 5

Sensibilidad olfativa en forrajeras de polen y néctar y su correlación con la especialización de tareas.



Foto: Alex Wild

5.1 INTRODUCCIÓN

En la abeja *Apis mellifera*, la división del trabajo se ha relacionado principalmente con diferencias en la sensibilidad gustativa, como las encontradas entre forrajeras de polen y de néctar (Page y Fonrk, 1995; Page *et al.*, 1998 y Capítulo 2). Sin embargo, además de las claves gustativas, las fuentes de alimento pueden presentar otros estímulos sensoriales que, en mayor o menor medida, predicen la presencia del alimento. En este sentido, los olores son fundamentales para asistir la búsqueda y recolección y no se descarta que la regulación de las tareas de forrajeo puede estar relacionada con diferencias en su sensibilidad (Scheiner *et al.*, 2004).

Más allá de las respuestas innatas que pueden desencadenar ciertos volátiles, los olores son relevantes para mejorar la eficiencia de forrajeo cuando se asocian con la recompensa que ofrece la fuente (Ribbands, 1955; Koltermann; 1969; Barth, 1985; Wenner y Wells, 1990; Menzel, 1999; Arenas *et al.*, 2007; Arenas y Farina, 2008; Arenas y Farina, 2012). Durante el condicionamiento olfativo, tanto el nivel de respuesta al olor (el estímulo condicionado; EC) como el nivel de respuesta a la recompensa (el estímulo incondicionado; EI) son factores importantes que determinan el rendimiento de un individuo (Rescorla y Wagner, 1972; Pelz *et al.*, 1997). Sin embargo, aún no se ha estudiado en qué medida las diferencias en el desempeño de recolectoras de polen y néctar (ver Capítulo 3 y/o estudios previos como Scheiner *et al.*, 1999, Scheiner *et al.*, 2001a, Scheiner *et al.*, 2001b, Scheiner *et al.*, 2004), podrían atribuirse, al menos en parte, a diferencias en la sensibilidad a los olores.

Olores complejos como ciertas feromonas o algunos volátiles de las plantas (Dobson *et al.*, 1999) pueden desencadenar respuestas innatas. El polen tiene volátiles que difieren cualitativamente de otros componentes de la flor (Dobson *et al.*, 1990; Dobson, 1991; Dobson *et al.*, 1996) y median las respuestas de orientación de las recolectoras hacia las

fuentes (Arenas y Farina, 2014). También juegan un rol importante en la reactivación y el reclutamiento (Arenas *et al.*, 2012). Por otra parte, a diferencia de la evaluación energética que realizan las recolectoras en una fuente de néctar, la evaluación de la productividad de una fuente de polen estaría mediada por la intensidad de sus claves olfativas (Galizia *et al.*, 2005; Raguso, 2008; Carr *et al.*, 2015). Más allá de las respuestas innatas, las abejas pueden aprender a discriminar entre los volátiles del polen y otros aromas de la flor (von Aufsess, 1960; Dobson *et al.*, 1999; Carr *et al.*, 2015). Al mejorar el aprendizaje asociativo, el aumento en la sensibilidad olfativa también mejoraría la capacidad de las abejas para discriminar entre diferentes olores de polen o entre los olores del polen y los olores emitidos por el resto de la flor (Pelz *et al.*, 1997). En este sentido, una alta sensibilidad olfativa entre las recolectoras que buscan polen, les permitiría no solo asistir la búsqueda hacia fuentes que suelen contener unos pocos mg. de polen (y que por ende la intensidad de los volátiles que emiten es muy baja), sino también evaluar de forma más precisa su productividad.

La importancia de los olores en la recolección no se limita solo a los volátiles emitidos por las fuentes. Compuestos feromonales tales como el (E)-β-ocimene, componente volátil de la feromona de cría producido por las larvas hambrientas, actúan desde el interior del nido modulando la tasa de recolección de polen (Maisonnasse *et al.*, 2009; 2010; Ma *et al.*, 2016). Una alta sensibilidad al (E)-β-ocimene permitiría que las recolectoras de polen respondan con mayor precisión frente a cambios en la intensidad de la señal, aun cuando estos sean sutiles.

El mecanismo por el cual las recolectoras de polen podrían exhibir una mayor sensibilidad olfativa que las recolectoras de néctar podría incluir diferencias en la detección de olores en el sistema nervioso periférico y/o diferencias en el procesamiento de entradas sensoriales en el cerebro. En el sistema olfativo de la abeja, se han detectado diferencias

relacionadas con la tarea a nivel de las antenas. Riveros y Gronenberg (2010) mostraron que las antenas de las recolectoras de polen presentan un mayor número de sensilias placodeas (recordemos que son estructuras en forma ovalada que albergan a los neuronas receptoras olfativas (NROs) de las antenas) que, cuando son estimuladas con olores, presentan señales eléctricas de mayor amplitud que las obtenidas en las antenas de las recolectoras de néctar. Esto sugiere que las diferencias fisiológicas y comportamentales están relacionadas con variaciones morfológicas. Sin embargo, esto no ha sido confirmado en la abeja sin aguijón *Tetragonisca angustula* (Balbuena y Farina, 2020), donde las diferencias en la sensibilidad al volátil citral entre las forrajeras y las guardianas no se correlacionaron con cambios morfológicos en sus antenas (es decir, el número y tipo de sensilias).

La sensibilidad de la antena a diferentes compuestos volátiles puede ser cuantificada mediante electroantenografía (EAG), siendo la respuesta eléctrica de las antenas una medida de detección confiable (Schneider y Hecker, 1956; Schneider, 1957; Gothilf *et al.*, 1978; Lecomte y Pouzat, 1985; Olsson y Hansson, 2013) que permite, entre otras cosas, diferenciar estímulos olfativos a distintas concentraciones (Schneider, 1957; Pelz *et al.*, 1997; Ruedenauer *et al.*, 2017; Balbuena y Farina, 2020). Aunque menos frecuente, las señales de EAG producidas por ciertos volátiles permiten distinguir ciertos patrones de actividad eléctrica a nivel de la antena, como recientemente se ha mostrado para los volátiles del polen de manzana y de almendro en el abejorro *Bombus terrestris* (Ruedenauer *et al.*, 2017).

Dada la importancia de los volátiles en la recolección, y sobre todo en la explotación de fuentes de polen en donde la percepción de claves olfativas sería esencial para establecer la naturaleza de la recompensa y la productividad de la fuente, no se descarta que la regulación de las tareas de forrajeo puede estar relacionada con diferencias en la sensibilidad olfativa. Evaluaremos la hipótesis de que la especialización del forrajeo depende de la

sensibilidad olfativa de las recolectoras. Predigo que las recolectoras de polen se van a desempeñar mejor (>prop de REP) que las recolectoras de néctar, tanto en los condicionamientos en los que se utilice aromas florales como en los condicionamientos en los que se utilice olores del polen. Por otro lado, predigo que las respuestas de las antenas de las recolectoras de polen ante la presentación de aromas florales (sobre todo a concentraciones bajas) así como ante olores emitidos por el polen y la cría, tendrán amplitudes mayores (>mV) que las respuestas de las recolectoras de néctar.

5.2 METODOLOGÍA

Realicé los experimentos durante las temporadas de verano de 2018/2019 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (34°32'S, 58°26'W).

5.2.1 Abejas

Utilicé abejas forrajeras en vuelo libre de edad desconocida para los experimentos. Durante la mañana de cada día experimental, capturé a las recolectoras de polen cuando regresaban a la colmena (final de la visita de forrajeo) con cargas de polen (corbículas) en sus patas traseras. Las forrajeras de néctar fueron capturadas al llegar a un alimentador artificial *ad libitum* mientras recolectaba solución de sacarosa 10% p/p. A pesar de no ser los grupos más sensibles a la sacarosa (las más sensibles son las forrajeras de polen al final del ciclo y las de néctar al inicio), al ser capturadas ambos grupos de forrajeras muestran altos niveles de respuesta a la sacarosa. Realicé todos los experimentos de acuerdo con las pautas de cuidado animal del Instituto Nacional de Salud (1985) y las leyes vigentes de Argentina.

5.2.2 Estímulos olfativos

Como estímulos olfativos para los experimentos 1 y 2, utilicé los aromas florales LIO y NONA (Sigma-Aldrich, USA). Ambos aromas se diluyeron en hexano (Sigma-Aldrich) para obtener los estímulos con la intensidad deseada. Como estímulos olfativos para el experimento 3, utilicé la feromona de cría (E)- β -ocimene (Sigma-Aldrich, USA, 0,1M) y los volátiles producidos por muestras de polen fresco. Las muestras de polen se obtuvieron de trampas de polen instaladas en una colmena desde las 09:00 h hasta las 10:00 h de la mañana de cada día experimental. Las muestras consistían en tres pellets o corbículas de polen de diferentes colores, brillos y aglutinación para tener en cuenta una variedad de orígenes botánicos.

5.2.3 Experimentos

5.2.3.1 Experimento 5.1 Aprendizaje de aromas florales a concentraciones crecientes en recolectoras de polen y néctar

Para estudiar si las abejas recolectoras de polen y de néctar difieren en su sensibilidad a los aromas florales, utilicé el condicionamiento olfativo clásico de la REP (Bitterman *et al.*, 1983). Anestesié y sujeté a las abejas recolectoras individualmente, permitiendo únicamente el movimiento de sus antenas y partes bucales (Kuwabara, 1957; Bitterman *et al.*, 1983). Alimenté a todas las abejas con una gota de solución de sacarosa al 30% p/p y se las mantuvo en una incubadora (30 °C, 60% de humedad relativa y oscuridad) durante 2 horas. Solo las abejas que presentaron la REP fueron entrenadas.

Se evaluó y comparó el desempeño durante el aprendizaje de diferentes grupos independientes de abejas forrajeras. Se entrenaron cuatro grupos diferentes de abejas recolectoras de néctar y cuatro grupos de abejas recolectoras de polen a lo largo de una serie de 5 ensayos de condicionamiento utilizando diferentes concentraciones (0,001, 0,01, 0,1 y 1 M) de linalool (LIO) y nonanal (NONA) y una solución de sacarosa al 30% p/p como recompensa. Las concentraciones elegidas siguen las utilizadas por Pelz *et al.*, (1997).

Presenté los estímulos olfativos mediante un olfactómetro como se detalla en el Capítulo 3. Cada ensayo duró 55 s. La válvula se programó para que liberara aire limpio durante los primeros 20 s, seguido por el olor (6 s), y una exposición final a aire limpio durante los últimos 29 s. Los últimos 3 s de la presentación del olor (EC) se superpusieron con la presentación de la solución de sacarosa (EI). Medimos la REP durante los primeros 3 s de la presentación del olor. Las abejas que respondieron a estímulos mecánicos (flujo de aire) durante los primeros 20 s de aire limpio fueron excluidas del análisis. También se excluyeron aquellos individuos que extendieron su probóscide cuando se les presentó el olor en el primer ensayo de condicionamiento (es decir, abejas que mostraron una respuesta espontánea).

5.2.3.2 Experimento 5.2 Aprendizaje de aromas de polen en recolectoras de polen y néctar

Utilicé el condicionamiento olfativo clásico de la REP para estudiar si las abejas recolectoras de polen y de néctar difieren en su desempeño durante el aprendizaje olfativo utilizando los volátiles emitidos por polen fresco como estímulo condicionado (EC). Tres pellets de polen se presionaron sobre un trozo de papel de filtro (2 cm de circunferencia) que

se colocó en una jeringa de plástico de 10 ml, desde la cual los volátiles fueron barridos por un flujo de aire generado al presionar constantemente el émbolo de la jeringa. Cada ensayo duró 55 s. Una jeringa que contenía únicamente papel filtro liberó el aire limpio durante los primeros 20 s, seguido por la liberación del olor de polen (6 s), y una exposición final a aire limpio durante los últimos 29 s. Los últimos 3 s de la presentación del olor (EC) se superpusieron con la presentación de la solución de sacarosa 30% p/p (EI). Medimos la REP durante los primeros 3 s de la presentación del olor. Las abejas que respondieron a estímulos mecánicos o que mostraron una respuesta espontánea fueron excluidas del análisis.

5.2.3.3 Experimento 5.3 Detección de aromas florales a concentraciones crecientes en recolectoras de polen y néctar

Utilicé registros de EAG para evaluar diferencias en la sensibilidad en la detección de olores entre recolectoras de polen y néctar. Para esto utilicé los aromas florales LIO y NONA a 4 concentraciones crecientes (0,001, 0,01, 0,1, 1 M). Capturé a las recolectoras y las mantuve dentro de tubos de plástico ventilados en una incubadora durante 15 minutos. Luego, anestesié a las abejas en frío, extraje y monté la antena derecha, que posee un mayor número de sensilias olfativas (Anfora *et al.*, 2010; Frasnelli *et al.*, 2010), en un soporte metálico con una gota de gel conductor (SPECTRA_360_GEL). El soporte se conectó a un amplificador (IDAC-2_Syntech). Registré la señal de EAG utilizando el software Auto-spike (Syntech).

Para todas las presentaciones, el intervalo entre cada estimulación duró 60 s. LIO y NONA se evaluaron en grupos diferentes de abejas. En la serie de LIO, medimos la respuesta de las antenas de 14 recolectoras de polen y 13 recolectoras de néctar. En la serie de NONA,

se evaluaron un grupo diferente de recolectoras de polen ($n = 13$) y recolectoras de néctar ($n = 14$) para las cuatro concentraciones. Cada estímulo se midió 3 veces por antena, a partir de las cuales calculamos una respuesta promedio para el estímulo. La amplitud (μV) de la señal del EAG se cuantificó con el software Autospike que media la diferencia de voltaje entre el “valle” y el “pico” generados inmediatamente después de la presentación del olor. Debido a que la señal de EAG podría experimentar un decaimiento a lo largo del curso del ensayo (más fuerte al principio y más débil al final), se utilizó un estímulo para comparar la amplitud generada al principio y al final de cada registro antenal. En la serie de LIO, usé NONA (0,1 M) como estímulo control, mientras que en la serie de NONA usé LIO (0,1 M) como control. Posiblemente porque los ensayos no duraron más de 15 minutos, no se observó decaimiento para la señal de los estímulos control. Resté la respuesta de la antena al flujo de aire de cada señal para controlar la estimulación mecánica.

