



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Respuestas comportamentales de la abeja *Apis mellifera* frente a cambios en la calidad del polen: evaluación del recurso, efecto de las experiencias y transferencia de información

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

Lic. Rocío Lajad

Director/a de Tesis: Dr. Andrés Arenas

Consejero/a de Estudios: Dr. Walter Farina

Lugar de trabajo: Laboratorio de Insectos Sociales, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Fecha de presentación: Buenos Aires, 2024

Respuestas comportamentales de la abeja *Apis mellifera* frente a cambios en la calidad del polen: evaluación del recurso, efecto de las experiencias y transferencia de información

Resumen

La selección del polen en las colonias de *Apis mellifera* es determinante para su desarrollo y productividad. El polen es el principal recurso proteico y lipídico para las abejas melíferas, y varía considerablemente en su composición según el origen floral. Las abejas consumen el polen almacenado en la colmena a edades tempranas (mayormente cuando se desempeñan como nodrizas) mientras que las abejas maduras, que recolectan recursos en el exterior, pierden su capacidad de digerirlo. Debido a las diferencias en el uso del polen por parte de ambos grupos de obreras, se planteó como hipótesis que la evaluación de la calidad del polen ocurre en el interior del nido mediada por las abejas jóvenes que lo consumen y procesan. A partir de esta evaluación, las abejas recolectoras obtendrían información del polen dentro del nido que les permite ajustar la selección del recurso en las fuentes. Para indagar acerca de los mecanismos que influyen en las decisiones de forrajeo de las colonias, en una primera aproximación (capítulo 2) se comparó, por un lado, el perfil de elección de polen entre abejas jóvenes y recolectoras frente a una misma oferta de pólenes y, por otro, si esas elecciones pueden ajustarse con la experiencia. Con respecto a estos objetivos, se evidenció que la elección de pólenes de abejas jóvenes y maduras es diferente y que, tras experimentar la combinación ofrecida por un período más largo de tiempo, las elecciones pueden modificarse. En el capítulo 3, se investigó si las abejas jóvenes aprenden las claves de pólenes de distinta calidad y ajustan sus preferencias hacia los pólenes más adecuados. Para esto, se midieron las preferencias de consumo de dos pólenes. De forma previa a esta medición, las abejas habían experimentado uno de ellos adulterado con un compuesto nocivo (amigdalina o quinina) o con un fagoestimulante (ácido linoleico). Estas preferencias fueron estudiadas tanto en abejas en edad de nodrizas confinadas en cajas en el laboratorio como en abejas de colmenas en el apiario. Los resultados mostraron que las preferencias de consumo de las abejas jóvenes, tanto en cajas como en colonias, se redujeron en el caso del polen adulterado con sustancias nocivas y se incrementaron en el caso del polen

suplementado con ácido linoleico. Esto sugiere que las abejas jóvenes asocian las claves especie-específicas del polen con las experiencias negativas o positivas, y forman memorias que sesgan sus elecciones. En el capítulo 4, se propuso estudiar si las abejas maduras (recolectoras) aprenden las claves de los pólenes según su calidad y si modifican sus decisiones de recolección de acuerdo con estas experiencias. En este caso, se esperaba que aquellos constituyentes del polen que sólo pueden evaluarse tras la ingestión no modifiquen las preferencias de las recolectoras durante las primeras visitas a las fuentes sino de forma retardada luego de experimentar el polen en el interior del nido. Por un lado, se realizaron experimentos de doble elección en una estación de forrajeo para comprobar si las recolectoras evitaban el polen adulterado con amigdalina luego de haber sido ofrecido en las fuentes o en el interior del nido. Por otro lado, se realizaron experimentos a campo donde se registró la selección de polen de colonias después de suministrarles polen de una de las especies dominantes (*Diplotaxis tenuifolia*), el cual fue adulterado con amigdalina. A partir de los experimentos de doble elección, se evidenció que las recolectoras no pudieron evitar el polen adulterado en el sitio de forrajeo, pero si lo evitaron posteriormente luego de que el polen adulterado fuera incorporado dentro del nido. En cuanto al efecto observado en el campo, las muestras de polen de las colonias tratadas fueron más diversas que las de los controles, lo que sugiere que las abejas se inclinaron por recolectar de fuentes novedosas. Por último, se estudiaron los mecanismos de transferencia de información relativa a la calidad del polen en el interior de la colmena entre las abejas jóvenes y las abejas recolectoras (capítulo 5). Se mostró que las preferencias de las recolectoras cambiaron únicamente cuando interactuaron con abejas jóvenes experimentadas mientras el polen estuvo disponible para ambos grupos. En conclusión, los resultados obtenidos de la presente tesis apoyan la hipótesis de que la selección del polen durante la recolección depende, al menos en parte, de las experiencias de las abejas jóvenes, que pueden transferir la información sobre la calidad del recurso a las recolectoras, a través de las claves especie-específicas de los pólenes presentes en las reservas del nido.

Palabras clave: *Apis mellifera*, abejas jóvenes, abejas recolectoras, aprendizaje post-ingestión, evaluación del polen, experiencias en la colmena, polen adulterado.

Behavioural response of the honey bee *Apis mellifera* to changes in pollen suitability: resource assessment, effect of experiences and information transfer.

Abstract

Pollen selection in *Apis mellifera* colonies is essential for their development and productivity. Pollen is the main protein and lipid resource for honey bees, and its composition considerably varies according to floral origin. Bees consume the pollen stored in the hive at an early age (mostly when they perform as nurses) while mature bees, which collect resources from outside, lose their ability to digest it. Given the differences in pollen use by the two groups of workers, we hypothesise that the assessment of pollen suitability occurs within the nest mediated by young bees that consume and process pollen. In this scenario, forager bees might acquire information from pollen within the nest which allows them to adjust pollen selection in the field. To investigate the mechanisms that influence foraging decisions in colonies, a first approach (chapter 2) compared the pollen choice profile of young bees and foragers when faced with the same pollen supply. In addition, I investigated whether these choices can be adjusted by the experience. Results showed that pollen choices in young and mature bees is different and that they can be modified after experiencing the pollen combination offered for a longer period. In chapter 3, I investigate whether young bees learn the cues of pollens of different quality and adjust their preferences towards the most suitable options. For this, the consumption preferences of two pollens were measured. Prior to this measurement, the bees had experienced one of them adulterated with a noxious compound (amygdalin or quinine) or with a phagostimulant (linoleic acid). These preferences were studied both in nurse-aged bees confined in cages in the laboratory and in bees from hives in the apiary. The results showed that the consumption preferences of young bees, both in cages and in colonies, were reduced for pollen adulterated with noxious substances and increased for pollen supplemented with linoleic acid. This suggests that young bees associate species-specific pollen cues with negative or positive experiences forming memories that biased their choices. In chapter 4, we studied whether mature (foraging) bees learn pollen cues according to their quality and whether they modify their foraging decisions according to these experiences. In this case, it was expected that those pollen constituents that can only be assessed after ingestion do not modify foragers'

preferences during the first visits to the sources but in a delayed manner after experiencing the pollen inside the nest. On the one hand, double-choice experiments were conducted at a foraging station to test whether foragers avoided amygdalin-adulterated pollen after it had been offered at the sources or inside the nest. On the other hand, field experiments were conducted to record pollen selection of colonies after the pollen of one of the dominant species (*Diplotaxis tenuifolia*) was adulterated with amygdalin and fed to the colonies. From the double-choice experiments, it was evidenced that the foragers could not avoid the adulterated pollen at the foraging site but avoided it later after the adulterated pollen was incorporated into the nest. Regarding the effect observed in the field, pollen samples from treated colonies were more diverse than those from controls suggesting that bees were more likely to collect from novel sources. Finally, the mechanisms of information transfer about pollen quality information within the hive between young bees and foragers were studied (chapter 5). It was shown that foragers' preferences changed only when they interacted with experienced young bees while pollen was available to both groups. In conclusion, the results obtained from this thesis support the hypothesis that pollen selection during foraging depends, at least in part, on the experiences of the young bees, which can transfer information about the quality of the resource to foragers through pollen species-specific cues available in the nest reserves.

Keywords: *Apis mellifera*, young bees, foraging bees, post-ingestion learning, pollen assessment, in-hive experiences, adulterated pollen.