5.2.3.4. Experimento 5.4. Detección de volátiles de polen y (E)- β -ocimene en recolectoras de polen y néctar

En una primera serie de registros (Exp 5.4a), estimulé las antenas de las recolectoras (tamaño de muestra de recolectoras de polen = 7; y recolectoras de néctar = 11) con volátiles emitidos por polen fresco recolectado por las abejas. En un mismo día experimental, registramos las respuestas de las antenas de ambos tipos de recolectoras hacia muestras con la misma composición de pellets de polen. Dado que las especies de polen recolectadas en las trampas podrían variar a lo largo del período experimental, el día experimental se incluyó en el análisis como un efecto aleatorio para tener en cuenta las posibles diferencias en la fuente olfativa (ver estadísticas a continuación en la siguiente sección).

Para presentar el estímulo olfativo, los tres pellets de polen se presionaron sobre un trozo de papel de filtro (2 cm de circunferencia) para romper su estructura y facilitar la liberación de los volátiles. El papel filtro se colocó en una jeringa de plástico de 10 ml, desde la cual los volátiles fueron barridos por un flujo de aire generado al presionar constantemente el émbolo de la jeringa durante un segundo (Figura 5.1). Se utilizaron estímulos mecánicos (flujo de aire) como controles y esta respuesta se restó a cada señal evocada por los volátiles del polen en cada antena. Para todas las presentaciones, el intervalo inter-estímulo duró 90 s. El estímulo se presentó 3 veces por individuo.

En una segunda serie de registros (Exp 5.4b), estimulamos las antenas de las recolectoras (tamaño de muestra de recolectoras de polen =12; y recolectores de néctar =12) con el volátil sintético (E)- β -ocimene (mezcla de isómeros estabilizada > 90% Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,1 M diluido en hexano. La presentación del olor se llevó a cabo utilizando un olfatómetro, siguiendo el protocolo mencionado anteriormente para LIO y NONA.

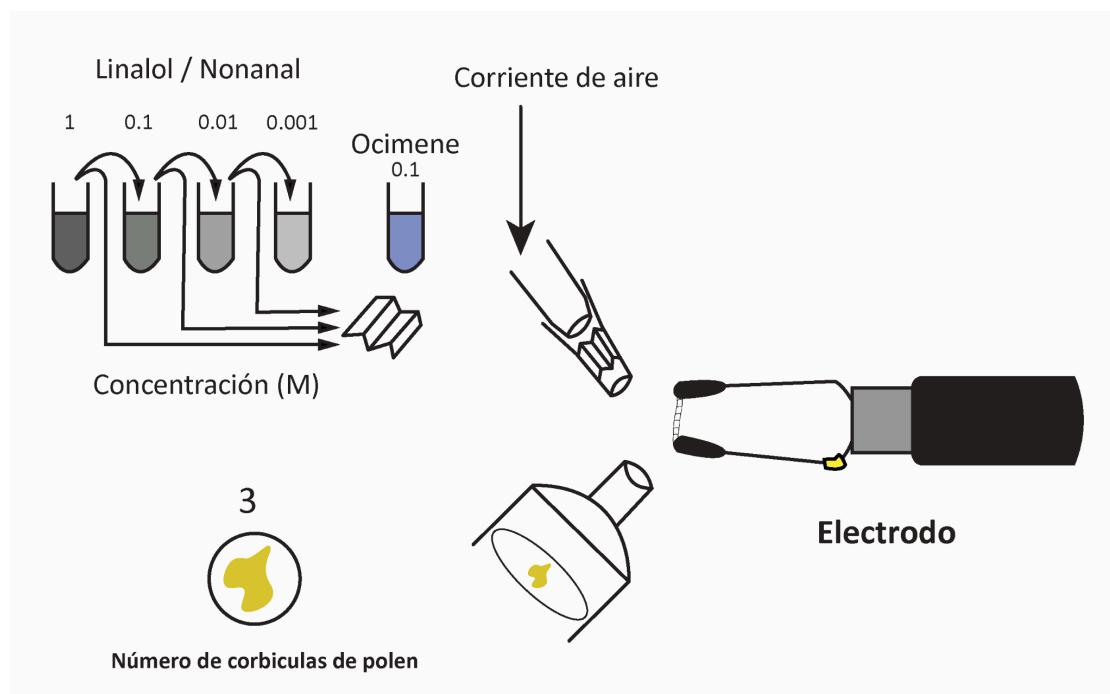


Figura 5.1. Representación de la metodología utilizada para el registro de EAG, donde se muestran los distintos estímulos olfativos utilizados en los experimentos de detección 5.3 y 5.4.

Dado que las señales de polen eran complejas (es decir, presentaban componentes de despolarización e hiperpolarización), las amplitudes (μ V) se calcularon desde el valor mínimo hasta el máximo (valle a pico). Además, exploramos la proporción del componente de hiperpolarización de la respuesta de la antena como la relación entre la amplitud de los componentes de hiperpolarización y la amplitud de valle a pico de la señal completa (Exp 5.4c).

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis estadísticos se realizaron en R (<http://www.R-project.org/>). Analicé la proporción de REP (Exp 5.1 y 5.2) mediante un modelo lineal generalizado mixto siguiendo una distribución binomial, utilizando la función “glmer” del paquete ‘lme4’ (Bates *et al.*, 2015). La significancia de los factores fue determinada mediante la prueba de *chi-cuadrado de Wald* a través de la función “Anova” del paquete ‘car’ (Fox, 2019). El número total de REP evocadas por el estímulo condicionado fue usado para calcular la proporción de REP como variable respuesta. Consideré tipo de recolectora (factor de dos niveles correspondiente a recolectoras de néctar y polen), identidad del olor (factor de dos niveles correspondiente a LIO y NONA) y concentración (un factor de cuatro niveles correspondiente a 0,001, 0,01, 0,1 y 1 M) como factores fijos, y cada individuo como factor aleatorio. La sobredispersión se modeló ajustando un efecto aleatorio de nivel de observación OLRE (Harrison, 2015). Para el experimento 5.2 considere al tipo de recolectora como factor fijo y a cada individuo como factor aleatorio. Se realizaron contrastes *post hoc* en los modelos para evaluar los efectos y la significancia entre los factores fijos utilizando la

función "emmeans" del paquete 'emmeans' versión 1.4 (Lenth, 2019) con un nivel de significancia de 0,05.

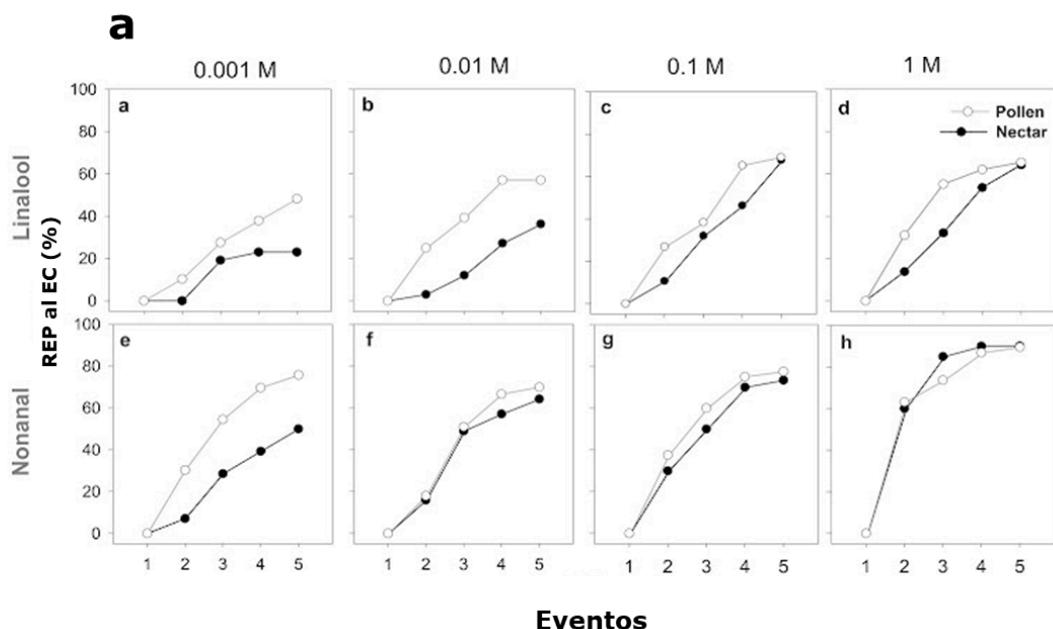
Analicé la amplitud (μ V) del componente de despolarización de las señales de EAG (Exp 5.3) utilizando un modelo lineal general mixto y siguiendo una distribución normal. Consideré el tipo de recolectora (factor de dos niveles correspondiente a recolectoras de néctar y polen), identidad del olor (factor de dos niveles correspondiente a LIO y NONA) y concentración (un factor de cuatro niveles correspondiente a 0,001; 0,01; 0,1 y 1 M) como factores fijos, y cada individuo y colmena como factores aleatorios. Verifiqué las suposiciones de homocedasticidad y normalidad (pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente) y modelé la varianza utilizando la función "VarIdent" del paquete 'nlme' (Pinheiro *et al.*, 2017).

Para el experimento 5.4, analicé la amplitud (μ V) del componente de despolarización y de la proporción del componente de hiperpolarización de las señales de EAG. Para esto realicé modelos lineales generales mixtos siguiendo una distribución normal, y considerando el tipo de recolectora (factor de dos niveles correspondiente a recolectoras de néctar y polen) como factor fijo y cada colmena, día experimental e individuo como factores aleatorios. Utilicé "varExp" del paquete 'nlme' (Pinheiro *et al.*, 2017) para modelar la varianza del Exp 5.4b.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Experimento 5.1. Aprendizaje de aromas florales a concentraciones crecientes en recolectoras de polen y néctar

Todos los grupos experimentales pudieron ser condicionados olfativamente. Se pudieron observar diferencias cualitativas en las pendientes de las curvas de adquisición y/o el plateau alcanzado entre las recolectoras de néctar y polen según la concentración de los olores utilizados como EC (Figura 5.2a). Los análisis de las proporciones de la respuesta condicionada muestran diferencias en el desempeño durante el condicionamiento entre ambos tipos de recolectoras ($\chi^2 = 14,41$; gl = 1; p < 0,001), entre los olores ($\chi^2 = 33,10$; gl = 1; p < 0,001) y entre las concentraciones de 0,001 y 0,01 M (z ratio = -3,292; gl = Inf; p = 0,0011 y z ratio = -2,366; gl = Inf; p = 0,0184 respectivamente; Figura 5.2b). Tales diferencias fueron independientes de los otros factores, ya que ni la interacción triple *tipo de recolectora** *identidad del olor* * *concentración* ($\chi^2 = 2,051$; gl = 3; p = 0,562), la interacción entre *tipo de recolectora* * *identidad del olor* ($\chi^2 = 1,486$; gl = 1; p = 0,223) ni la interacción entre *concentración* * *la identidad del olor* ($\chi^2 = 6,306$; gl = 3; p = 0,098) fueron significativas. En resumen, los resultados indican que las recolectoras de polen tuvieron un mejor desempeño durante el aprendizaje que las recolectoras de néctar cuando se presentaron bajas concentraciones de los aromas florales, independientemente de la identidad química del EC.



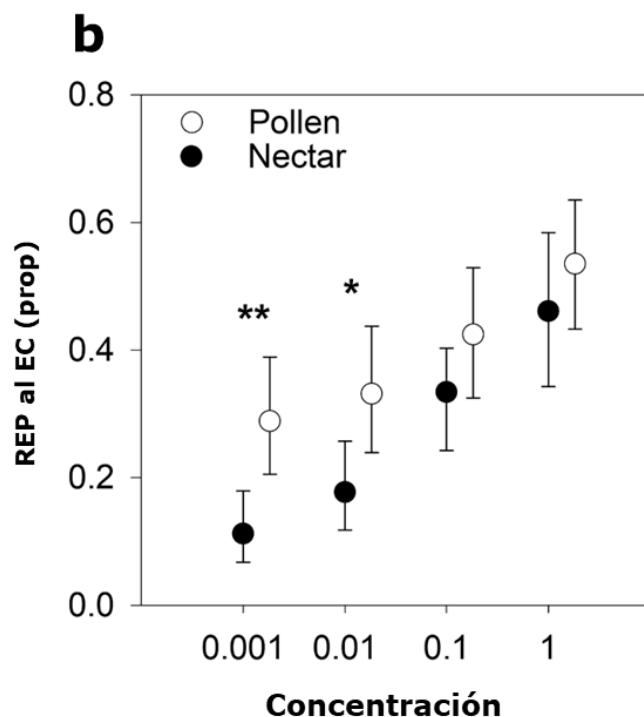


Figura 5.2. Experimento 5.1 a) Curvas de aprendizaje (%REP, datos observados) y b) Proporción de REP (prop) de forrajeras de polen (círculos vacíos) y néctar (círculos llenos) ante la presentación de los aromas florales LIO y NONA a 4 concentraciones crecientes (0,001M; 0,01M; 0,1M y 1M) durante 5 eventos de condicionamiento usando sacarosa 30% p/p como recompensa. En b, los círculos indican los valores medios (predichos por el modelo) y las barras muestran los intervalos de confianza del 95% para ambos olores juntos. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.4.2 Experimento 5.2. Aprendizaje de aromas de polen en recolectoras de polen y néctar

En contraste con LIO y NONA (Exp 5.2), el olor a polen provocó una alta proporción de respuestas espontáneas (es decir, la respuesta provocada inmediatamente después de la presentación del EC en el primer evento; Figura 5.3a), lo que nos llevó a no excluir estas abejas, ya que podría reflejar una respuesta asociada al forrajeo. Como en otros estudios (Ruedenauer *et al.*, 2018), el nivel de REP espontáneo ante los aromas del polen fue alto, lo

que indica una respuesta innata y/o una asociación previa entre el olor del polen y el néctar. Los porcentajes de respuesta espontánea al olor del polen fueron similares en las recolectoras de néctar y de polen ($\chi^2 = 3$; gl = 1; p = 0,08326; Figura 5.3a). Para evaluar el aprendizaje durante la etapa de condicionamiento, excluimos a aquellas abejas que respondieron espontáneamente al EC en el evento 1. Debido a que todas las recolectoras de polen respondieron al EC entre los eventos 2-5, no fue posible analizar las diferencias utilizando GLMM (por ejemplo, como en el Exp 1). Por lo tanto, analizamos las diferencias en el % de REP solo para el evento 2, y encontramos que las recolectoras de polen aprendieron los olores del polen mejor que las recolectoras de néctar ($\chi^2 = \text{Inf}$, gl = 1, p < 2.2e-16; Figura 5.3b).