A Bizcocho, mi compañero en el camino

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	12
1.1. La abeja <i>Apis mellifera</i> como insecto social	12
1.1.1. <i>Los insectos sociales y sus características</i>	12
1.1.2. <i>Estructura y organización de una colonia de A. mellifera</i>	13
1.2. Recursos alimenticios de la abeja	14
1.2.1. <i>Explotación de los recursos</i>	14
1.2.2. <i>Procesamiento de los recursos en el nido</i>	17
1.2.3. <i>Digestión del polen y cambios fisiológicos en las abejas</i>	19
1.2.4. <i>Evaluación de los recursos en las fuentes</i>	20
1.2.4.1. <i>Compuestos secundarios en el polen y su efecto en las abejas</i>	22
1.2.5. <i>Regulación de la recolección de polen</i>	23
1.3 Aprendizaje y Memoria en la abeja: importancia en el comportamiento	25
1.3.1. <i>Aprendizaje de Recursos</i>	25
1.3.2. <i>Aprendizaje de las claves del polen</i>	26
1.3.3. <i>Aprendizaje social</i>	27
1.4. Objetivos	28
1.4.1. <i>Objetivos específicos e hipótesis</i>	28

2. ELECCIÓN DE PÓLENES EN ABEJAS JÓVENES VERSUS RECOLECTORAS	30
2.1. Introducción	30
2.2. Materiales y Métodos	32
2.2.1. <i>Sitio de estudio y abejas</i>	32
2.2.2. <i>Pólenes monoflorales</i>	33
2.2.3. <i>Procedimiento experimental</i>	33
2.2.3.1. <i>Serie 1: Elección de pólenes en abejas jóvenes</i>	34
2.2.3.2. <i>Serie 2: Elección de pólenes en abejas recolectoras</i>	34
2.2.4. <i>Análisis estadístico</i>	35
2.3. Resultados	37
2.4. Discusión	40
3. PREFERENCIAS APRENDIDAS EN ABEJAS JÓVENES TRAS EXPERIMENTAR POLEN ADULTERADO	45
3.1. Introducción	45
3.2. Materiales y Métodos	47
3.2.1. <i>Sitio de estudio y abejas</i>	47
3.2.2. <i>Modificación de la calidad del polen</i>	47
3.2.3. <i>Experimento I: Evaluación de las preferencias aprendidas de abejas jóvenes confinadas que experimentaron cambios en la calidad del polen</i>	48
3.2.4. <i>Experimento II: Evaluación de las preferencias aprendidas en colonias que experimentaron cambios en la calidad del polen</i>	49
3.2.5. <i>Análisis estadístico</i>	51

3.3. Resultados	51
3.3.1. <i>Experimento I: Efectos del polen adulterado sobre las preferencias de consumo aprendidas de las abejas jóvenes confinadas en cajas</i>	51
3.3.2. <i>Experimento III: Efectos del polen adulterado sobre las preferencias de consumo aprendidas de las abejas jóvenes dentro de la colmena</i>	53
3.4. Discusión	54
3.4.1. <i>Generalización y discriminación de estímulos basados en el polen</i>	55
3.4.2. <i>Evaluación pre-ingestiva o estado post-ingestión inducido por compuestos aversivos y fagoestimulantes</i>	56
3.4.3. <i>Respuestas comportamentales de las abejas jóvenes frente a los compuestos naturales y los agroquímicos en el polen</i>	56
3.4.4. <i>¿Pueden las abejas jóvenes influir en las decisiones de búsqueda de las recolectoras?</i>	57
4. DECISIONES DE FORRAJEО DE LAS COLONIAS DE <i>A. mellifera</i> TRAS EXPERIMENTAR PÓLENES ADULTERADOS	58
4.1. Introducción	58
4.2. Materiales y Métodos	60
4.2.1. <i>Sitio de estudio y abejas</i>	60
4.2.2. <i>Polen monofloral y modificación de la calidad</i>	61
4.2.3. <i>Experimento I: Evaluación de las preferencias de las recolectoras por el polen no adulterado frente al adulterado con amigdalina en la fuente de alimento</i>	61
4.2.4. <i>Experimento II: Evaluación de las preferencias de las recolectoras tras la incorporación de polen adulterado con amigdalina dentro de la colmena</i>	62
4.2.5. <i>Experimento III: Evaluación de la selección de polen tras la oferta de polen adulterado con amigdalina dentro de la colmena</i>	64

4.2.6. Análisis estadístico	66
4.3. Resultados	67
4.3.1. <i>Experimento I: Evaluación de las preferencias de las recolectoras por el polen no adulterado frente al adulterado con amigdalina en la fuente de alimento</i>	67
4.3.2. <i>Experimento II: Evaluación de las preferencias de las recolectoras tras la incorporación de polen adulterado con amigdalina dentro de la colmena</i>	67
4.3.3. <i>Experimento III: Evaluación de la selección del polen tras la oferta de polen adulterado con amigdalina en el interior de la colmena</i>	70
4.4. Discusión	72
4.4.1. <i>Efecto de la amigdalina: ¿Rechazo espontáneo o rechazo retardado?</i>	73
4.4.2. <i>Diversificación de los pólenes recolectados como respuesta de la colonia frente a recursos inadecuados</i>	74
4.4.3. <i>¿Cómo aprenden las recolectoras la calidad del polen dentro del nido?</i>	76
5. MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE INFORMACIÓN RELATIVA A LA CALIDAD DEL POLEN EN LAS COLMENAS	77
5.1. Introducción	77
5.2. Materiales y Métodos	80
5.2.1. <i>Experimento I: Adquisición de información del polen en recolectoras aisladas a través del recurso “procesado”</i>	80
5.2.2. <i>Experimento II: Adquisición de información del polen en recolectoras a través de abejas jóvenes con acceso al recurso</i>	82
5.2.3. <i>Experimento III: Adquisición de información relativa al polen a través de nodrizas con experiencia</i>	83
5.2.4. <i>Experimento IV: Rol de los volátiles del polen en el nido sobre las preferencias de las recolectoras</i>	85
5.2.5. <i>Análisis estadístico</i>	86

5.3. Resultados	87
5.3.1. <i>Experimento I: Adquisición de información del polen en recolectoras aisladas a través del recurso “procesado”</i>	87
5.3.2. <i>Experimento II: Adquisición de información del polen en recolectoras a través de abejas jóvenes con acceso al recurso</i>	88
5.3.3. <i>Experimento III: Adquisición de información relativa al polen a través de nodrizas con experiencia</i>	89
5.3.4. <i>Experimento IV: Rol de los volátiles del polen en el nido sobre las preferencias de las recolectoras</i>	90
5.4. Discusión	92
 6. DISCUSIÓN GENERAL	95
6.1. Conclusiones generales	95
6.2. Limitaciones en el desarrollo de la tesis	98
6.3. Perspectivas	99
6.4. Implicancias	101
7. REFERENCIAS	104
8. ANEXO	127
8.1. Capítulo 2	127
8.2. Capítulo 3	131
8.3. Capítulo 4	134
8.4. Capítulo 5	139

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. La abeja *Apis mellifera* como insecto social

1.1.1. *Los insectos sociales y sus características*

El comportamiento social está determinado por las interacciones que ocurren entre los individuos de la misma especie. En algunas especies, las interacciones intraespecíficas se limitan a instancias de lucha o apareamiento mientras que, en otras, son numerosas y muy frecuentes. En los insectos sociales, tales como las termitas, las hormigas, varias especies de abejas y algunas de avispas, que viven en sociedades cooperativas muy bien integradas, las interacciones son fundamentales para el desarrollo de las colonias. Los insectos eusociales se caracterizan por presentar división reproductiva del trabajo, solapamiento de generaciones en el nido y cuidado colectivo de la cría (Wilson 1971). Además, los individuos de la casta obrera presentan división del trabajo, que permite que grupos de individuos especializados realicen diferentes actividades en simultáneo.

Las colonias de insectos sociales son descentralizadas (no hay jerarquías entre los miembros del grupo) y se organizan de forma autónoma. Esta organización autónoma produce atributos emergentes a nivel de grupo (fenotipos sociales) que son más que la mera suma de comportamientos individuales (Camazine et al. 2001, Fewell 2003). Los miembros de estas colonias están estrechamente emparentados y forman redes densamente conectadas (Fewell 2003) en donde las respuestas de unos actúan como estímulos para otros, dando lugar a comportamientos colectivos complejos. Es así que los cambios locales que resultan de las decisiones individuales generan un patrón colectivo que impulsa el comportamiento coordinado del grupo (Bonabeau et al. 1997, Gordon 1999). De esta manera, las colonias funcionan como unidades adaptativas, cuyos miembros poseen especializaciones morfológicas, fisiológicas y/o comportamentales que contribuyen al funcionamiento

eficiente del grupo (Seeley 1997). Una cuestión central entre los insectos sociales es entender cómo los individuos manejan la información sobre las necesidades de la colonia y los recursos del ambiente, y la integran según sus propias experiencias para generar una respuesta adaptativa.

1.1.2. Estructura y organización de una colonia de *A. mellifera*

Entre los insectos sociales, la abeja *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) ocupa un lugar central por tratarse del polinizador comercial más utilizado en entornos agrícolas (Delaplane y Mayer 2000, Klein et al. 2007, vanEngelsdorp y Meixner 2010), pero también por ser un modelo de estudio para la fisiología y el comportamiento animal. En las colonias de *A. mellifera* se distinguen tres castas: la reina, los zánganos y las obreras. La reina y los zánganos conforman las castas reproductivas, mientras que las obreras conforman la casta no reproductiva (Wilson 1971, Johnson 2023). Una colonia típica está constituida por una única reina (hembra fértil), desde ningún a cientos de zánganos (machos) dependiendo de la época del año, y entre 10 y 40 mil obreras (todas hembras). La reina, a través de sus feromonas, es la principal responsable de mantener la cohesión de la colonia, necesaria para la coordinación de la labor social (Seeley 2009, Johnson 2023).

Las obreras son hembras estériles que desempeñan distintas tareas a medida que avanzan en edad, a través de un fenómeno denominado polietismo etario (Lindauer 1952, Seeley 1982, Winston 1987; Fig. 1.1). Cuando las abejas son jóvenes realizan tareas en el interior de la colmena, encargándose primero de limpiar los panales y luego de cuidar las larvas. A los diez días de edad aproximadamente, las obreras se alejan del área de cría, y comienzan a trabajar en la periferia del nido procesando el alimento, recibiendo néctar y depositándolo en las celdas de reserva. Más tarde, algunas se desempeñan en la entrada del nido como guardianas. Llegando a las tres semanas de vida adulta, las obreras ya maduras inician sus viajes de búsqueda de recursos saliendo del nido para recolectar (Rösch 1925, Lindauer 1952, Seeley 1985, Winston 1987; Fig. 1.1). La edad con la que las obreras realizan una tarea puede ser ajustada en función de las necesidades de la colonia, las que varían mucho según la época del año (Robinson et al. 1992, Münch y Amdam 2010).

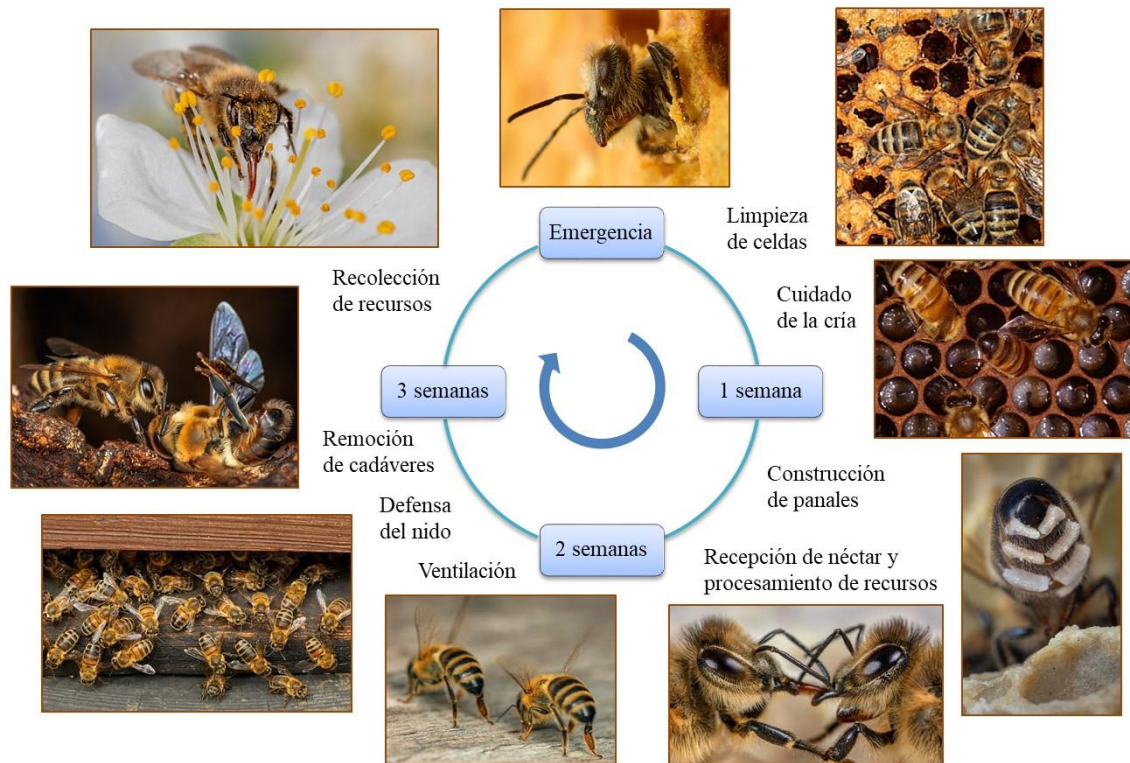


Figura 1.1. Polietismo etario en las obreras de *A. mellifera*. Créditos fotográficos: Solvin Sankl, Ingo Arndt, John B Free y Chris Gomersall en Nature Picture Library (sitio web: naturepl.com).

1.2. Recursos alimenticios de la abeja

1.2.1. Explotación de los recursos

La abeja *Apis mellifera* es un recolector de lugar central (Orians y Pearson 1979, Bell 2012), lo que implica que cada individuo recolector regresa al nido a descargar los recursos forrajeados. Las abejas se especializan en la recolección de néctar como principal fuente de energía, y de polen como fuente de proteínas y lípidos (Johnson 2023). Ambos recursos alimenticios son complementarios y permiten la supervivencia y el desarrollo de las colonias. El néctar presenta principalmente tres azúcares simples: el disacárido sacarosa y los monosacáridos fructosa y glucosa. Otros azúcares pueden estar presentes en cantidades mínimas, como la maltosa, melibiosa, manosa, arabinosa y xilosa (Baker y Baker 1982a, 1983, Nicolson y Thornburg 2007). Además, en el néctar pueden encontrarse enzimas y aminoácidos (Baker 1978, Gardener y Gillman 2001, Nicolson 2007), minerales, vitaminas,

metabolitos secundarios como fenoles y alcaloides (Stevenson et al. 2017), e incluso ácidos grasos (Baker y Baker 1975, Nicolson y Thornburg 2007).

El polen tiene una composición química mucho más compleja que el néctar. Las proteínas y los lípidos suelen ser los componentes mayoritarios (Buchmann 1986, Evans et al. 1987, Dobson 1988, Roulston et al. 2000, Roulston y Cane 2000, Somervielle 2005, Somerville y Nicol 2006). Dentro de los lípidos se encuentran los ácidos grasos tales como el palmítico, el linoleico (omega-6) y el alfa-linolénico (omega-3) (Manning 2001, Avni et al. 2014, Arien et al. 2015). Los hidratos de carbono presentes en el grano están representados por el almidón, polisacáridos solubles o insolubles y azúcares simples (Franchi et al. 1996, Pacini 1996). El polen presenta aminoácidos libres (de Groot 1952, Standifer 1967) y es la principal fuente de micronutrientes de las abejas, aportando minerales (Stanciu et al. 2011, Filipiak et al. 2017) y vitaminas esenciales (Haydak y Dietz 1965, Nation y Robinson 1968, Anderson y Dietz 1976, Herbert y Shimanuki 1978c).

Dada la naturaleza de ambos recursos, existen diferencias fundamentales en la forma en que las abejas los recolectan y transportan al nido. De hecho, y a pesar de que en muchos casos el néctar y el polen pueden obtenerse de las mismas flores, existe una división en la recolección en la que podemos diferenciar recolectoras especializadas en buscar un recurso u otro (Winston 1987, Johnson 2023). Por un lado, las recolectoras succionan el néctar (también agua) con la probóscide, estructura formada por varias piezas bucales que crean un tubo alrededor de la glosa. El néctar se almacena transitoriamente en el buche de la abeja, porción anterior del tubo digestivo modificada para el transporte de líquido, en donde se transporta a la colmena. Por otro lado, las recolectoras usan sus mandíbulas para extraer el polen de las flores y masticarlo (Fig. 1.2A). Además, usan el primer y segundo par de patas para reunir el polen desde las mandíbulas y la parte anterior del cuerpo, donde suele quedar adherido incidentalmente tras entrar en contacto con las anteras de las flores. Luego, el polen se transfiere a las patas traseras (con las que también juntan granos adheridos al abdomen) y específicamente a las canastas o corbículas, que son las estructuras especializadas para contener y transportar el recurso. El proceso de empaquetar el polen en las corbículas es favorecido por el agregado de néctar y secreciones (Casteel 2022; Fig. 1.2B y C).

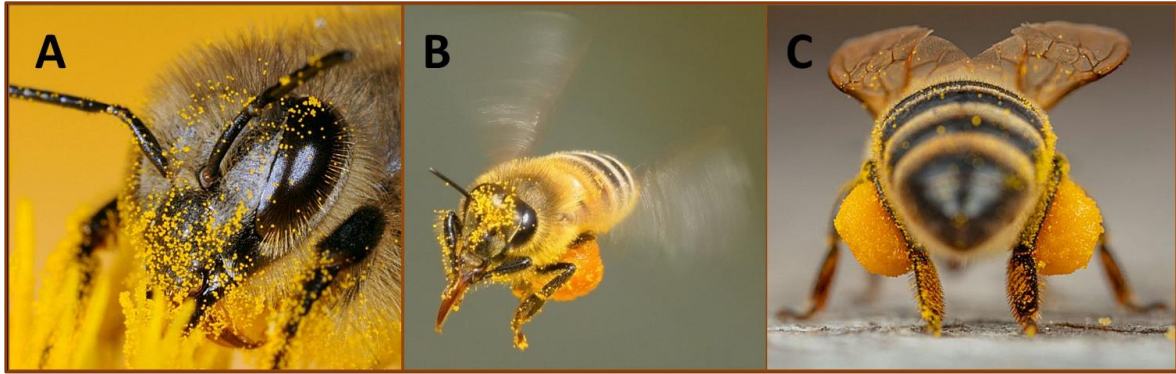


Figura 1.2. Comportamiento recolector de polen de *A. mellifera*. **A)** Abeja recolectora extrayendo el polen de las flores usando las mandíbulas y patas. **B)** Agregado de néctar y secreciones a través de la probóscide para facilitar la aglutinación de los granos de polen en las corbículas durante el vuelo. **C)** Recolectora ingresando a la colmena con sus cargas de polen en el tercer par de patas. Créditos fotográficos: A) Heidi y Hans-Juergen Koch en Nature Picture Library (link: [https://www.naturepl.com/stock-photo/honey-bee-\(apis-mellifera\)-covered-with-pollen-while-feeding-on-dandelion/search/detail_0_00241052.html](https://www.naturepl.com/stock-photo/honey-bee-(apis-mellifera)-covered-with-pollen-while-feeding-on-dandelion/search/detail_0_00241052.html)); B) Peng Yuan Qi en iNaturalistCL (link: <https://inaturalist.mma.gob.cl/photos/70685217>); C) Ingo Arndt en Nature Picture Library (link: <https://www.naturepl.com/books/photographers-books/honey-bees-by-ingo-arndt.html>).