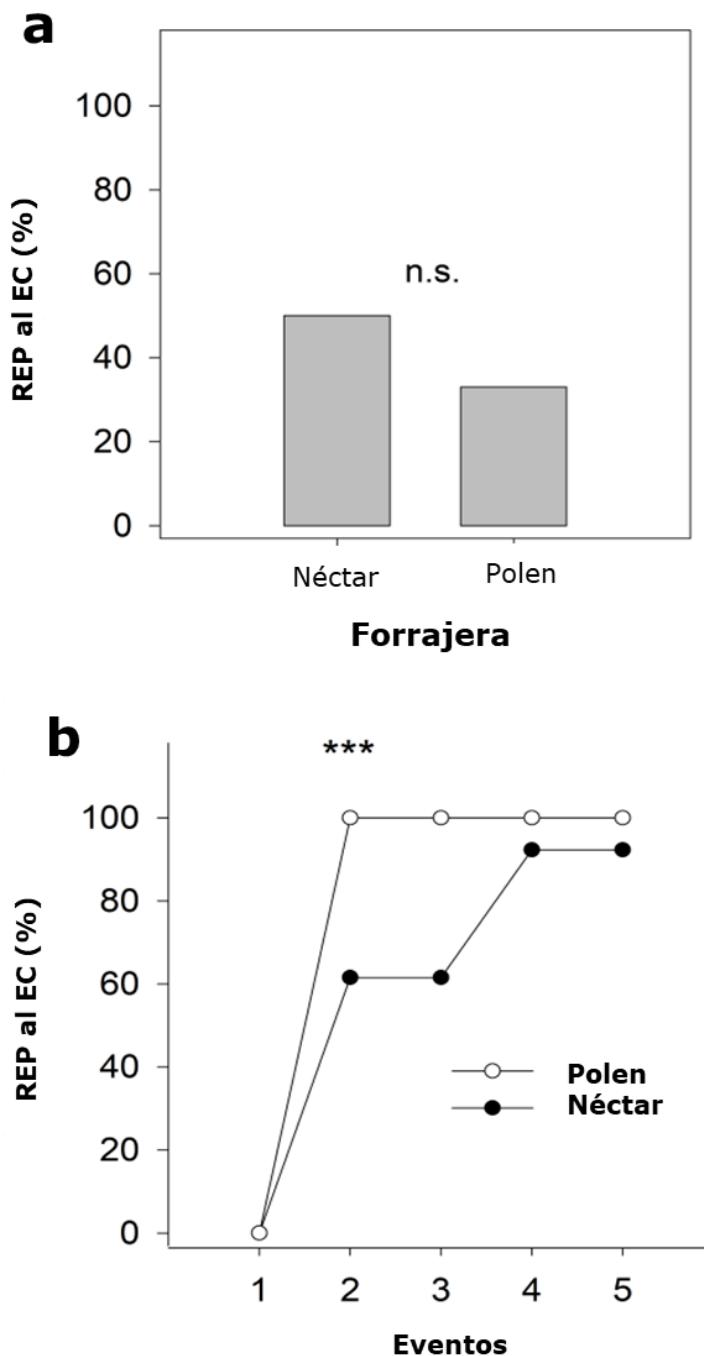


Figura 5.3. Experimento 5.2. Respuestas espontáneas y condicionadas a los volátiles del polen en forrajeras de polen y de néctar. **a)** % de REP ante los aromas del polen, evocadas inmediatamente después de la presentación del EC durante el primer evento (respuesta espontánea) en forrajeras de polen ($n=15$) y de néctar ($n=24$) ($\chi^2 = \text{n.s.}$; $p > 0,05$). **b)** % de REP ante los olores del polen durante 5 eventos de condicionamiento en abejas forrajeras de polen (círculos vacíos; $n=10$) y de néctar

(círculos llenos; n=12) que no respondieron al olor en el primer evento. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticas en los χ^2 (** p <0,001) entre el % REP del segundo evento.

5.4.3 Experimento 5.3. Detección de aromas florales en recolectoras de polen y néctar

Los volátiles naturales LIO y NONA produjeron la despolarización de la señal antenal (un componente negativo único) cuya amplitud difirió significativamente entre los tipos de recolectoras ($\chi^2 =8,2383$; gl =1; p =0,0041; Figura 5.4a). La diferencia en la amplitud entre las recolectoras de polen y néctar no se vio afectada por la triple interacción entre factores (*tipo de recolectora * identidad del olor * concentración*: $\chi^2 =5,69$; gl =3; p =0,1271). Sin embargo, la interacción entre la identidad del olor y la concentración fue significativa ($\chi^2 =47,76$; gl =3; p <0,0001; Figura 5.4b), indicando que la amplitud (μ V) de las señales de EAG aumentaron con la concentración más para NONA que para LIO. Nuestros resultados muestran que las recolectoras de polen son más sensibles para detectar los aromas florales LIO y NONA que las recolectoras de néctar, independientemente de la concentración y las características químicas de los estímulos olfativos.

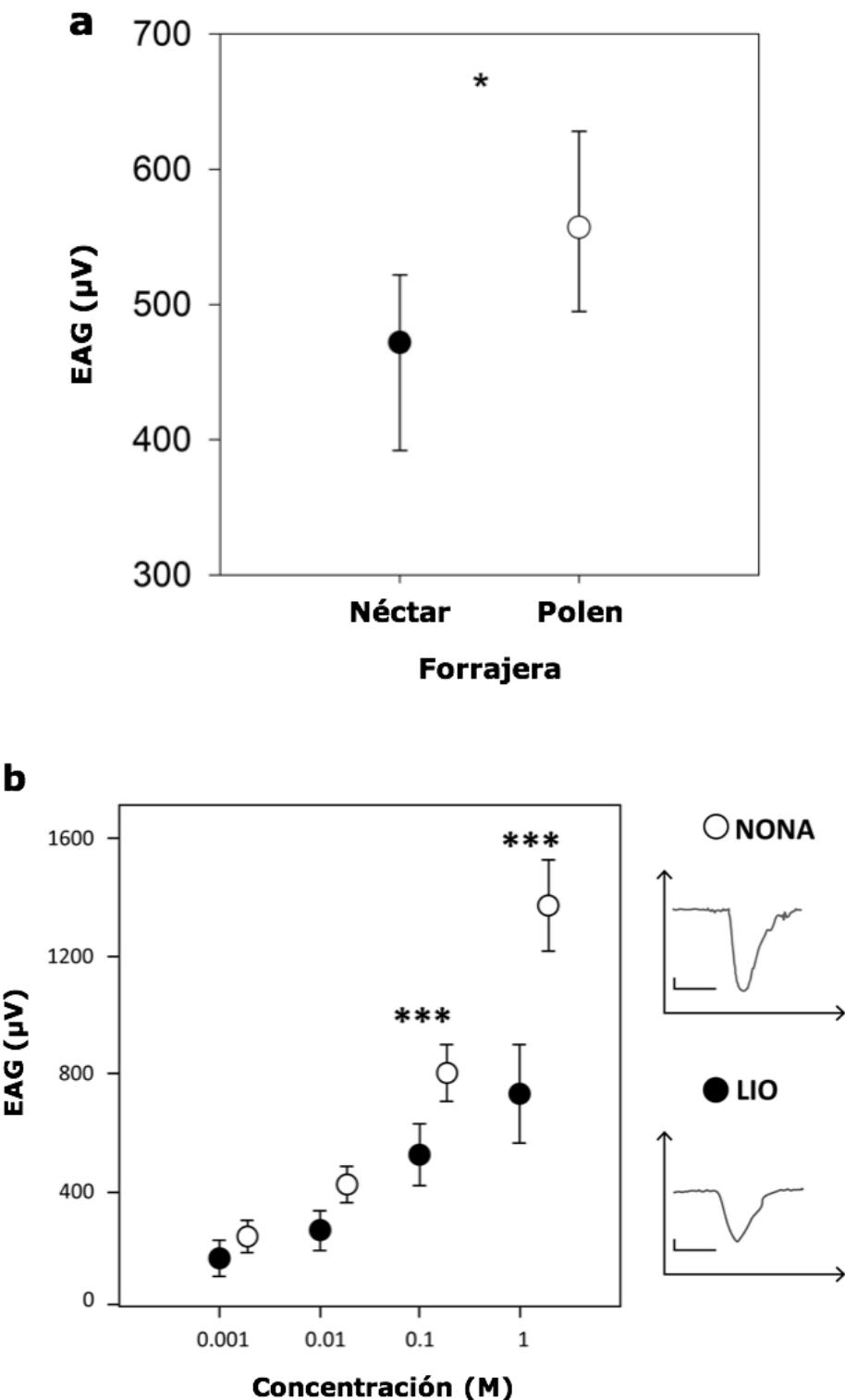
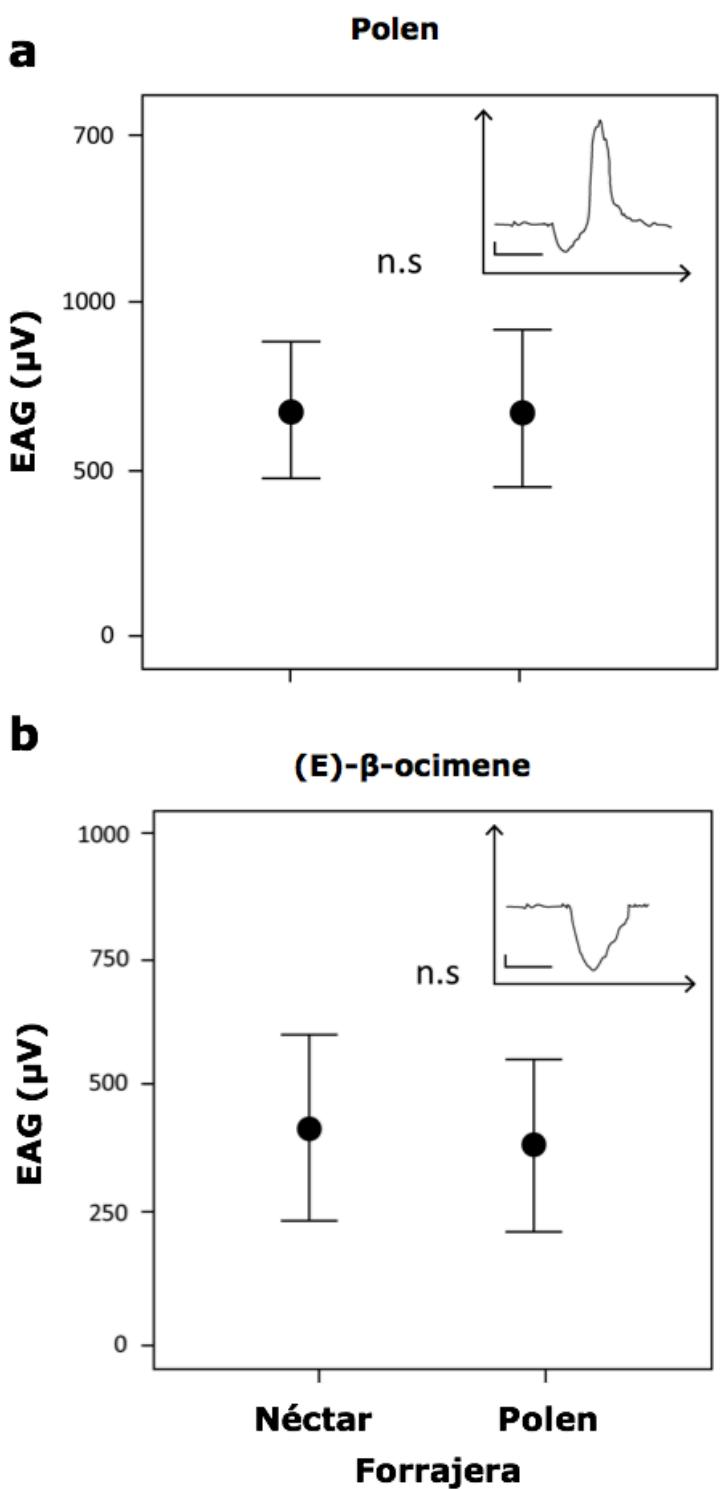


Figura 5.4. Experimento 5.3. **a)** Respuesta eléctrica de las antenas (μ V) de forrajeras de polen ($n = 27$) y néctar ($n = 27$) a una concentración media. Los datos de LIO y NONA se encuentran combinados. **b)** Respuesta eléctrica de las antenas (μ V) ante la presentación de 4 concentraciones

crecientes (0,001M; 0,01M; 0,1M y 1M) de los aromas florales LIO y NONA. Los círculos indican los valores medios (predichos por el modelo) y las barras muestran los intervalos de confianza del 95%. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticas (* p <0,05; *** p <0,001)

5.4.4 Experimento 5.4. Detección de volátiles de polen y (E)-β-ocimene en recolectoras de polen y néctar

Los volátiles producidos por el polen fresco recolectado por abejas provocaron respuestas antenales confiables en ambos tipos de recolectoras. La mayoría de las señales inducidas por el polen resultaron en una respuesta bimodal que presenta componentes de despolarización e hiperpolarización. Cuando consideramos la amplitud (μ V) de valle a pico de la señal eléctrica, no encontramos diferencias entre los tipos de recolectoras ($\chi^2 = 0,0117$; gl = 1; p = 0,913; Figura 5.5a). Sin embargo, encontramos diferencias significativas cuando exploramos la proporción del componente de hiperpolarización de la respuesta eléctrica ($\chi^2 = 4,65486$; gl = 1; p = 0,037; Figura 5.5b). Las respuestas antenales de las recolectoras de polen presentan una mayor contribución de componentes de hiperpolarización que las antenas de las recolectoras de néctar. Por otro lado, las señales inducidas por (E)-β-ocimene consistieron en un único componente de despolarización agudo (Figura 5.5c), con una amplitud que no difirió entre las recolectoras de polen y néctar ($\chi^2 = 0,0998$; gl = 1; p = 0,7521).



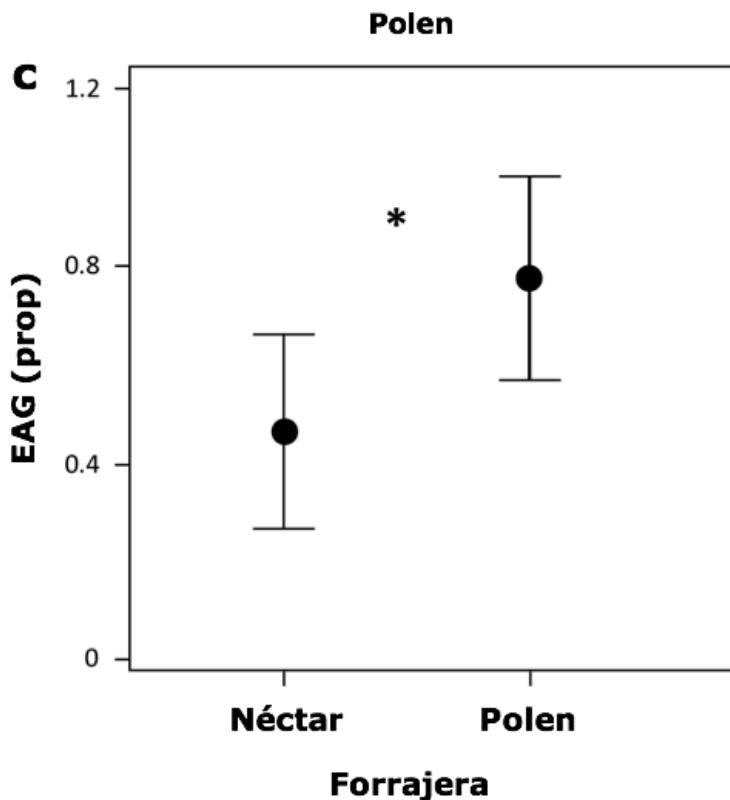


Figura 5.5. Experimento 5.4. Respuesta eléctrica de las antenas (μV) de recolectoras de polen y néctar ante la presentación de a) aromas de polen fresco, que produce señales eléctricas con polaridad negativa y positiva (esquina superior derecha). b) (E)- β -ocimene, produce una señal con polaridad negativa (esquina superior derecha). c) Proporción del componente de hiperpolarización de las respuestas de las antenas ante los olores de polen fresco. Los círculos indican los valores medios (predichos por el modelo) y las barras muestran los intervalos de confianza del 95%. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticas (* $p < 0,05$; "n.s" $p > 0,05$)

5.5 DISCUSIÓN

En *A. mellifera*, la especialización entre recolectoras de néctar y polen se ha correlacionado con la sensibilidad gustativa a la sacarosa (Page y Fondrk, 1995; Page y

Fondrk, 1998; Pankiw y Page, 2000; Arenas y Kohlmaier, 2019) y con diferencias en la percepción de las claves del polen (Scheiner *et al.*, 2004; Nery *et al.*, 2020).

Al investigar si la regulación de las tareas de forrajeo está relacionada con diferencias en la sensibilidad olfativa, los resultados muestran que las recolectoras de polen son más sensibles para detectar los aromas florales LIO y NONA que las recolectoras de néctar, independientemente de la concentración y las características químicas de los estímulos olfativos. Como esperábamos, y en concordancia con los resultados de la detección, las recolectoras de polen tuvieron un mejor desempeño durante el aprendizaje en comparación con las recolectoras de néctar cuando se presentaron bajas concentraciones de los aromas florales, independientemente de su identidad química.

Como era de esperar para una mezcla de volátiles, observamos que las respuestas eléctricas de las antenas ante los volátiles del polen fueron más complejas que las registradas para aromas florales como LIO o el componente de la feromona de cría (E)- β -ocimeno. Contrariamente a las señales típicas de EAG (una detección rápida de voltaje negativo), encontramos que los olores del polen evocaban señales complejas que cambian de polaridad durante la estimulación. Aunque rara vez, se han reportado polaridades negativas y positivas en las señales de EAG en insectos (en *Ceratitis capitata*: Light *et al.*, 1988; *Periplaneta americana*: Contreras *et al.*, 1989; en Lepidoptera: Ramachandran *et al.*, 1990), incluida la abeja de la miel (Patte *et al.*, 1989). Sin embargo, son importantes experimentos adicionales utilizando estímulos olfativos de polen de diferente naturaleza y probados a concentraciones más bajas.

Estudios en el abejorro *Bombus terrestris*, donde existen diferencias en las respuestas de las antenas entre los volátiles de polen de manzana (que evoca una señal de EAG positiva o hiperpolarización) y los de polen de almendra (que evoca una señal negativa o

despolarización) sugieren que las obreras separan los estímulos olfativos de los pólenes a nivel de las antenas (Ruedenauer *et al.*, 2017). Mis resultados muestran que las antenas de las recolectoras de polen responden a los olores del polen de manera diferente a las de las recolectoras de néctar. Es importante tomar en cuenta que la mayoría de fuentes olfativas emiten mezclas de aromas, y no sustancias puras (Paoli y Galizia, 2021). Los olores complejos del polen activan diferentes conjuntos de neuronas receptoras olfativa (NROs) en las antenas de cada tipo de forrajera, y, dada la variedad de patrones de respuestas de las antenas a los volátiles del polen, la población de NROs en las sensilias de las recolectoras de polen podría estar adaptativamente sintonizada para discriminar mejor entre los olores del polen (Cook *et al.*, 2005).

Aunque no se descarta la participación del cerebro, mis resultados muestran que las diferencias en la sensibilidad olfativa pueden explicarse por una mejor detección de estímulos olfativos en el sistema olfativo periférico. La capacidad de las abejas para detectar estímulos olfativos podría estar influenciada por diferencias en la expresión génica relacionada con las proteínas de unión a olores y/o proteínas quimiosensoriales en las antenas (Kennedy *et al.*, 2021), las cuales podrían cambiar rápidamente según las condiciones ambientales o las necesidades de la colonia.

En este sentido, Arenas and Kohlmaier (2019) observaron que el cambio entre tipos de recursos puede ser una decisión activa de las abejas en respuesta a cambios en la concentración de azúcar en la fuente de alimento, por lo que los cambios en la probabilidad de fuentes de alimento influyen en las preferencias de las abejas para recolectar néctar o polen (Arenas y Kohlmaier, 2019). Las diferencias en la sensibilidad olfativa entre los tipos de forrajeras también podrían ser consecuencia de la señalización de aminas biogénicas en las antenas y/o en el cerebro de las abejas (Spivak *et al.*, 2003; Arenas *et al.*, 2021), afectando su

sistema de respuesta sensorial en conjunto y, a su vez, sus respuestas y preferencias durante el forrajeo.

En línea con la predicción de que las abejas recolectoras de polen son más sensibles a los olores del polen que las recolectoras de néctar, el análisis detectó diferencias en el aprendizaje cuando se utilizaron los volátiles del polen (EC). Las recolectoras de polen aprendieron más rápido que las recolectoras de néctar (Figura 5.3b). Es interesante notar que ambos grupos mostraron niveles altos y similares de respuesta espontánea (alrededor del 40% de las abejas), lo que indica una respuesta innata y/o una asociación previa entre el olor del polen y el néctar. Las diferencias del desempeño durante el evento de condicionamiento no correlacionan con los resultados obtenidos para la detección, donde la amplitud de valle a pico de la señal de EAG evocada por los volátiles del polen fue similar en ambos tipos de recolectoras. En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque la intensidad del olor utilizado (es decir, volátiles de tres pellets de polen) podría haber saturado la capacidad de detección en ambos tipos de recolectoras, existen diferencias en cómo los estímulos con relevancia biológica son procesados en los cerebros de abejas con predisposiciones de recolección distintas.

Como sugieren nuestros resultados, las diferencias en el nivel de respuestas ante la presentación de estímulos olfativos tienen un impacto directo en la capacidad de las abejas para aprender información olfativa, con implicaciones en la eficiencia de la búsqueda y forrajeo de recursos (Free, 1969; Chaffiol *et al.*, 2005; Arenas *et al.*, 2007; Arenas y Farina, 2008; Arenas y Farina, 2012). Por lo tanto, un aumento en la sensibilidad olfativa podría permitir a las recolectoras de polen aprender mejor las claves olfativas específicas que predicen la recompensa de polen junto con otras claves sensoriales fuertes, como los bouquets de olores florales que no necesariamente predicen el polen (por ejemplo, flores

femeninas unisexuales que no producen polen). El polen tiene volátiles que difieren cualitativamente de otros componentes de la flor (Dobson *et al.*, 1990; Dobson, 1991; Dobson *et al.*, 1996) y las abejas pueden aprender a discriminarlos (von Aufsess, 1960; Dobson *et al.*, 1999; Carr *et al.*, 2015). Al mejorar el aprendizaje asociativo, el aumento en la sensibilidad olfativa también mejoraría la capacidad de las abejas para discriminar entre diferentes olores de polen o entre los olores del polen y los olores emitidos por el resto de la flor (Pelz *et al.*, 1997).

En conjunto, una mayor sensibilidad olfativa y una actividad diferencial de las antenas podrían proporcionar a las forrajeras de polen la capacidad de aprender estímulos olfativos sutiles que predicen la recompensa y de identificar/discriminar mejor entre fuentes de alimento diferentes, reflejando una adaptación en la especialización de tareas relacionadas a diferentes tipos de recursos.

CAPÍTULO 6

Consideraciones finales



© Alex Wild
alexanderwild.com

6.1 Discusión general

Una colonia de insectos sociales se considera la unidad sobre la cual actúa la selección natural, donde las tareas realizadas por las obreras generalmente se interpretan en términos de cómo benefician a toda la colonia (Ament *et al.*, 2010). En el marco de la hipótesis del plan reproductivo, que relaciona la especialización de la recolección entre las forrajeras de una abeja social con los ciclos reproductivos en las hembras de abejas solitarias (Amdam *et al.*, 2004; 2006), se podría especular que la expresión aumentada de caracteres reproductivos femeninos (tales como un mayor número de ovariolas, o niveles más altos de vitelogenina; Amdam *et al.*, 2011; Fig 6.1) repercute sobre la fisiología del individuo y determina su condición nutricional y/o su nivel de saciedad de azúcares (Fig 6.1).

Dada la naturaleza del polen, cuya recolección genera demandas de azúcar sustancialmente más altas que la recolección de néctar, los individuos con predisposición a juntar polen deberían presentar una condición energética más favorable que las de néctar al iniciar la recolección. Por este motivo, las recolectoras de polen tenderían a ingerir más alimento y de mejor calidad dentro de la colmena (por ejemplo néctar más concentrado), lo que determinaría, primero, niveles de saciedad altos y segundo niveles de sensibilidad a la sacarosa bajos (Harano *et al.*, 2013; Harano *et al.*, 2014; Harano *et al.*, 2016).

Mis resultados muestran que la sensibilidad a la sacarosa cambia rápidamente entre la llegada y la partida de una fuente de alimento, en cuestión de algunos segundos o minutos. Este ajuste permite a las abejas amplificar o filtrar la información relevante para su tarea. Estos cambios podrían deberse a variaciones rápidas en los niveles de aminas biogénicas (o sus receptores) en el cerebro, que afectan la sensibilidad gustativa según la motivación de la abeja por buscar el recurso deseado. Estudios previos (Huang *et al.*, 2022) demostraron que la motivación de las recolectoras varía a lo largo del ciclo de forrajeo, evidenciado por cambios

significativos en los niveles cerebrales de dopamina. Los niveles de dopamina son altos en las recolectoras de néctar que dejan la colmena y llegan a una fuente de azúcar productiva, pero disminuyen tras ingerir suficiente solución de sacarosa y regresar a la colmena.