Las diferencias en la manipulación del polen y el néctar se extienden más allá de la recolección en el campo. Una vez que regresan al nido, las recolectoras transfieren el néctar recolectado a un grupo de abejas receptoras quienes reciben el alimento por trofalaxia (interacciones boca a boca) y lo acumulan en los panales donde será transformado en miel (Seeley 1989; Fig. 1.3A). Las recolectoras de polen que regresan al nido, por el contrario, no son asistidas en la descarga, sino que son ellas mismas las que incorporan el recurso directamente en las celdas, generalmente cerca del área de cría. De esta manera, no hay una separación espacial ni de tareas entre la fase de recolección y la de descarga del polen (Fig. 1.3B). Luego de ser incorporado en las celdas, las obreras jóvenes intervienen en el procesamiento del polen formándose finalmente el “pan de abeja”, un alimento que se conserva en las reservas de la colmena por varios meses (sección 1.2.2).

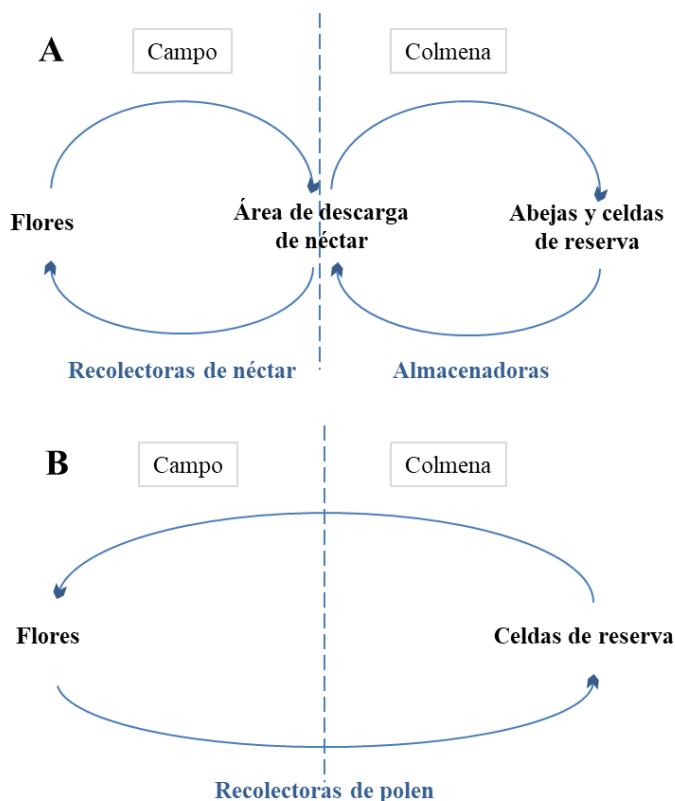


Figura 1.3. Ciclo recolector y de almacenamiento de néctar (A) y de polen (B). Adaptado de Seeley (2009).

1.2.2. Procesamiento de los recursos en el nido

Las abejas melíferas procesan los alimentos que recogen alterando su estado original (Wright et al. 2018). El néctar que ingresa suele tener una concentración mucho menor a la que alcanza cuando se convierte en miel (>80%), lo que se logra por la evaporación de agua (Lindauer 1955, Nicolson 2009, Wright et al. 2018). Por otra parte, el procesamiento del polen incluye la compactación de las cargas y el agregado de néctar, miel y secreciones glandulares por parte de las obreras jóvenes. El alimento derivado del procesamiento del polen acopiado se denomina “pan de abeja”, y es el resultado de una transformación química (Gilliam 1997) que convierte al polen en un nuevo alimento. La composición del “pan de abeja” presenta una mayor proporción de hidratos de carbono, valores más bajos de pH y humedad, ausencia de almidón, menor contenido fenólico, y el contenido proteico y lipídico tiende a ser más bajo que en el polen fresco (Herbert y Shimanuki 1978a, Human y Nicolson 2006, Nicolson 2011, Anderson et al. 2014, Mayda et al. 2020). Además, dado que en una misma celda se colocan cargas de polen de distintas plantas (Fig. 1.4A), las claves específicas de cada polen, como los compuestos volátiles o fagoestimulantes, se mezclan.

Algunos autores sostienen que la transformación del polen requiere de la acción de microorganismos (bacterias y levaduras) que contribuyen a la fermentación de este, lo que favorecería su preservación y la digestibilidad para las abejas (Gilliam 1997, Human y Nicolson 2006, Vásquez y Olofsson 2009, Ellis y Hayes 2009, pero ver también: Corby-Harris et al. 2014a, Anderson et al. 2014).

La evidencia sugiere que las abejas prefieren consumir el polen recientemente almacenado (menos de tres días en las reservas; Fig. 1.4B) ante el polen almacenado por más tiempo (Anderson et al. 2014, Carroll et al. 2017). Esto podría deberse a la presencia de sustancias atrayentes como olores y fagoestimulantes que suelen estar presentes en el polen fresco y que disminuyen con el tiempo de almacenado (Robinson y Nation 1968, Schmidt 1985, Dobson 1988, Schmidt y Hanna 2006, Anderson et al. 2014). Más allá de estos cambios, el polen almacenado (al menos a un mediano plazo de hasta 10 días) resultó ser igualmente nutritivo que el polen fresco (Carroll et al. 2017) (ver Maes et al. 2016 para consecuencias negativas del polen almacenado a largo plazo). En este escenario, los pólenes que son menos preferidos por las abejas jóvenes se podrían acumular en las reservas del nido, volviéndose una opción para el consumo solo cuando el polen fresco escasea (Carroll et al. 2017).



Figura 1.4. Reservas de polen. **A)** Pan de abeja formado por cargas de polen de distintas especies de plantas en una misma celda (corte transversal). **B)** Celdas con cargas de polen recientemente almacenadas (remarcado en rojo). Créditos fotográficos: A) EyesOnHives (link: <https://www.keltronixinc.com/fermentation-bee-pollen-bee-bread/>); B) Hanna's bees (link: <https://hannasbees.ie/what-is-bee-bread-health-benefits-and-how-to-harvest/>).

1.2.3. Digestión del polen y cambios fisiológicos en las abejas

Las abejas jóvenes comienzan a consumir polen y/o “pan de abeja” transcurridas dos horas desde su emergencia como adulto (Dietz 1969). Este consumo temprano, sumado a la jalea que proveen las abejas nodrizas de mayor edad (Free 1957, Johnson 2023), estimula la activación y el rápido desarrollo de la glándula hipofaríngea. Esta glándula absorbe nutrientes producidos por los cuerpos grasos de las obreras y los utiliza para producir secreciones proteínicas con las que alimentan a la cría y al resto de las compañeras de la colonia (Crailsheim 1991, Crailsheim 1992, 1998, Johnson 2023). El consumo de polen es máximo cuando la abeja alcanza la edad de nodrizas, entre los 2-3 y los 10 días, para luego decrecer drásticamente al convertirse en recolectora, alrededor de los 20 días de edad (Crailsheim et al. 1992).

Las enzimas digestivas son claves para entender la diferencia en la capacidad digestiva del polen entre las abejas jóvenes y las recolectoras. Moritz y Crailsheim (1987) mostraron que la actividad proteolítica y el contenido de proteína en el intestino medio eran dependientes de la edad de la obrera. Además, la cantidad de polen presente en el intestino de las recolectoras es insignificante en comparación con el de las abejas jóvenes (Crailsheim 1986, 1990, Moritz y Crailsheim 1987, Crailsheim et al. 1992, Szolderits y Crailsheim 1993, Lass y Crailsheim 1996, Camazine et al. 1998). Estudios histoquímicos del tracto digestivo mostraron que, dependiendo del origen botánico, los granos de polen pueden digerirse con mayor o menor facilidad (por ejemplo, polen de *Medicago sativa* en Peng et al. 1986) o incluso no llegar a digerirse completamente (por ejemplo, polen de *Taraxacum officinale* en Peng et al. 1985) lo que puede determinar el valor nutricional del polen para la abeja (Peng et al. 1985). En abejas jóvenes, el proceso de digestión completo varía desde unas pocas horas hasta más de un día (Crailsheim 1990, Peng et al. 1986).