Además, los neuropéptidos juegan un papel crucial en los procesos fisiológicos y comportamentales, actuando como neurohormonas, neuromoduladores y neurotransmisores (Strand, 1999). La recolección de néctar y polen provoca cambios rápidos en la abundancia de ciertos neuropéptidos en el cerebro de las abejas (Brockmann *et al.*, 2009), lo que sugiere su participación en la especialización de las tareas de forrajeo. En particular, la versión corta del neuropéptido F (short neuropeptide F ó sNPF), está involucrado en la modulación de los umbrales de respuesta a la sacarosa y de la saciedad de azúcares en las recolectoras de *A. mellifera*, por lo que se presenta como un actor molecular capaz de mediar la especialización de la recolección a través del control de la condición energética de las forrajeras (Fig. 6.1; Bestea *et al.*, 2022).

Más allá de que las diferencias entre abejas con predisposición para recolectar polen o néctar presenten bases genéticas (Page *et al.*, 2006), mis resultados muestran que la motivación y/o el nivel de saciedad, relacionados con el momento de la visita de forrajeo, son factores relevantes que tienen que ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar la especialización de la recolección a través del modelo de umbrales de respuesta. Mis hallazgos muestran que, las recolectoras de néctar son más sensibles a la sacarosa al inicio de la visita de recolección, cuando están motivadas por el recurso, y su sensibilidad disminuye una vez que terminaron con éxito su tarea, y regresan a la colmena, con la posibilidad de usar el néctar que llevan almacenado como combustible. Por otro lado, las recolectoras de polen son menos sensibles a la sacarosa pero más sensibles al polen, lo que les permitiría evaluar el polen al inicio de la visita de recolección. Conforme la visita continúa, la sensibilidad a la

sacarosa aumenta llegando a su nivel más alto cuando la abeja regresa a la colmena, cargada de polen y hambreada.

La sensibilidad diferencial a los estímulos que actúan como refuerzo positivo, tal como el polen o la sacarosa, afecta al desempeño durante el aprendizaje, permitiendo que las recolectoras más sensibles aprendan mejor las características de una fuente que predicen la llegada del alimento (Fig. 6.1). Como consecuencia de estos eventos de aprendizaje en las fuentes, se formarán memorias más estables y duraderas que asisten a las abejas durante la recolección y mejoran su eficiencia (Fig. 6.1; Menzel, 1999). Mientras que las memorias guían a las abejas hacia las fuentes de alimento conocidas, la colonia ahorra tiempo que usaría para buscar recursos en fuentes menos productivas o vaciadas. Una recolección exitosa permite mejorar el estado nutricional y sanitario de las colonias, afectando positivamente la alimentación de las larvas (Fig. 6.1) que, algunas semanas más tarde, conformarán la fuerza recolectora de la colonia. Hasta qué punto la expresión diferencial de caracteres femeninos en las obreras responde a los mismos factores epigenéticos que determinan la diferenciación de la abeja reina aún no se ha investigado. A pesar de que las obreras y las reinas provienen de larvas genéticamente iguales, la larva que será la reina recibe otro tipo de alimentación, que se basa en jalea real. La jalea real proporciona agentes que bloquean a la proteína dnmt3 (dna metil-transferasa). Esta proteína se encarga de metilar (agregar grupos metilo) al adn y, por lo tanto, de silenciar los genes relacionados con la morfología reproductiva en las abejas obreras, lo que impide que se reproduzcan (Kucharski *et al.*, 2008). Bajo la hipótesis de que este mecanismo también actúa entre las obreras para determinar el nivel de expresión de sus caracteres maternales, las colonias tendrían la posibilidad de determinar la proporción de recolectoras de polen vs. las de néctar, lo que permitiría ajustar la disponibilidad de recolectoras con predisposición hacia un recurso u otro, en función de la disponibilidad de fuentes de alimento y las necesidades de la colonia.

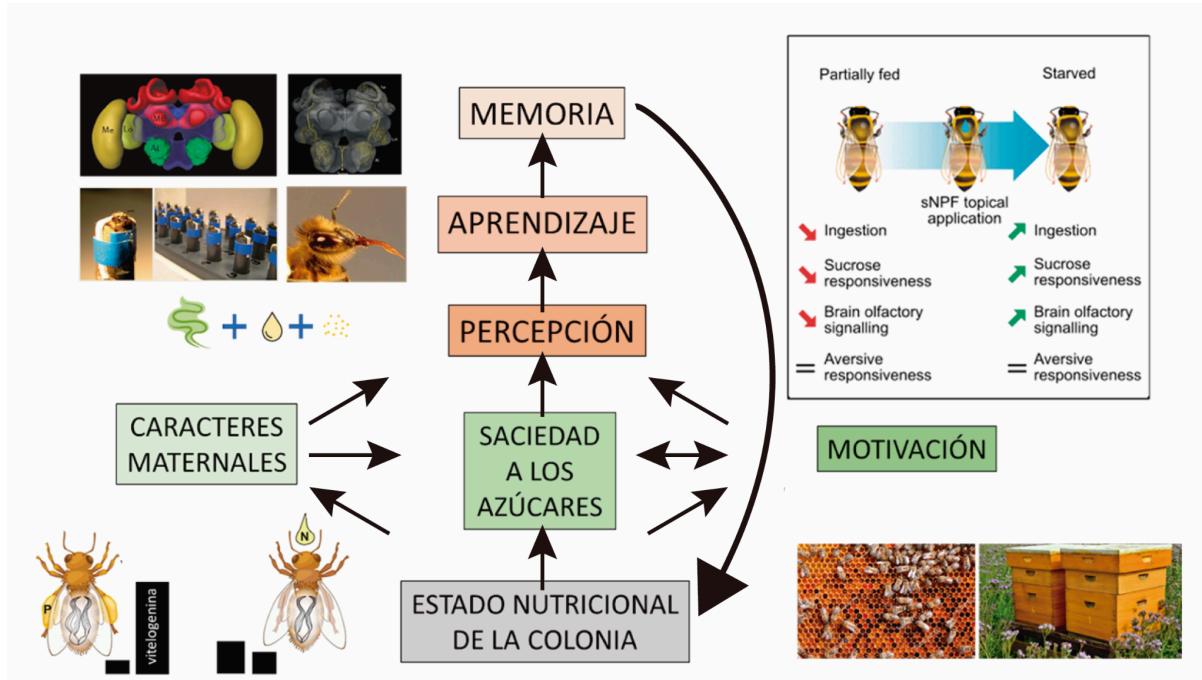


Figura 6.1. Esquema de los distintos actores que podrían intervenir en la especialización de la recolección. Determinado por su perfil genético, las obreras que presentan una mayor expresión de caracteres femeninos, tenderían a consumir grandes cantidades de néctar que le permitan completar el ciclo de recolección de polen que es energéticamente muy demandante. Los cambios en los niveles de saciedad de azúcar, posiblemente mediado por el sNPF, interactúan con la motivación para dar inicio a la recolección (Bestea *et al.*, 2021). Los niveles de saciedad de azúcares determinan tanto la sensibilidad a la sacarosa de las recolectoras como el aprendizaje de las claves asociadas al recurso al que tiene mayor probabilidad de responder. Memorias estables y duraderas mejorarían la eficiencia de recolección y el acopio de reservas en el nido. Queda por determinar si la condición nutricional de la colonia afecta o no la proporción de recolectoras con predisposición por recolectar uno u otro recurso.

6.2 Proyecciones

Como vimos a lo largo de esta tesis, es importante tener en cuenta el estado motivacional de las recolectoras, el que varía a lo largo de la visita de forrajeo, y que depende

de factores individuales como la predisposición genética, el estado nutricional, o la saciedad a los azúcares. En este sentido, y dada la relevancia de los olores en la búsqueda de alimento, es fundamental explorar con mayor profundidad las diferencias en la sensibilidad olfativa de las abejas forrajeras, realizando experimentos que incluyan distintos contextos y momentos del ciclo recolector. Sería valioso evaluar la hipótesis de que la sensibilidad olfativa de las recolectoras se modula en función de la identidad del olor (como olores florales o de polen), el momento específico del ciclo de forrajeo y la predisposición de las abejas a recolectar polen o néctar. Un aumento en la sensibilidad olfativa al inicio de la visita (acompañado de una baja sensibilidad a la sacarosa), podría permitir a las recolectoras de polen aprender mejor las claves olfativas específicas que predicen la recompensa del polen o incluso diferenciarlas de los bouquets de olores florales que no necesariamente predicen el polen

6.3 Publicaciones que se desprenden de esta tesis

Moreno, E., & Arenas, A. 2024. Foraging task specialization in honey bees (*Apis mellifera*): the contribution of floral rewards on the learning performance of pollen and nectar foragers. *Journal of Experimental Biology*. Aceptado.

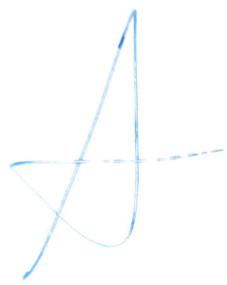
Moreno, E., & Arenas, A. 2023. Changes in resource perception throughout the foraging visit contribute to task specialization in the honey bee *Apis mellifera*. *Scientific Reports*, 13(1), 8164. DOI: [10.1038/s41598-023-35163-y](https://doi.org/10.1038/s41598-023-35163-y)

Moreno, E., Corriale, M., Arenas, A. 2022. Differences in olfactory sensitivity and odor detection correlate with foraging task specialization in honeybees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*. 141, 104416. DOI: [10.1016/j.jinsphys.2022.104416](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2022.104416)

Lajad, R., Moreno, E*., Arenas, A. 2021. Young honeybees show learned preferences after experiencing adulterated pollen. *Scientific Reports*. 11, 23327. DOI: [10.1038/s41598-021-02700-6](https://doi.org/10.1038/s41598-021-02700-6)

Nery, D, Moreno, E*., Arenas, A. 2020. Pollen reinforces learning in honey bee pollen foragers but not in nectar foragers. *Journal of Experimental Biology*. 223(22). DOI: [10.1242/jeb.230250](https://doi.org/10.1242/jeb.230250)

* Primera autoría compartida.



Andrés Arenas

Doctor Andrés Arenas

~~Emilia Moreno~~
Emilia Moreno

Lic. Emilia Alejandra Moreno Coellar

CAPÍTULO 7

Referencias bibliográficas

- Adler, L. S.** (2000). The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*, 91, 409–420. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.910301.x>
- Amdam, G. V., y Omholt, S. W.** (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 223, 451–464. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(03\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00121-8)
- Amdam, G. V., Norberg, K., Fondrk, M. K., y Page, R. E. Jr.** (2004). Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31), 11350–11355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403073101>
- Amdam, G. V., Csöndes, A., Fondrk, M. K., y Page, R. E. Jr.** (2006). Complex social behavior derived from maternal reproductive traits. *Nature*, 439, 76–78. <https://doi.org/10.1038/nature04340>
- Amdam, G. V., Fennern, E., y Havukainen, H.** (2011). Vitellogenin in honey bee behavior and lifespan. En Galizia, C., Eisenhardt, D., y Giurfa, M. (Eds.). *Honeybee Neurobiology and Behavior*; (pp 17–29). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2099-2_2
- Ament, S. A., Wang, Y., y Robinson, G. E.** (2010). Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(5), 566–576. <https://doi.org/10.1002/wsbm.73>
- Anfora, G., Frasnelli, E., Maccagnani, B., Rogers, L. J., Vallortigara, G.,** (2010). Behavioural and electrophysiological lateralization in a social (*Apis mellifera*) but not in a non-social (*Osmia cornuta*) species of bee. *Behavioural Brain Research*, 206 (2), 236–239.
- Arechavaleta-Velasco, M. E., y Hunt, G. J.** (2003). Genotypic variation in the expression of guarding behavior and the role of guards in the defensive response of honey bee colonies. *Apidologie*, 34, 439–447. <https://doi.org/10.1051/apido:2003028>
- Arenas, A., y Farina, W. M.** (2008). Age and rearing environment interact in the retention of early olfactory memories in honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, 194, 629–640. <https://doi.org/10.1007/s00359-008-0337-z>

Arenas, A., y Farina, W. M. (2012). Learned olfactory cues affect pollen-foraging preferences in honeybees. *Animal Behaviour*, 83, 1023–1033.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.01.026>

Arenas, A., y Farina, W. M. (2014). Bias to pollen odors is affected by early exposure and foraging experience. *Journal of Insect Physiology*, 66, 28–36.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.05.010>

Arenas, A., y Kohlmaier, M. G. (2019). Nectar source profitability influences individual foraging preferences for pollen and pollen-foraging activity of honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 73, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00265-019-2644-5>

Arenas, A., Fernandez, V. M., y Farina, W. M. (2007). Floral odor learning within the hive affects honeybees' foraging decisions. *Naturwissenschaften*, 94, 218–222.
<https://doi.org/10.1007/s00114-006-0176-0>

Arenas, A., Lajad, R., Peng, T., Grüter, C., y Farina, W. (2021). Correlation between octopaminergic signaling and foraging task specialization in honeybees. *Genes, Brain and Behavior*, 20(4), e12718. <https://doi.org/10.1111/gbb.12718>

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

Baker, H. G., y Baker, I. (1983). A brief historical review of the chemistry of floral nectar. *The Biology of Nectaries*, 126–152.

Balbuena, M. S., y Farina, W. M. (2020). Chemosensory reception in the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Journal of Insect Physiology*, 125, 104076.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104076>

Baracchi, D., Devaud, J. M., d'Ettorre, P., y Giurfa, M. (2017). Pheromones modulate reward responsiveness and non-associative learning in honey bees. *Scientific Reports*, 7, 9875. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10113-7>

Baracchi, D., Cabriol, A., Devaud, J-M., Hasse, A., d'Ettore, P., y Giurfa, M. (2020). Pheromone components affect motivation and induce persistent modulation of associative learning and memory in honey bees. *Communications Biology*, 3, 447.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01183-x>

Barker, R. J., y Lehner, Y. (1974). Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Experimental Zoology*, 187, 277–286. <https://doi.org/10.1002/jez.1401870211>

Barth, F. G. (1985). *Insects and Flowers: the Biology of a Partnership*. Princeton University Press, New Jersey.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R. H. B., Singmann, H., y

Bolker, M. B. (2015). Package ‘lme4’. *Convergence*, 12(1), 2.