Durante la transición a la recolección, las glándulas hipofaríngeas y cuerpos grasos se atrofian, las reservas corporales de proteínas y lípidos se reducen drásticamente y las obreras maduras pasan a recibir proteínas a través de la jalea que les comparten las más jóvenes (Crailsheim 1990, 1998). A pesar de que a edades recolectoras el desarrollo de la obrera está terminado, el consumo de esta jalea proteica es importante para sostener, por ejemplo, la tasa de recambio de proteínas alta en los músculos del vuelo (Crailsheim 1986).

1.2.4. Evaluación de los recursos en las fuentes

Teniendo en cuenta las diferencias en la manipulación, procesamiento y utilización del néctar y del polen, tanto fuera como dentro del nido, es factible que existan diferencias sustanciales en la manera y/o capacidad que tiene las abejas de evaluar cada recurso. Los procesos que le permiten a la abeja evaluar una fuente de néctar encajan bien con los modelos basados en la calidad energética (Schmid-Hempel et al. 1985, Schmid-Hempel 1987), ya que las abejas que contactan el alimento tienen la posibilidad concreta de detectar la presencia de los azúcares a través de los receptores gustativos en tarsos y antenas. También existen receptores gustativos distribuidos en las distintas partes bucales (Robertson y Wanner 2006, de Brito Sánchez et al. 2014) e incluso, en el interior de la cavidad bucal (de Brito Sánchez 2011), lo que permite la evaluación del alimento durante la ingesta. Consistente con el criterio de evaluar la calidad energética del néctar, las abejas optimizan sus esfuerzos de recolección eligiendo las fuentes más productivas (Heinrich 1984). Además, las abejas pueden ajustar la probabilidad de realizar comportamientos que median la recolección conforme cambia la concentración de azúcares de una fuente. Por ejemplo, a mayor productividad de las fuentes de néctar se vio que aumenta la probabilidad de desplegar danzas de reclutamiento (von Frisch 1967), se incrementa la frecuencia de visitas y el volumen recolectado de la fuente (Seeley 1986, Seeley y Towne 1992, Seeley et al. 2000, Seeley 2009).

Por otro lado, los criterios de evaluación de las recolectoras de polen no están del todo claros. Debido a que las recolectoras no se alimentan de polen ni lo ingieren durante la recolección, la evaluación podría no depender de su valor energético o nutricional. Durante mucho tiempo se pensó que el contenido proteico era una variable que afectaba las decisiones de forrajeo (Schmidt 1982, Schmidt y Johnson 1984, Schmidt et al. 1987,

Brodschneider y Crailsheim 2010). Sin embargo, los experimentos en los que se les ofreció a las recolectoras una variedad controlada de especies de polen demostraron que las elecciones no siempre correlacionan con el contenido de proteínas de las opciones elegidas (Levin y Bohart 1955, Standifer 1967, Schmidt 1982, Roulston et al. 2000). Otros trabajos hicieron hincapié en que la composición de aminoácidos esenciales (de Groot 1952, Crailsheim 1990, Day et al. 1990, Cook et al. 2003) o el contenido de ácidos grasos (Manning 2001, Manning et al. 2007, Zarchin et al. 2017) e incluso de esteroides (Vanderplanck et al. 2020) sería relevante en las decisiones de las recolectoras.

Sin embargo, aun si se realiza un análisis nutricional más completo de distintas dietas de polen para las abejas (Day et al. 1990, Di Pasquale et al. 2013, Corby-Harris et al. 2018), en el contexto natural de las colonias el valor que tiene un polen frente a otro es relativo y no depende de su contenido intrínseco. Un polen rico en nutrientes puede no representar una opción de mayor calidad si, por ejemplo, un compuesto está presente en exceso (por ejemplo, ácido linoleico en Manning et al. 2007) o si posee compuestos secundarios que resulten nocivos para las abejas (ver sección 1.2.4.1) o constituyentes de difícil digestión (sección 1.2.3). Por otro lado, una opción de mayor calidad puede estar dada por la necesidad de compensar las deficiencias nutricionales de una dieta anterior (Hendriksma y Shafir 2016, Zarchin et al. 2017) o por sus propiedades antivirales o antiparasitarias (Palmer-Young et al. 2017).

Si bien hacen falta más estudios, 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 (sección 1.2.2 y 1.2.3). Entonces, mientras es factible que las abejas jóvenes puedan acceder y evaluar la composición del polen luego de la ingestión, la evaluación en las recolectoras podría ser diferente e independiente de la ingestión del recurso. En línea con esta hipótesis, la evidencia sugiere que la selección de polen durante el forrajeo está influenciada por las claves sensoriales (por ejemplo, claves olfativas en Pernal y Currie 2002) disponibles en el “pollenkitt” (Dobson 1988). El “pollenkitt” es la capa más externa del grano de polen y está compuesta principalmente por lípidos saturados e insaturados (Dobson 1988), carotenoides (Hesse 1993, Lunau 2000), flavonoides (Wiermann y Gubatz 1992), proteínas e hidratos de carbono (Parkinson y Pacini

1995, Weber 1996, Santos et al. 2003). Se cree que el “pollenkitt” podría proporcionar información sobre los constituyentes del polen ya que, en algunos casos, su composición es similar a la de la fracción interna del grano (Dobson 1988). Además, las claves del “pollenkitt” hacen que el polen resulte más atractivo para los polinizadores (Dobson y Bergstrom 2000), a la vez que facilitan la discriminación entre pólenes de distinto origen botánico (Dobson y Bergström 2000, Cook et al. 2005, Piskorski et al. 2011, Ruedenauer et al. 2018, Pietrantuono et al. 2019).

Posiblemente por la dificultad que conlleva trabajar con un estímulo complejo como el polen, hay pocos estudios sobre los criterios que usan las abejas para evaluar las fuentes de polen. Sin embargo, entender cómo las colonias responden ante pólenes de distinta calidad y cómo integran la información de las distintas opciones en función de sus experiencias y de las necesidades de las nodrizas y la cría, son factores fundamentales para explicar el éxito de las abejas.

1.2.4.1. *Compuestos secundarios en el polen y su efecto en las abejas*

El polen presenta compuestos secundarios que son cada vez más estudiados tanto en su composición (Palmer-Young et al. 2019a, b) como en su función (Rivest y Forrest 2020, Stevenson 2020). Es posible encontrar reportes de efectos beneficiosos en la defensa contra patógenos en las abejas (en el polen: Palmer-Young et al. 2017, Stevenson 2020, Tauber et al. 2020; en el néctar: Richardson et al. 2015, Palmer-Young et al. 2016, Bernklau et al. 2019) como de efectos negativos. En este último caso, metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, alcaloides, terpenoides y glucósidos presentes tanto en el néctar como en el polen, resultaron ser tóxicos o disuasorios para las abejas (Detzel y Wink 1993, London-Shafir et al. 2003, Kevan y Ebert 2005, Erbert et al. 2007, Ayestaran et al. 2010, Avarguès-Weber et al. 2010, de Mesquita et al. 2010, Hurst et al. 2014, Stevenson et al. 2017). Sin embargo, estos efectos suelen ser dosis dependientes (referencias en Palmer-Young et al. 2017), por lo que los observados a concentraciones altas, podrían no ser extrapolables a un contexto natural. De todas maneras, si tenemos en cuenta que las abejas melíferas almacenan los recursos en el nido, las concentraciones de los compuestos nocivos podrían aumentar en las reservas, sobre todo, si la disponibilidad y/o diversidad de fuentes de alimento es baja (Liu et al. 2006, Alaux et al. 2010, Di Pasquale et al. 2013, Palmer-

Young et al. 2017). En un contexto de monocultivo, por ejemplo, la posibilidad de que las colonias puedan detoxificar las reservas al “diluir” los pólenes tóxicos con otros de mejor calidad, es poco probable debido a la baja disponibilidad de pólenes alternativos que puedan ser incorporados y mezclados (Kevan y Ebert 2005).

Entre los metabolitos secundarios producidos en los tejidos vegetales se encuentran los glucósidos cianogénicos como la amigdalina en las Rosáceas. Luego de ser ingerida por las abejas, las enzimas del intestino logran la conversión de la amigdalina en cianuro de hidrógeno (Hurst et al. 2014), una molécula tóxica que provoca intoxicaciones agudas en animales (Khandekar y Edelman 1979; Carter et al. 1980; Newton et al. 1981; Kovacikova et al. 2019; Salama et al. 2019; Kolesarova et al. 2021). La exposición a dosis elevadas de amigdalina (10 mM) produce síntomas de malestar agudo post-ingestión en abejas recolectoras que afectan la locomoción, incluido un aumento del tiempo que pasan arrastrando el abdomen (Hurst et al. 2014). Además, dosis menores utilizadas en los ensayos de laboratorio para alimentar abejas maduras capturadas de colmenas y encepadas (Ayestaran et al. 2010) o enjauladas (Kevan y Ebert 2005), producen un aumento en la mortalidad. Hasta el momento no hay evidencia de que la amigdalina tenga un efecto disuasorio al momento de consumirla (Singaravelan et al. 2005, Ayestaran et al. 2010). Cabe mencionar que la aversión a compuestos secundarios puede verse enmascarada por la concentración de azúcar en el néctar (Ayestaran et al. 2010) y por el hecho de que, en el polen, suelen estar presentes en el interior del grano por lo que es esperable que no produzca rechazo durante la recolección.