Benton, R. (2009). Evolution and revolution in odor detection. *Science*, 326(5951), 382–383. <https://doi.org/10.1126/science.1181998>

Besheres, S. N., y Fewell, J. H. (2001). Models of division of labor in social insects. *Annual Review of Entomology*, 46, 413. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.413>

Bestea, L., Réjaud, A., Sandoz, J. C., Carcaud, J., Giurfa, M., y de Brito Sanchez, M. G. (2021). Peripheral taste detection in honey bees: What do taste receptors respond to? *European Journal of Neuroscience*, 54(2), 4417–4444. <https://doi.org/10.1111/ejn.15265>

Bestea, L., Paoli, M., Arrufat P., Ronsin, B., Carcaud, J., Sandoz, J. C., Velarde, R., Giurfa, M., y de Brito Sanchez, M. G. (2022). The short neuropeptide F regulates appetitive but not aversive responsiveness in a social insect. *iScience*, 25, 103619. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103619>

Beutler, R. (1935). Neue Untersuchungen über den Zuckergehalt des Blütenektars, Leipzig. *Bienenztg*, 271–272.

Beutler, R. (1950). Zeit und Raum im Leben der Sammelbiene. *Naturwissenschaften*, 37, 102–105.

Bitterman, M., Menzel, R., Fietz, A., y Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Physiology A*, 97, 107–119.

Blatt, J., y Roces, F. (2001). Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *Journal of Experimental Biology*, 204, 2709–2716. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.15.2709>

Boch, R., Shearer, D. A., y Stone, B. C. (1962). Identification of isoamyl acetate as an active component in the sting pheromone of the honey bee. *Nature*, 195, 1018. <https://doi.org/10.1038/1951018b0>

Bonabeau, E., Theraulaz, G., y Deneubourg, J. L. (1996). Quantitative study of the fixed threshold model for the regulation of division of labour in insect societies. *Proceedings of the Royal Society B*, 263, 1565–1569. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0229>

Bortolotti, L, y Costa C. (2014). Chemical Communication in the Honey Bee Society. En Mucignat-Caretta, C. (Ed.). *Neurobiology of Chemical Communication*, (pp 147–210). CRC Press/Taylor y Francis, Florida.

Breed, M. D., Robinson, G. E., y Page, R. E. Jr. (1990). Division of labor during honey bee colony defense. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 27, 395–401.

Breed, M. D., Smith, T. A., y Torres, A. (1992). Role of guard honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) in nestmate discrimination and replacement of removed guards. *Annals of the Entomological Society of America*, 85, 633–637. <https://doi.org/10.1093/aesa/85.5.633>

Brockmann, A., Annangudi, S. P., Richmond, T. A., Ament, S. A., Xie, F., Soutey, B. R., Rodríguez-Zas, S. R., Robinson, G. E. y Sweedler, J. V. (2009). Quantitative peptidomics reveal brain peptide signatures of behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7), 2383–2388. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813021106>

Calabi, P. (1988). Behavioral flexibility in Hymenoptera: A re-examination of the concept of caste. En Trager, J. C. (Ed.). *Advances in Myrmecology*, (pp 237–258). E. J. Brill Press, Leiden.

Calvello, M., Brandazza, A., Navarrini, A., Dani, F. R., Turillazzi, S., Felicioli, A., y Pelosi, P. (2005). Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.002>

Camazine, S. (1993). The regulation of pollen foraging by honey bees: how foragers assess the colony's need for pollen. *Behavioral Ecology*, 32, 265–272.

Camazine, S., Deneubourg, J. L., Franks, N. R., Sneyd, J., Theraulaz, G., y Bonabeau, E. (2001). *Self-Organization in Biological Systems*. Princeton University Press, Princeton.

Carr, D. E., Haber, A. I., LeCroy, K. A., De'Ashia, E. L., y Link, R. I. (2015). Variation in reward quality and pollinator attraction: the consumer does not always get it right. *AoB Plants*, 7, plv034. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv034>

Carroll, M. J., Brown, N., Goodall, C., Downs, A. M., Sheenan, T. H., y Anderson, K. E. (2017). Honey bees preferentially consume freshly-stored pollen. *PLoS One*, 12(4), e0175933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175933>

Chaffiol, A., Laloi, D., y Pham-Delègue, M. H. (2005). Prior classical olfactory conditioning improves odour-cued flight orientation of honey bees in a wind tunnel. *Journal of Experimental Biology*, 208(19), 3731–3737. <https://doi.org/10.1242/jeb.01796>

Contreras, M. L., Perez, D., y Rozas, R. (1989). Empirical correlations between electroantennograms and bioassays for *Periplaneta americana*. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 2539–2548. <https://doi.org/10.1007/bf01014730>

Cook, S. M., Sandoz, J. C., Martin, A. P., Murray, D. A., Poppy, G. M., y Williams, I. H. (2005). Could pollen odours play a role in the foraging behaviour of the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiological Entomology*, 30, 164–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2005.00445.x>

Crailsheim, K. (1991). Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Comparative Physiology B*, 161, 55–60. <https://doi.org/10.1007/bf00258746>

Crailsheim, K. (1998). Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 29(1–2), 97–112. <https://doi.org/10.1051/apido:19980106>

Crepet, W. L. (1979). Insect pollination: a paleontological perspective. *BioScience*, 29(2), 102–108. <https://doi.org/10.2307/1307746>

da Silva, J. (2021). Life history and the transitions to eusociality in the Hymenoptera. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 727124. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.727124>

de Brito Sanchez, M. G. (2011). Taste perception in honey bees. *Chemical Senses*, 36(8), 675–692. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr040>

de Brito Sanchez, M. G., Giurfa, M., de Paula Mota, T. R., y Gauthier, M. (2005). Electrophysiological and behavioural characterization of gustatory responses to antennal ‘bitter’ taste in honey bees. *European Journal of Neuroscience*, 22, 3161–3170. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04516.x>

de Brito Sanchez, M. G., Ortigao-Farias, J. R., Gauthier, M., Liu, F., y Giurfa, M. (2007). Taste perception in honey bees: just a taste of honey? *Arthropod-Plant Interactions*, 1, 69–76. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr040>

de Brito Sanchez, M. G., Chen, C., Li, J., Liu, F., Gauthier, M., y Giurfa, M. (2008). Behavioral studies on tarsal gustation in honey bees: sucrose responsiveness and sucrose-mediated olfactory conditioning. *Journal of Comparative Physiology A*, 194, 861–869. <https://doi.org/10.1007/s00359-008-0357-8>

de Brito Sanchez, M. G., Lorenzo, E., Su, S., Liu, F., Zhan, Y., y Giurfa, M. (2014). The tarsal taste of honey bees: behavioral and electrophysiological analyses. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 25. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00025>

De la Barrera, E., y Nobel, P. S. (2004). Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends in Plant Science*, 9(2), 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.12.003>

de Mesquita, L. X., Maracajá, P. B., Sakamoto, S. M., y Soto-Blanco, B. (2010). Toxic evaluation in honey bees (*Apis mellifera*) of pollen from selected plants from the semi-arid region of Brazil. *Journal of Apicultural Research*, 49(3), 265–269. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.3.06>

Dethier, V. G. (1961). Behavioral aspects of protein ingestion by the blowfly *Phormia regina* Meigen. *The Biological Bulletin*, 121(3), 456–470.

Detzel, A., y Wink, M. (1993). Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. *Chemoecology*, 4, 8–18. <https://doi.org/10.1007/BF01245891>

Di Lorenzo, P. M., Leshchinskiy, S., Moroney, D. N., y Ozdoba, J. M. (2009). Making time count: functional evidence for temporal coding of taste sensation. *Behavioral Neuroscience*, 123(1), 14. <https://doi.org/10.1037/a0014176>

Dobson, H. E. (1988). Survey of pollen and pollenkitt lipids—chemical cues to flower visitors? *American Journal of Botany*, 75, 170–182. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb13429.x>

Dobson, H. E. (1991). Analysis of flower and pollen volatiles. En Linskens, H. F., y Jackson, J. F. (Eds.). *Essential oils and waxes*, (pp 231–251). Springer, Berlin.

Dobson, H. E., y Bergström, G. (2000). The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Systematics and Evolution*, 222, 63–87. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6306-1_4

Dobson, H. E., Bergström, G., y Groth, I. (1990). Differences in fragrance chemistry between flower parts of *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Israel Journal of Plant Sciences*, 39(1–2), 143–156.

Dobson, H. E., Groth, I., y Bergström, G. (1996). Pollen advertisement: chemical contrasts between whole-flower and pollen odors. *American Journal of Botany*, 83, 877–885. <https://doi.org/10.2307/2446264>

Dobson, H. E., Danielson, E. M., y Wesep, I. D. V. (1999). Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Plant Species Biology*, 14, 153–166. <https://doi.org/10.1046/j.1442-1984.1999.00020.x>

Enciclopedia Británica. (2024a). Ciclo de vida de la abeja de la miel. [En línea]. Encyclopaedia Britannica, Inc. [Citado: Junio, 2024] <https://www.britannica.com/animal/honeybee>

Enciclopedia Británica. (2024b). Anatomía de la abeja de la miel. [En línea]. Encyclopaedia Britannica, Inc. [Citado: Junio, 2024] <https://www.britannica.com/animal/honeybee>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1980.tb00244.x>

Erber, J., Hoorman, J., y Scheiner, R. (2006). Phototactic behaviour correlates with gustatory responsiveness in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behavioural Brain Research*, 174, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.07.023>

Esslen, J., y Kaissling, K. (1976). Zahl und Verteilung antennaler Sensillen bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Zoomorphologie*, 83, 227–251.

Excels, W. (1974). Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera. *American Zoologist*, 14(4), 1229–1237. <https://doi.org/10.1093/icb/14.4.1229>

Fewell, J. H., y Winston, M. L. (1992). Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 30, 387–393. <https://doi.org/10.1007/BF00176173>

Fewell, J. H., Ydenberg, R. C., y Winston, M. L. (1991). Individual foraging effort as a function of colony population in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour*, 42(1), 153–155. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80618-9](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80618-9)

Flatt, T., Tu, M.P., y Tatar, M. (2005). Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bioessays*, 27, 999–1010. <https://doi.org/10.1002/bies.20290>

Ford, D. M., Hepburn, H. R., Moseley, F. B., y Rigby, R. J. (1981). Displacement sensors in the honeybee pollen basket. *Journal of Insect Physiology*, 27, 339–346. <https://doi.org/10.1002/bies.20290>

Forêt, S., y Maleszka, R. (2006). Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Research*, 16(11), 1404–1413. <https://doi.org/10.1101/gr.5075706>

Forêt, S., Wanner, K. W., y Maleszka, R. (2007). Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1), 19–28.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.09.009>

Fox, J., y Weisberg, S. (2019). *An R Companion to Applied Regression, Third edition*. Sage, Thousand Oaks CA.

Frasnelli, E., Anfora, G., Trona, F., Tessarolo, F., Vallortigara, G., (2010). Morphofunctional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research*, 209(2), 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.046>

Free, J. B. (1969). Influence of the odour of a honeybee colony's food stores on the behaviour of its foragers. *Nature*, 222, 778. <https://doi.org/10.1038/222778a0>

Frings, H., y Frings, M. (1949). The loci of contact chemoreceptors in insects. A review with new evidence. *American Midland Naturalist*, 602–658. <https://doi.org/10.2307/2421776>

Galizia, C. G. (2014). Olfactory coding in the insect brain: data and conjectures. *European Journal of Neuroscience*, 39, 1784–1795. <https://doi.org/10.1111/ejn.12558>

Galizia, C. G., y Rössler, W. (2010). Parallel olfactory systems in insects: anatomy and function. *Annual Review of Entomology*, 55, 399–420.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085442>

Galizia, C. G., Sachse, S., Rappert, A., y Menzel, R. (1999). The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Neuroscience*, 2, 473–8. <https://doi.org/10.1038/8144>

Galizia, C. G., Kunze, J., Gumbert, A., Borg-Karlson, A-K., Sachse, S., Markl, C., y Menzel, R. (2005). Relationship of visual and olfactory signal parameters in a food-deceptive flower mimicry system. *Behavioral Ecology*, 16, 159–168.
<https://doi.org/10.1093/beheco/arh147>.

Gardener, M. C., y Gillman, M. P. (2001). Analyzing variability in nectar amino acids: composition is less variable than concentration. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2545–2558. <https://doi.org/10.1023/A:1013687701120>

Giles, A. C., y Rankin, C. H. (2009). Behavioral and genetic characterization of habituation using *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of learning and memory*, 92(2), 139–146.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.08.004>

Giurfa, M. (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(8), 801–824.
<https://doi.org/10.1007/s00359-007-0235-9>

Giurfa, M., y Sandoz, J. C. (2012). Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & Memory*, 19(2), 54–66. <https://doi.org/10.1101/lm.024711.111>

Gomez-Diaz, C., Reina, J. H., Cambillau, C., y Benton, R. (2013). Ligands for pheromone-sensing neurons are not conformationally activated odorant binding proteins. *PLoS Biology*, 11, e1001546. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001546>

Gothilf, S., Kehat, M., Jacobson, M., y Galun, R. (1978). Screening pheromone analogues by EAG technique for biological activity on males of *Earias insulana*, *Heliothis armigera*, and *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Entomology, 7, 31–35.
<https://doi.org/10.1093/ee/7.1.31>

Goyret, J., y Farina, W. M. (2005). Trophallactic chains in honeybees: a quantitative approach of the nectar circulation amongst workers. *Apidologie*, 36(4), 595–600.