1.2.5. Regulación de la recolección de polen

Las reservas de polen de una colmena de *A. mellifera* son pequeñas comparadas a las reservas de miel (Fewell y Winston 1992). La miel aporta la energía que se requiere para el funcionamiento de la colonia durante los meses de invierno, mientras que las proteínas y los nutrientes que aporta el polen son principalmente requeridos para el desarrollo de la cría en los meses de calor (Seeley 2009, Johnson 2023). La regulación a corto plazo de la recolección del polen podría implicar no solamente mecanismos para ajustar la relación entre la cantidad de polen necesaria en el nido y la cantidad que es incorporada desde el exterior, sino mecanismos para ajustar cuáles son los pólenes que ingresan y en qué

proporción. La mayor parte de los estudios sobre la regulación de la recolección de polen se centraron en la cantidad de polen que ingresa al nido y no en su calidad. Se vio que las colonias regulan la actividad recolectora de polen en función de la disponibilidad de reservas y la cantidad de cría que hay en el nido (Free 1967, Fewell y Winston 1992, Camazine 1993, Eckert et al. 1994, Dogterom y Winston 1999, Dreller et al. 1999, Fewell y Bertram 1999, Hendriksma et al. 2019). Esto permite mantener una reserva de polen suficiente, pero no excesiva (Seeley 2009). El aumento en la actividad de recolección se explica, por un lado, a través de un incremento de la proporción de recolectoras de polen, pero también por una modulación del esfuerzo individual, en el cual las recolectoras aumentan el número de viajes, la duración de la visita, y el tamaño de las cargas de polen (Fewell et al. 1991, Fewell y Winston 1992, Fewell y Page 1993, Díaz et al. 2013, Hendriksma et al. 2019).

Hasta la fecha, se realizaron unos pocos estudios acerca de la regulación de la recolección del polen según alguna medida de su calidad. Uno de ellos es el trabajo de Pernal y Currie (2001) donde vieron que, manipulando el contenido proteico de las reservas de polen, las colonias respondían aumentando la proporción de recolectoras de polen, la misma respuesta que se encontró en la regulación según la cantidad de polen. Sin embargo, a nivel individual, no se encontraron respuestas de las abejas en variables como la calidad del polen recolectado (% proteína) o la riqueza de las cargas, lo que podría explicarse por la incapacidad de las recolectoras de evaluar la calidad nutricional del polen *in situ* (Pernal y Currie 2001, 2002, Nicholls y Hempel de Ibarra 2017) y por lo tanto, requiriéndose que la regulación del ingreso de los distintos pólenes sea coordinada mediante una transferencia social de información (Fewell y Bertram 1999).

Liu et al. (2006) estudiaron la regulación de la recolección de polen en un contexto natural mediada por el contenido fenólico de los pólenes, como variable de su calidad. Como se mencionó en la sección anterior (1.2.4.1), los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que producen olores que pueden atraer a las abejas (Gronquist 2001, Liu et al. 2004) pero que también pueden producir una respuesta de evitación (Haglar y Buchman 1993) u otros efectos negativos si se acumulan en el interior del nido. Se vio que las colonias ajustaban su elección en el campo según la acumulación de fenoles en el nido (Liu et al. 2006), por lo que un aumento excesivo de estos compuestos induciría el rechazo de las

recolectoras en el campo. Manipulando las reservas de polen y ofreciendo dietas con distintos contenidos proteicos en una estación de forrajeo, Hendriksma et al. (2019) encontraron que las recolectoras modificaban su selección de tal manera de incorporar aquellos recursos que presentaban los nutrientes que eran deficitarios en las reservas del nido. Cuando las colonias fueron suplementadas con polen, las recolectoras perdieron esta selectividad, mostrando que las decisiones de las abejas estaban influenciadas por los nutrientes de las reservas. Con base en estos resultados, y teniendo en cuenta la disponibilidad fluctuante de fuentes florales a lo largo de la temporada, una respuesta adaptativa de las colonias incluiría la identificación de los pólenes que ingresan y el ajuste de su recolección de acuerdo con su calidad o aptitud para los requerimientos del momento.

El en contexto actual, atravesado por un fuerte cambio en el uso de la tierra, las prácticas de agricultura modernas, y la consecuente pérdida de diversidad floral que provoca una reducción en la disponibilidad de polen y néctar (Winfree 2009, vanEngelsdorp y Meixner 2010, Scofield y Mattila 2015, Maggi et al. 2016, de Groot et al. 2021), es prioritario ampliar el conocimiento sobre los mecanismos por los cuales las abejas seleccionan las fuentes de polen. La evaluación del polen podría ser un proceso complejo en el que el recurso es evaluado no solo en el campo sino también en el interior del nido, y en donde las respuestas de las nodrizas establecerían el vínculo entre la calidad del recurso y las elecciones de las recolectoras.

1.3. Aprendizaje y Memoria en la abeja: importancia en el comportamiento

1.3.1. *Aprendizaje de Recursos*

La abeja melífera es un insecto altamente generalista y por consiguiente, depende en gran medida de su capacidad de aprender estímulos para predecir los recursos del ambiente (Ribbands 1955, Koltermann 1969, Menzel 1999, Arenas y Farina 2012). Es así que el aprendizaje, proceso que modifica adaptativamente el comportamiento individual como consecuencia de la experiencia (Carew 2000), resulta fundamental para que las recolectoras puedan anticipar la presencia de recursos en un ambiente que cambia constantemente. Al encontrar una fuente de alimento suficientemente productiva, las abejas asocian las características de la fuente en función de la recompensa que ella ofrece (zu Oettingen-

Spielberg 1949, Butler 1951, von Frisch 1967, Backhaus 1993, Menzel 1990, Menzel et al. 1997). De esta manera, las abejas establecen un vínculo entre los estímulos contingentes: un estímulo *a priori* neutro, como el aroma, color o forma de la flor, y un estímulo biológicamente relevante o refuerzo, como los azúcares del néctar (Menzel y Erber 1978). Establecido el aprendizaje, el estímulo neutro adquiere carácter predictivo del refuerzo, lo cual les permite a los individuos anticipar su respuesta al refuerzo y reducir su nivel de incertidumbre (Giurfa 2007).

Las sucesivas visitas de la abeja a una cierta especie floral da lugar a la formación de memorias que afectan sus decisiones de forrajeo, por ejemplo, sesgando su orientación, la probabilidad de aterrizaje (Free 1969, Arenas et al. 2007, 2008), o incluso desencadenando respuestas estereotipadas y discretas como la extensión de la probóscide (Takeda 1961). De esta manera, las memorias le permiten a la abeja mejorar su eficiencia de recolección al facilitar la localización de las fuentes conocidas entre muchas otras desconocidas, o de menor productividad (Menzel y Müller 1996). Como consecuencia de estas memorias, las recolectoras exhiben una alta fidelidad por explotar el mismo tipo de fuente, un fenómeno que se denomina “constancia floral” (Free 1963, von Frisch 1967, Chittka et al. 1999). Sin embargo, las fuentes de alimento suelen ser estables sólo durante algunos días o unas pocas semanas (Vogel 1983, Sponsler et al. 2023), por lo que las memorias deben ser dinámicas de tal manera que el comportamiento sea lo suficientemente plástico para ajustar la búsqueda de alimento en un ambiente que cambia constantemente.

1.3.2. Aprendizaje de las claves del polen

A diferencia del azúcar, el rol del polen como recompensa en el aprendizaje y la memoria fue poco estudiada. Se llegó a especular que la elección de las fuentes estaba mediada por respuestas innatas frente a las claves intrínsecas del polen (como su olor, color o textura) que desencadenaban la recolección y a la vez proporcionaban información sobre la disponibilidad y abundancia del recurso a partir de su intensidad (Dobson et al. 1999). Sin embargo, más allá de un fuerte componente innato, se demostró que las preferencias por distintos pólenes pueden ser aprendidas (Cook et al. 2003, Arenas y Farina 2012). Al igual que ocurre para fuentes de azúcar, las abejas que recolectan polen también aprenden las claves olfativas de la fuente y establecen memorias que guían a las recolectoras hacia los

olores aprendidos (Arenas y Farina 2012). Se observó que, al cabo de unas pocas visitas, las abejas elegían los alimentadores aromatizados con las claves previamente aprendidas por sobre otro alimentador aromatizado con un olor novedoso (Arenas y Farina 2012). También se observó que recolectoras entrenadas a un alimentador con polen aromatizado, podían ser reactivadas a volver a la ubicación anterior del alimentador tras inyectar el olor aprendido dentro de la colmena (Arenas y Farina 2012), un fenómeno que ya se había evidenciado para fuentes de néctar (Ribbands 1954, Johnson y Wenner 1966, Reinhard et al. 2004). Consistentemente con el hecho de que las recolectoras no ingieren el polen que recolectan, estudios recientes sugieren que el polen refuerza el aprendizaje asociativo a través de vías gustativas pre-ingestivas (Nery et al. 2020, Moreno y Arenas 2023). Esto podría ocurrir cuando las antenas, las piezas bucales o los tarsos de las recolectoras entran en contacto con el “pollenkitt”, la capa externa del grano de polen que presenta los compuestos que excitan a las forrajeras durante la recolección (Pacini y Hesse 2005, sección 1.2.4).