Gramacho, K., y Spivak, M. (2003). Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 54, 472–479. <https://doi.org/10.1007/s00265-003-0643-y>

Greggers, U., y Menzel, R. (1993). Memory dynamics and foraging strategies of honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32, 17–29. <https://doi.org/10.1007/BF00172219>

Grüter, C., Arenas, A., y Farina, W. M. (2008). Does pollen function as a reward for honeybees in associative learning? *Insectes Sociaux*, 55, 425–427.
<https://doi.org/10.1007/s00040-008-1022-5>

Halle, E. A., y Carlson, J. R. (2006). Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell*, 125, 143–160. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.050>

Hammer, M., y Menzel, R. (1995). Learning and memory in the honeybee. *The Journal of Neuroscience*, 15(3), 1617–1630. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-01617.1995>

Harano, K., y Nakamura, J. (2016). Nectar loads as fuel for collecting nectar and pollen in honeybees: adjustment by sugar concentration. *Journal of Comparative Physiology A*, 202(6), 435–443. <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1088-x>

Harano, K., Mitsuhasha-Asai, A., Konishi, T., Suzuki, T., y Sasaki, M. (2013). Honeybee foragers adjust crop contents before leaving the hive. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67, 1169–1178. <https://doi.org/10.2307/23500495>

Harano, K. I., Mitsuhasha-Asai, A., y Sasaki, M. (2014). Honey loading for pollen collection: regulation of crop content in honey bee pollen foragers on leaving hive. *Naturwissenschaften*, 101, 595–598. <https://doi.org/10.1007/s00114-014-1185-z>

Harborne, J. B (1982). *Introduction to ecological biochemistry*. Academic Press, Londres.

Harrison, X. A., (2015). A comparison of observation-level random effect and Beta-Binomial models for modelling overdispersion in Binomial data in ecology & evolution. *PeerJ*, 3, e1114. <https://doi.org/10.7717/peerj.1114>

Herbert, E. W., y Shimanuki, H. (1978). Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9, 31–40.
<https://doi.org/10.1051/APIDO:19780103>

Hesse, M. (1993). Pollenkitt development and composition in *Tilia platyphyllos* (Tiliaceae) analysed by conventional and energy filtering TEM (pp. 39-52). *Plant Systematics and Evolution*, 7, 39–52. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6661-1_4

Hiebert, S. M., y Calder, W. A. (1983). Sodium, potassium, and chloride in floral nectars: energy-free contributions to refractive index and salt balance. *Ecology*, 64, 399–402.
<https://doi.org/10.2307/1937086>

Hildebrand, J. G., y Shepherd, G. M. (1997). Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annual Review of Neuroscience*, 20(1), 595–631. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.20.1.595>

Huang, J., Zhang, Z., Feng, W., Zhao, Y., Aldanondo, A., de Brito Sanchez, M. G., Paoli, M., Rolland, A., Li, Z., Nie, H., Lin, Y., Zhang, S., Giurfa, M., y Su, S. (2022). Food wanting is mediated by transient activation of dopaminergic signaling in the honey bee brain. *Science*, 376, 508–512. <https://doi.org/10.1126/science.abn9920>

Humphries, M. A., Fondrk, M. K., y Page, R. E. Jr. (2005). Locomotion and the pollen hoarding behavioral syndrome of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 191, 669–674.
<https://doi.org/10.1007/s00359-005-0624-x>

Iovinella, I., Cappa, F., Cini, A., Petrocelli, I., Cervo, R., Turillazzi, S., y Dani, F. R. (2018). Antennal protein profile in honeybees: caste and task matter more than age. *Frontiers in Physiology*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00748>

Jeanne, R. L. (2016). Division of labor is not a process or a misleading concept. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70, 1109–1112. <https://doi.org/10.1007/s00265-016-2146-7>

Jeanson, R. (2019). Within-individual behavioural variability and division of labour in social insects. *Journal of Experimental Biology*, 222(10), jeb190868. <https://doi.org/10.1242/jeb.190868>

Karlson, P., y Lüscher, M. (1959). ‘Pheromones’: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183(4653), 55–56. <https://doi.org/10.1038/183055a0>

Kennedy, A., Peng, T., Glaser, S. M., Linn, M., Foitzik, S., y Grüter, C. (2021). Use of waggle dance information in honey bees is linked to gene expression in the antennae, but not in the brain. *Molecular Ecology*, 30(11), 2676–2688. <https://doi.org/10.1111/mec.15893>

Kevan, P. G., y Ebert, T. (2005). Can almond nectar & pollen poison honey bees? *American Bee Journal*, 145(6), 507–509.

Kim, Y. S., y Smith, B. H. (2000). Effect of an amino acid on feeding preferences and learning behavior in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 46, 793–801. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00168-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00168-7)

Koltermann, R. (1969). Lern- und Vergessensprozesse bei der Honigbiene: aufgezeigt anhand von Duftdressuren. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 63, 310e334.

Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., y Maleszka, R. (2008). Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319(5871), 1827–1830. <https://doi.org/10.1126/science.1153069>

Kunert, K., y Crailsheim, K. (1987). Sugar and protein in the food for honeybee worker larvae. En Eder, J., y Rembold, H. (Eds.). *Chemistry and Biology of Social Insects*, (pp 164–165). J Peperny, Munich.

Kussell, E., y Leibler, S. (2005). Phenotypic Diversity, Population Growth, and Information in Fluctuating Environments. *Science*, 309, 2075-2078. <https://doi.org/10.1126/science.1114383>

Kuwabara, M. (1957). Bildung Des Bedingten reflexes Von Pavlovs Typus Bei Der Honigbiene, *Apis mellifera*. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University Series VI Zoology*, 13, 458–464.

Le Conte, Y, y Hefetz, A. (2008). Primer pheromones in social Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 53, 523–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091434>

Leal, W. S. (2013). Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58, 373–391.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>

Lecomte, C., y Pouzat, J. (1985). Electroantennographic responses of two ichneumonid parasitoids, *Diadromus pulchellus* and *Diadromus collaris*, to odors emitted by plants, the phytophagous host *Acrolepiopsis assectella* and the sexual partner. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 39, 295–306.

Lenth, R. V. (2019). emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means.
<https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans>.

Leoncini, I., Le Conte, Y., Costagliola, G., Plettner, E., Toth, A. L., Wang, M., Huang, Z., Bécard, J., Crauser, D., Slessor, K. N., y Robinson, G. E. (2004). Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 17559–64.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407652101>

Lepage, M., y Boch, R. (1968). Pollen lipids attractive to honeybees. *Lipids*, 3(6), 530-534.
<https://doi.org/10.1007/BF02530897>

Lindauer, M. (1952). Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 34(4), 299–345.

Light, D.M., Jang, E.B., Dickens, J.C. (1988). Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to a spectrum of plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 14, 159–180.

Lunau, K. (1995). Notes on the colour of pollen. *Plant Systematics and Evolution*, 198, 235–252. <https://doi.org/10.1007/BF00984739>

Ma, R., Mueller, U. G., y Rangel, J. (2016). Assessing the role of β-ocimene in regulating foraging behavior of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 47, 135–144.
<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0382-x>

Mackintosh, N. J. (1994). *Animal learning and cognition*. Academic Press, Londres.

Mackintosh, N. J. (2013). *Animal learning and cognition*. Academic Press, Londres.

Mafra-Neto, A., y Cardé, R. T. (1994). Fine-scale structure of pheromone plumes modulates upwind orientation of flying moths. *Nature*, 369, 142–144.
<https://doi.org/10.1038/369142a0>

Maisonnable, A., Lenoir, J., Costagliola, G., Beslay, D., Choteau, F., Crauser, D., Becard, J., Plettner, E., y Le Conte, Y. (2009). A scientific note on E- β -ocimene, a new volatile primer pheromone that inhibits worker ovary development in honey bees. *Apidologie*, 40, 562–564. <https://doi.org/10.1051/apido/2009024>

Maisonnable, A., Lenoir, J., Beslay, D., Crauser, D., y Le Conte, Y. (2010). E- β -ocimene, a volatile brood pheromone involved in social regulation in the honey bee colony (*Apis mellifera*). *PLoS One*, 5, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013531>

Manning, R. (2001). Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World*, 82, 60–75. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2001.11099504>

Marshall, J. (1935). On the sensitivity of the chemoreceptors on the antenna and fore-tarsus of the honey-bee *Apis mellifera* L. *Journal of Experimental Biology*, 12(1), 17–26.
<https://doi.org/10.1242/jeb.12.1.17>

Mattiacci, A., Goñalons, C. M., Masciocchi, M., y Corley, J. C. (2023). Gustatory responsiveness in *Vespa germanica* workers: exploring the interplay between sensory perception and task specialization. *Insect Science*, 31(2), 1–12.
<https://doi.org/10.1111/1744-7917.13258>

Menzel, R. (1985). Learning in honey bees in an ecological and behavioral context. En Holldobler, B., y Lindauer, M. (Eds.). *Experimental Behavioral Ecology and Sociobiology*, (pp 55–74). Gustav Fischer, Nueva York.

Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 185, 323–340.
<https://doi.org/10.1007/s003590050392>

Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees: a comparative study*. Harvard University Press, Cambridge.

Michener, C. D. (2000). *The bees of the world* (Vol. 1). The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Michener, C. D. (2007). The professional development of an entomologist. *Annual Review of Entomology*, 52, 1–15. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091404>

Minnich, D. E. (1932). The contact chemoreceptors of the honey bee, *Apis mellifera* Linn. *Journal of Experimental Zoology*, 61, 375–393. <https://doi.org/10.1002/jez.1400610303>

Moritz, B., y Crailsheim, K. (1987). Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 33, 923–931. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90004-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90004-7)

Muth, F., Breslow, P. R., Masek, P., y Leonard, A. S. (2018). A pollen fatty acid enhances learning and survival in bumblebees. *Behavioral Ecology*, 29(6), 1371–1379. <https://doi.org/10.1093/beheco/ary111>

Nery, D., Moreno, E., y Arenas, A. (2020). Pollen reinforces learning in honey bee pollen foragers but not in nectar foragers. *Journal of Experimental Biology*. 223, jeb230250. <https://doi.org/10.1242/jeb.230250>

Nicholls, E., y Hempel de Ibarra, N. (2013). Pollen elicits proboscis extension but does not reinforce PER learning in honeybees. *Insects*, 4, 542–557. <https://doi.org/10.3390/insects4040542>

Nicolson, S. W. (2011). Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46, 197–204. <https://doi.org/10.3377/004.046.0201>

Nicolson, S. W., Nepi, M., y Pacini, E. (2007). *Nectaries and nectar*. Springer. Dordrecht.

Nouvian, M., y Galizia, C. G. (2019). Aversive training of honey bees in an automated y-maze. *Frontiers in Physiology*, 10, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00678>

Olsson, S. B., y Hansson, B. S. (2013). Electroantennogram and single sensillum recording in insect antennae. En Touhara, K. (Ed.). *Pheromone Signaling: Methods and Protocols*, (pp 157–177). Humana Press, Nueva Jersey.

Oster, G.F., y Wilson, E.O. (1978). *Caste and ecology in the social insects*. Princeton, Nueva Jersey.

Page, R. E. Jr. y Fondrk, M. K. (1995). The effects of colony-level selection on the social organization of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies: colony-level components of pollen hoarding. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36, 135–144. <https://doi.org/10.1007/s002650000183>

Page, R. E. Jr. y Fondrk, M. K. (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. <https://doi.org/10.1007/s003590050196>

Page, R. E. Jr., Scheiner, R., Erber, J., y Amdam, G. V. (2006) The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (*Apis mellifera* L.). *Current Topics in Developmental Biology*, 74, 253–286.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)74008-X](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)74008-X)

Pankiw, T., Page, R. E. Jr. y Fondrk, M. K. (1998). Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 44, 193–198.
<https://doi.org/10.1007/s002650050531>

Pankiw, T. y Page, R. E. Jr. (1999). The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 185, 207–213. <https://doi.org/10.1007/s003590050196>

Pankiw, T., and Page, R. E. (2000). Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 47, 265–267.
<https://doi.org/10.1007/s002650050664>.

Pankiw, T., y Page, R. E. Jr. (2001). Brood pheromone modulates honeybee (*Apis mellifera* L.) sucrose response thresholds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49, 206–213.
<https://doi.org/10.1007/s002650000282>

Pankiw, T., Waddington, K. D., y Page, R. E. (2001). Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera* L.): influence of genotype, feeding, and foraging experience. *Journal of Comparative Physiology A*, 187, 293–301.
<https://doi.org/10.1007/s003590100201>

Pankiw, T. y Page, R. E. Jr. (2003). Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A.*, 189, 675–684. <https://doi.org/10.1007/s00359-003-0442-y>

Pankiw, T. (2004). Brood pheromone regulates foraging activity of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97, 748–51.
[https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2004\)097\[0748:BPRFAO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2004)097[0748:BPRFAO]2.0.CO;2)

Paoli, M., y Galizia, G. C. (2021). Olfactory coding in honeybees. *Cell and Tissue Research*, 383(1), 35–58. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03385-5>

Patte, F., Etcheto, M., Marfaing, P., y Laffort, P. (1989). Electroantennogram stimulus-response curves for 59 odorants in the honey bee. *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology A*, 35, 667–675. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90086-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90086-3)

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

Pelz, C., Gerber, B., y Menzel, R. (1997). Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation. *Journal of Experimental Biology*, 200(4), 837–847.
<https://doi.org/10.1242/jeb.200.4.837>

Perez, M., Rolland, U., Giurfa, M. y d'Ettorre, P. (2013). Sucrose responsiveness, learning success, and task specialization in ants. *Learning & Memory*, 20, 417–420.
<https://doi.org/10.1101/lm.031427.113>

Pernal, S. F., y Currie, R. W. (2001). The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51, 53–68.
<https://doi.org/10.1007/s002650100412>

Pernal, S.F., y Currie, R. W. (2002). Discrimination and preferences for pollen-based cues by foraging honeybees, *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour*, 63, 369–390.
<https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1904>

Pettitt, J. M., y Beck, C. B. (1967). Seed from the Upper Devonian. *Science*, 156(3783), 1727–1729. <https://doi.org/10.1126/science.156.3783.1727>

Pietrantuono, A. L., Requier, F., Fernández-Arhex, V., Winter, J., Huerta, G., y Guerrieri, F. (2019). Honeybees generalize among pollen scents from plants flowering in the same seasonal period. *Journal of Experimental Biology*, 222(21), jeb201335.
<http://dx.doi.org/10.1242/jeb.201335>

Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., Heisterkamp, S., Van Willigen, B., y Maintainer, R. (2017). Package “nlme”, Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>.

Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., y Hartfelder, K. (1990). Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 79(1), 31–38.
[https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90085-z](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90085-z)

Raguso, R. A. (2004). Why are some floral nectars scented? *Ecology*, 85, 1486–1494.
<https://doi.org/10.1890/03-0410>

Ramachandran, R., Khan, Z.R., Caballero, P., y Juliano, B.O. (1990). Olfactory sensitivity of two sympatric species of rice leaf folders (Lepidoptera: Pyralidae) to plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 16, 2647–2666. <https://doi.org/10.1007/BF00988076>

Ramírez, G. P., Martínez, A. S., Fernández, V. M., Corti Bielsa, G. y Farina, W. M. (2010). The influence of gustatory and olfactory experiences on responsiveness to reward in the honeybee. *PLoS One*, 5(10), e13498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013498>

Ramirez, W. C. G., Thomas, N. K., Muktar, I. J., y Riabinina, O. (2023). The neuroecology of olfaction in bees. *Current Opinion in Insect Science*, 56, 101018. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2023.101018>

Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Coppola, G., Geyer, M. A., Glanzman, D. L., Marsland, S., McSweeney, F. K., Wilson, D. A., Wu, C. F., y Thompson, R. F. (2009). Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>

Rescorla, R. A., y Wagner, A. R. (1972). A theory of Pavlovian conditioning: variations of the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. En Black, A. H., y Prokasy, W. T. (Eds.). *Classical Conditioning. II. Current Research and Theory*, (pp 64–99). Appleton-Century-Crofts, Nueva York.

Ribbands, C. R. (1955). The scent perception of the honeybee. *Proceedings of the Royal Society B*, 143, 367e379. <https://doi.org/10.1098/rspb.1955.0017>

Riveros, A. J., y Gronenberg, W. (2010). Sensory allometry, foraging task specialization and resource exploitation in honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64, 955–966. <https://doi.org/10.1007/s00265-010-0911-6>

Robertson, H. M., y Wanner, K. W. (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. <https://doi.org/10.1101/gr.5057506>

Robinson, G. E. (1987). Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20, 329–338. <https://doi.org/10.1007/BF00300679>

Robinson, G. E. (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology*, 37, 637–65. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003225>

Robinson, G., y Page, R. E. Jr. (1989). Genetic basis for division of labor in an insect society. En Breed, M., y Page, R. E. Jr. (Eds.). *The Genetics of Social Evolution*, (pp 61–80). Westview Press, Colorado.

Robinson, G. E., y Page, R. E. Jr. (1989). Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging, and nest-site scouting in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 24, 317–323.

Rodriguez-Arce, A. L., y Diaz, N. (1992). The stability of beta-carotene in mango nectar. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico (USA)*, 76(2), 101–102.
<https://doi.org/10.46429/jaupr.v76i2.4139>

Roussel, E., Carcaud, J., Sandoz, J. C., y Giurfa, M. (2009). Reappraising social insect behavior through aversive responsiveness and learning. *PLoS One*, 4(1): e4197.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004197>

Ruedenauer, F. A., Spaethe, J., y Leonhardt, S. D. (2015). How to know which food is good for you: bumblebees use taste to discriminate between different concentrations of food differing in nutrient content. *Journal of Experimental Biology*, 218(14), 2233–2240.
<https://doi.org/10.1242/jeb.118554>

Ruedenauer, F. A., Leonhardt, S. D., Schmalz, F., Rössler, W., y Strube-Bloss, M. F. (2017). Separation of different pollen types by chemotactile sensing in *Bombus terrestris*. *Journal of Experimental Biology*, 220(8), 1435–1442. <https://doi.org/10.1242/jeb.153122>

Ruedenauer, F. A., Wöhrle, C., Spaethe, J., y Leonhardt, S. D. (2018). Do honeybees (*Apis mellifera*) differentiate between different pollen types? *PLoS One*, 13(11), e0205821.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205821>

Ruedenauer, F. A., Leonhardt, S. D., Lunau, K., y Spaethe, J. (2019). Bumblebees are able to perceive amino acids via chemotactile antennal stimulation. *Journal of Comparative Physiology A*, 205(3), 321–331. <https://doi.org/10.1007/s00359-019-01321-9>

Russell, A. L., Buchmann, S. L., y Papaj, D. R. (2017). How a generalist bee achieves high efficiency of pollen collection on diverse floral resources. *Behavioral Ecology*, 28(4), 991–1003. <https://doi.org/10.1093/beheco/arx058>

Sadd, B. M., Barribeau, S. M., Bloch, G., de Graaf, D. C., Dearden, P., Elsik, C. G., Gadau, J., Grimmelikhuijen, C. J. P., Hasselmann, M., Lozier, J. D., Robertson, H. M., Smagghe, G., Stolle, E., Van Vaerenbergh, M., Waterhouse, R. M., Bornberg-Bauer, E., Klasberg, S., Bennett, A. K., Câmara, F., ... Worley, K. C. (2015). The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organization. *Genome Biology*, 16(1), 1–32.
<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0623-3>

Sandoz, J. C. (2011) Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 98.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00098>

Sandoz, J. C., Hammer, M., y Menzel, R. (2002). Side-specificity of olfactory learning in the honeybee: US input side. *Learning & Memory*, 9(5), 337–348.
<https://doi.org/10.1101/lm.50502>

Schmidt, J. (1985). Phagostimulants in pollen. *Journal of Apicultural Research*, 24(2), 107–114. <https://doi.org/10.1080/00218839.1985.11100657>

Scheiner, R. (2004). Responsiveness to sucrose and habituation of the proboscis extension response in honey bees. *Journal of Comparative Physiology A*, 190, 727–733.
<https://doi.org/10.1007/s00359-004-0531-6>

Scheiner, R., Erber, J., y Page, R. E. Jr. (1999). Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 185:1–10. <https://doi.org/10.1007/s003590050296>

Scheiner, R., Page, R. E. Jr., y Erber, J. (2001a) Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains. *Behavioural Brain Research*, 120, 67–73. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00359-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00359-4)

Scheiner, R., Page, R. E. Jr. y Erber, J. (2001b). The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiology of Learning and Memory*, 76, 138–150.
<https://doi.org/10.1006/nlme.2000.3996>

Scheiner, R., Barnert, M., y Erber, J. (2003). Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bees. *Apidologie*, 34, 67–72. <https://doi.org/10.1051/apido:2002050>

Scheiner, R., Page, R. E. Jr. y Erber, J. (2004) Sucrose responsiveness and behavioural plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 35, 133–142.
<https://doi.org/10.1051/apido:2004001>

Scheiner, R., Kuritz-Kaiser, A., Menzel, R., y Erber, J. (2005). Sensory responsiveness and the effects of equal subjective rewards on tactile learning and memory of honeybees. *Learning & Memory*, 12, 626–635. <https://doi.org/10.1101/lm.98105>

Schneider, D. (1957). Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo-und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 40(1), 8–41.

Schneider, D., y Hecker, E. (1956). Zur Elektrophysiologie der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* bei Reizung mit angereicherten Extrakten des Sexuallockstoffes. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 11(3), 121–124.

Seeley, T. D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 11(4), 287–293.
<https://doi.org/10.1007/BF00299306>

Seeley, T. D. (1995). *The Wisdom of the Hive: The Social Physiology of Honey Bee Colonies*. Harvard University Press, Cambridge.

Shiraishi, A., y Kuwabara, M. (1970). The effects of amino acids on the labellar hair chemosensory cells of the fly. *The Journal of General Physiology*, 56(6), 768–782.
<https://doi.org/10.1085/jgp.56.6.768>

Simpson, B., y Neff, J. (1983). Evolution and diversity of floral rewards. En Jones, C. E., y Little, R. J. (Eds.). *Handbook of Experimental Pollination Biology*, (pp 277–293). Van Nostrand Reinhold, Nueva York.

Smith, K. E. (2016). Causes and consequences of variation in learning performance in the bumblebee (*Bombus terrestris*). Tesis de doctorado, University of London, Royal Holloway.

Somerville, D. C., y Nicol, H. I. (2006). Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(1), 141–149.
<https://doi.org/10.1071/EA03188>

Spivak, M., Masterman, R., Ross, R., y Mesce, K. A. (2003). Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera L.*) and the modulatory role of octopamine. *Journal of Neurobiology*, 55(3), 341–354. <https://doi.org/10.1002/neu.10219>

Strand, F. L. (1999). *Neuropeptides: Regulators of Physiological Processes*. MIT Press, Cambridge.

Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 6, 168–179. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(61\)90060-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(61)90060-9)

Thompson, R. F. y Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review*, 73, 16–43.
<https://doi.org/10.1037/h0022681>

Thorp, R. W. (1979). Structural, behavioral, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 66, 788–812.
<https://doi.org/10.2307/2398919>

Thorp, R. W. (2000). The collection of pollen by bees. *Plant Systematics and Evolution*, 222(1), 211–223. <https://doi.org/10.1007/BF00984103>

Traynor, K. S., Le Conte, Y., y Page, R. E. Jr. (2015) Age matters: pheromone profiles of larvae differentially influence foraging behavior in the honeybee, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour*, 99, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.10.009>

Trouiller, J., Arnold, G., Chappe, B., Le Conte, Y., y Masson, C. (1991) Temporal pheromonal and kairomonal secretion in the brood of honeybees. *Naturwissenschaften*, 78, 368–370.

Vogel, S. (1971). Pollination of oil-producing flowers by oil-collecting bees. *Naturwissenschaften*, 58, 58.

Vogel, S. (1983). Ecophysiology of zoophilic pollination. En Lange, O. L., Nobel, P. S., Osmond, C. B., y H. Ziegler (Eds.). *Physiological Plant Ecology III*, (pp 559–624). Springer, Berlin.

Vogt, R. G., Riddiford, L. M., Prestwich, G. D. (1985). Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 82, 8827–31.
<https://doi.org/10.1073/pnas.82.24.8827>

Von Aufsess, A. (1960). Geruchliche Nahorientierung Der Biene Bei Entomophilen Und Ornithophilen Bluten. *Zeitschrift Fur Vergleichende Physiologie*, 43(5), 469–498.

von Frisch, K. (1923). Über die Sprache der Bienen. *Zoologische Jahrbücher Abteilung für Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere*, 40, 1–186.

von Frisch, K. (1967). *The Dance Language and Orientation of Bees*. Harvard University Press, Cambridge.

von Frisch, K. (1965). *Die tänze der bienen*. Springer, Berlin.

Weber, M. (1996). The existence of a special exine coating in *Geranium robertianum* pollen. *International Journal of Plant Sciences*, 157(2), 195–202.

- Wenner, A. M., y Wells, P. H.** (1990). *Anatomy of a Controversy: the Question of a 'Language' among Bees*. Columbia University Press, Nueva York.
- West-Eberhard, M. J.** (1987). *Flexible Strategy and Social Evolution*. En Ito, Y., Brown, L., y Kikkawa, J. (Eds.). *Animal Societies. Theories and Facts*, (pp 35–51). The Japan Science Society, Japan.
- West-Eberhard, M. J.** (1996). *Natural history and evolution of paper-wasps*. Oxford University Press, Oxford.
- Whitehead, A. T., y Larsen, J. R.** (1976a). Ultrastructure of the contact chemoreceptors of *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 5(4–5), 301–315. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(76\)90030-1](https://doi.org/10.1016/0020-7322(76)90030-1)
- Whitehead, A. T., y Larsen, J. R.** (1976b). Electrophysiological responses of galeal contact chemoreceptors of *Apis mellifera* to selected sugars and electrolytes. *Journal of Insect Physiology*, 22(12), 1609–1616. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(76\)90052-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(76)90052-4)
- Wiermann, R., y Gubatz, S.** (1992). Pollen wall and sporopollenin. *International Review of Cytology*, 140 35–72. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61093-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61093-1)
- Wilmsen, S., Gottlieb, R., Junker, R. R., y Lunau, K.** (2017). Bumblebees require visual pollen stimuli to initiate and multimodal stimuli to complete a full behavioral sequence in close-range flower orientation. *Ecology and Evolution*, 7(5), 1384–1393. <https://doi.org/10.1002/ece3.2768>
- Wilson, E. O.** (1971). *The Insect Societies*. Harvard University Press, Cambridge.
- Winston, M.L.** (1987). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge
- Wolf, L., Silander, O. K., y van Nimwegen, E.** (2015). Expression noise facilitates the evolution of gene regulation. *eLife*, 4, e05856. <https://doi.org/10.7554/eLife.05856>
- Wright, G. A.** (2009). The ‘sweet tooth’ of the honeybee: the perception of nectar and its influence on honeybee behaviour. *SEB Experimental Biology Series*, 63, 183–204.
- Wright, G. A., Nicolson, S. W., y Shar, S.** (2018). Nutritional physiology and ecology of honey bees. *Annual Review of Entomology*, 63, 327–344. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043423>