1.3.3. *Aprendizaje social*

En los insectos sociales, el aprendizaje sobre las características de las fuentes no sólo ocurre en el campo, sino también dentro del nido. La información acerca de los recursos que están siendo explotados en el exterior, puede transferirse y propagarse al resto de los miembros de la colonia (Grüter et al. 2006, Farina et al. 2005, 2007, Gil y De Marco 2005), por ejemplo, cuando los néctares aromatizados son descargados y compartidos por las receptoras. El aprendizaje de los olores del néctar circulante conduce a memorias duraderas que afectan las preferencias recolectoras en el campo durante varios días (Farina et al. 2005, Balbuena et al 2012a).

Por otro lado, los olores y claves gustativas del alimento también proporcionan información a las abejas que no participan directamente de la recolección (Farina et al. 2005, 2007), pudiendo alcanzar incluso a abejas jóvenes (Grüter et al. 2006). En este sentido, se vio que las abejas jóvenes pueden aprender olores diluidos en solución azucarada y formar memorias a largo plazo que son evocadas a la edad de recolectoras (Arenas y Farina 2008, Arenas et al. 2009). Las experiencias con polen a edades tempranas también pueden modificar la respuesta de orientación muchos días después (Arenas y Farina 2014). En este sentido se vio que abejas maduras que habían sido alimentadas con pólenes monoflorales

durante la primera semana de vida eran atraídas hacia los mismos olores de los pólenes experimentados cuando eran evaluadas a edades de forrajeras (Arenas y Farina 2014).

Teniendo en cuenta que las abejas en edad de nodriza pueden establecer memorias de largo termino que modifican su comportamiento por varios días, queda preguntarse en qué medida, las abejas jóvenes son también capaces de aprender y retener información sobre la calidad del polen y, por tanto, cambiar adaptativamente sus preferencias de consumo. Teniendo en cuenta que el malestar post-ingesta provoca la evitación retardada del alimento (Papaj y Prokopy 1989), las experiencias mediadas por pólenes de baja calidad o nocivos podrían inducir su evitación generando modificaciones en el entorno del nido, brindando así información especie-especifica que desaliente la recolección de este recurso.

1.4. Objetivos

El objetivo general de la presente tesis es estudiar las respuestas comportamentales de abejas jóvenes y recolectoras (*A. mellifera*) frente a cambios en la calidad del polen. Para esto, se investiga la capacidad de evaluación del polen de ambos grupos de obreras, el rol que tienen las experiencias con pólenes de distinta calidad en las elecciones de las abejas y los mecanismos que permiten la transferencia de información relativa a la calidad del recurso.

1.4.1. Objetivos específicos e hipótesis

1. Dadas las diferencias en el uso, acceso y grado de manipulación del polen entre las abejas jóvenes y las recolectoras, se plantea estudiar las diferencias en la elección de pólenes en ambos grupos a través de las decisiones de consumo y las de forrajeo, respectivamente. También se investiga la importancia de las experiencias con los pólenes para reducir las presuntas diferencias en la elección que existiría entre las abejas jóvenes y las recolectoras. Se plantea como hipótesis que ambos tipos de abejas difieren en la elección de pólenes que realizan y que, tras sucesivas experiencias, estas elecciones cambian en el mismo sentido.

2. Dado que solo las abejas jóvenes tendrían acceso a evaluar la composición del polen, se investigó su capacidad para aprender y memorizar las claves especie-específicas del polen en función de su calidad. Se plantea como hipótesis que las abejas jóvenes asocian las claves especie-específicas del polen con compuestos nutritivos/fagoestimulantes o tóxicos/desagradables. De este modo, las experiencias positivas y negativas dan lugar a memorias que predicen la calidad del polen y afectan las preferencias de consumo.

3. Dado que las recolectoras no ingieren polen en las fuentes, se investiga la capacidad de las recolectoras de aprender y memorizar las claves del polen en función de la calidad de este y luego de experimentarlos en el nido. Se plantea como hipótesis que las recolectoras adquieren información relativa a la calidad del polen en el interior del nido mientras es procesado por las nodrizas.

4. Teniendo en cuenta que las abejas jóvenes serían fundamentales en la evaluación del polen y en sesgar la recolección hacia los recursos más adecuados, se investigan posibles mecanismos que permitan la transferencia de información relativa a la calidad del polen en el interior del nido entre abejas jóvenes y recolectoras. Se plantea como hipótesis que la selección de polen en el campo depende de que las recolectoras adquieran información relativa a la calidad del recurso en el interior del nido. Se plantea como hipótesis general que el mecanismo por el cual las recolectoras ajustan su elección de polen depende de la participación de las abejas jóvenes.

ELECCIÓN DE PÓLENES EN ABEJAS JÓVENES VERSUS RECOLECTORAS

2.1. Introducción

Los animales necesitan una variedad de nutrientes para llevar a cabo funciones vitales. Los carbohidratos proporcionan la energía esencial para realizar actividades y mantener funciones metabólicas y las proteínas y los lípidos son fundamentales para el crecimiento y reparación de tejidos. Por ser esenciales para el desarrollo, estos últimos son muy necesarios en las etapas tempranas del animal (Millward et al. 1997, Behmer 2009, Tigreros 2013, van de Rest et al. 2013). Dados los diferentes requerimientos de nutrientes que impone la ontogenia, los individuos pueden diferir en las fuentes de alimento que eligen a lo largo de su vida. Esta situación puede ser conflictiva en los animales que viven en grupos en donde los integrantes, generalmente maduros, se encargan de recolectar recursos para el resto del grupo, incluidos los jóvenes.

En el marco de la división del trabajo que coordina las actividades de las colonias de insectos sociales, algunos individuos salen a recolectar recursos mientras que otros se dedican al mantenimiento del nido (sección 1.1.2). En la abeja *Apis mellífera*, las recolectoras son obreras maduras que incorporan a la colonia recursos que se comparten entre sus miembros (Rösch, 1925, Lindauer 1952, Seeley 1985, Winston 1987). El néctar, como fuente de carbohidratos, es consumido por todas las obreras en estadio adulto mientras que el polen, principal fuente de proteínas y lípidos, es mayormente consumido por las abejas jóvenes encargadas del cuidado de la cría. A medida que las obreras jóvenes avanzan en edad y se desempeñan en otras tareas, dejan de consumir polen y pierden su capacidad de digerirlo (sección 1.2.3).

Según el origen botánico, los pólenes pueden diferir sustancialmente en la composición de macro y micronutrientes (sección 1.2.1), fagoestimulantes (Schmidt 1985, Singh et al. 1999, Schmidt y Hanna 2006), compuestos nocivos (sección 1.2.4.1) y/o compuestos que alteran la digestibilidad (Peng et al. 1985, Schmidt et al. 1989). De esta manera, los diferentes pólenes pueden afectar significativamente la longevidad de las abejas y el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas y los ovarios (Knox 1971, Lan et al. 2021). En experimentos pioneros, las abejas jóvenes mostraron preferencias entre dietas de pólenes monoflorales que se atribuyeron a diferencias nutricionales del alimento (Schmidt y Johnson 1984). Sin embargo, estas preferencias no siempre se correlacionaron con el consumo de los pólenes más nutritivos (Campana y Moeller 1977, Schmidt 1984, 1995, Corby-Harris et al. 2018). Los compuestos atrayentes y/o fagoestimulantes y los compuestos tóxicos y/o aversivos, parecen interactuar con el valor nutricional de la dieta para interferir en las elecciones de las abejas (Schmidt 1984, Schmidt et al. 1987).

En el caso de las abejas recolectoras, también se observaron preferencias en sus elecciones de pólenes monoflorales que no estarían asociadas a las características nutricionales del recurso sino a la presencia de claves que atraen, en mayor o menor medida, a las recolectoras (Levin y Bohart 1955, Doull 1966, Schmidt 1982). En un intento de comparar las elecciones de consumo de polen de las abejas jóvenes vs. las elecciones de forrajeo de las recolectoras, Boch (1982) mostró que las preferencias de ambos grupos eran distintas. Esta discrepancia podría explicarse por diferencias en el acceso y/o la capacidad de cada grupo de evaluar las características del polen dentro de su propio repertorio conductual. Además, los experimentos mencionados no permiten discriminar entre elecciones que se podrían considerar “innatas” frente a las “aprendidas”, un factor que es clave para entender cómo las colonias manejan la información sobre las diferentes opciones de forrajeo, y la integran según su propia experiencia.

En un escenario en donde las elecciones de las abejas jóvenes y las maduras son diferentes, es relevante plantear cómo las colonias podrían satisfacer plenamente las necesidades nutricionales de las nodrizas cuando la selección de polen realizada por las recolectoras podría proporcionar una dieta presumiblemente sub-óptima para ellas. Hasta ahora se desconoce si las experiencias con los diferentes pólenes permiten que la elección en el campo y dentro de la colmena sean más similares entre sí. En el caso de las

recolectoras, por ejemplo, se podrían esperar cambios en las elecciones tras sucesivas visitas a la fuente, o tras haber obtenido información en el interior del nido.

El objetivo de este capítulo fue comparar las elecciones de polen entre abejas obreras en edad de nodriza y las recolectoras dentro de sus repertorios comportamentales. Para el grupo de abejas en edad de nodriza, se cuantificó el consumo de cuatro pólenes monoflorales ofrecidos simultáneamente en el interior de jaulas que contenían obreras de 2-3 días de edad. Para las recolectoras, se registró la elección por los mismos cuatro pólenes cuando se les ofrecieron simultáneamente en una estación de recolección. Se predice que, frente a la misma oferta de pólenes, las abejas jóvenes y las recolectoras mostrarán perfiles de elección diferentes. Un segundo objetivo consistió en estudiar tanto las elecciones innatas como las aprendidas. Para esto, se midieron las respuestas de las abejas jóvenes y de las recolectoras inmediatamente después de haber ofrecido el polen y varias horas más tarde.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Sitio de estudio y abejas

Los experimentos se llevaron a cabo durante las temporadas de verano de 2018/2019 y 2019/2020 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34°32'S, 58°26'W). Para conocer las elecciones de polen entre las abejas jóvenes, se utilizaron abejas que emergieron de cuadros de cría extraídos de colmenas del apiario experimental (Fig. 2.1A). Los cuadros habían sido colocados dos días antes en una incubadora a 34°C, 55% de humedad relativa y oscuridad (Arenas y Farina 2008; Fig. 2.1B). Se recogieron manualmente obreras emergidas de un día de edad y se colocaron en jaulas de madera (10×10×10 cm) conformando grupos de 80 individuos (Fig. 2.1C). Los experimentos se iniciaron inmediatamente después del confinamiento. Las abejas fueron alimentadas con solución azucarada al 50% p/p *ad libitum* durante nueve días. Además, las jaulas recibieron 4 pólenes monoflorales en simultáneo (Fig. 2.1E). Se utilizó un total de 8 jaulas que procedían de 3 cuadros extraídos de colmenas diferentes.

Para establecer las elecciones de recolección de polen, se utilizaron grupos de recolectoras que habían sido entrenadas previamente a visitar una estación de recolección. Cada grupo de abejas entrenadas procedía de una colmena distinta del apiario. Las

elecciones se establecieron ofreciendo cuatro fuentes de polen diferentes a la fuente utilizada para el entrenamiento.

2.2.2. *Pólenes monoflorales*

Los pólenes que se utilizaron fueron recogidos de forma natural por las abejas. Los pólenes provenían de la planta de flor amarilla (*Diplotaxis tenuifolia*), de colza (*Brassica napus*), de sauce (*Salix* sp.) y de zarzamora (*Rubus* sp.), todos provistos y caracterizados por apicultores (Cooperativa Pampero, Amuyen y CoopSol). En el caso de las muestras multiflorales, de donde se obtuvieron los pólenes de sauce y zarzamora, se separaron las cargas de polen según su origen botánico basándonos en su color, brillo, textura y grado de aglutinación (Fig. A2.1 en anexo). La mayoría de las muestras de polen se obtuvieron durante la misma estación de la toma de datos. Para alimentar experimentalmente a las abejas jóvenes, se trituraron, pesaron e hidrataron los pólenes para conseguir una pasta parecida al pan de abeja que les ofrecimos *ad libitum* y simultáneamente. Cada polen se ofreció en una jeringa graduada de 5 ml con la punta cortada (Fig. 2.1D).

En el caso de las abejas recolectoras, los cuatro pólenes se ofrecieron en alimentadores separados, situados a 5 cm de distancia entre sí, en una plataforma de madera (30 x 30 cm). Los alimentadores de polen consistían en envases de plástico opaco de 360 ml con 8 orificios (7 mm $\varnothing$) en la parte superior (tapa) por los que las abejas podían entrar y salir cargadas de polen (Fig. 2.1F). En el interior de los envases había 2-3 g de polen de una sola especie finamente triturado y adherido a las cerdas de un limpiapipas (20 cm) enrollado en forma de espiral (Arenas et al. 2021; Fig. 2.1G). El diseño de estos alimentadores favorecería el uso de señales olfativas de polen, mientras que limitaría el alcance de las claves visuales debido a la presencia de la tapa y a la opacidad del envase.

2.2.3. *Procedimiento experimental*

Con el objetivo de comparar el perfil de elección de pólenes en abejas jóvenes y recolectoras, se llevaron a cabo dos series. En la *serie 1* se midió la elección de los pólenes a través del consumo, mientras que en la *serie 2* se midió a través del tiempo que dedicó un grupo de recolectoras a forrajear de cada fuente de polen.

2.2.3.1. Serie 1: Elección de pólenes en abejas jóvenes

Para conocer el perfil de elección de pólenes de abejas jóvenes, se midió el volumen consumido de cada uno de los 4 pólenes monoflorales ofrecidos. Dicha medición se realizó cada día durante los primeros 9 días de vida adulta de las abejas. A partir de estos valores se calculó la proporción relativa de consumo de cada polen (*mililitros del alimentador Xi/mililitros totales de la caja*) para cada día. En anexo puede verse el consumo total de las cajas por día (Fig. A2.2). Para investigar el efecto de las experiencias sobre la elección de polen, se compararon las respuestas observadas durante las primeras 24 horas (abejas naïve) con las respuestas medidas a las 48 horas (abejas experimentadas), asumiendo que, transcurrido este tiempo, las obreras fueron capaces de evaluar de manera post-ingestiva la calidad del polen (Peng et al. 1986, Crailsheim 1990). Se seleccionaron las respuestas a las 48 horas ya que fueron representativas de las respuestas obtenidas los días siguientes además de que el consumo total fue el máximo (ver Fig. A2.3 en anexo).

2.2.3.2. Serie 2: Elección de pólenes en abejas recolectoras

Para establecer las elecciones de recolección de las abejas en el campo, se entrenó a diferentes grupos (independientes) de recolectoras a visitar una estación de recolección que ofrecía polen multifloral. Los pólenes que conformaban la muestra multifloral eran diferentes a los cuatro pólenes utilizados posteriormente. Una vez establecido un grupo estable de aproximadamente 20 recolectoras, se procedió a marcarlas con diferentes colores para poder identificarlas y cuantificar sus elecciones durante la fase de evaluación. Durante la evaluación, el alimentador de entrenamiento fue reemplazado por los cuatro alimentadores que ofrecían cada uno de los cuatro pólenes monoflorales utilizados en la serie anterior. Los alimentadores se localizaron equidistantes sobre la plataforma de madera (Fig. 2.1H).

Las elecciones se establecieron a partir de la proporción de tiempo que las forrajeras del grupo estuvieron recolectando de cada alimentador. Para esto, primero se registró el tiempo que cada recolectora marcada pasaba en cada una de las fuentes. De este modo, se pudo obtener también el tiempo total que cada abeja transcurrió en la estación. A continuación, y con el fin de calcular la proporción relativa de tiempo que cada uno de los

grupos entrenados pasó recolectando en cada uno de los cuatro alimentadores, se sumó la duración de las visitas realizadas por todas las abejas del grupo a cada alimentador particular y se lo dividió por el tiempo total transcurrido por las abejas en la estación. Mientras que la caja de abejas jóvenes representaba la unidad experimental en la *serie 1*, cada grupo de recolectoras entrenado a una misma estación conformaba la unidad experimental en la *serie 2*.

Para estudiar si las experiencias adquiridas durante los sucesivos eventos de forrajeo modula las elecciones de las recolectoras, se compararon las respuestas de grupos de abejas que eran naïve para los pólenes ofrecidos (visitaban la estación por primera vez) frente a grupos de recolectoras experimentadas, es decir que fueron evaluadas no en su primera visita a la estación de recolección, sino tras haber estado visitando los alimentadores durante más de 4 horas. Cabe resaltar que, durante este periodo, las recolectoras pudieron incorporar los pólenes cosechados al nido e interactuar con las obreras en el interior.

2.2.4. Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron mediante un modelo lineal general mixto con distribución normal en R (<http://www.R-project.org/>). Para evaluar las diferencias en la proporción de pólenes seleccionada por ambos grupos de abejas, se exploró el impacto del tipo de abeja (Jóvenes y Recolectoras), la experiencia de las abejas (Naïve y Experimentadas), y de la identidad del polen (Colza, Flor amarilla, Sauce y Zarzamora) como efectos fijos, y su interacción. Se comprobaron los supuestos de homocedasticidad y normalidad (pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente). Para los contrastes se utilizaron las pruebas de Tukey mediante el paquete multcomp en R (Hothorn et al. 2008).

Además, se realizó estadística multivariada mediante un análisis de componentes principales (ACP) en R utilizando el paquete “vegan” (Oksanen et al. 2018). Se consideraron cuatro grupos: Jóvenes Naïve, Jóvenes Experimentadas, Recolectoras Naïve y Recolectoras Experimentadas. Las variables utilizadas fueron las proporciones seleccionadas de cada tipo de polen: Proporción de Flor amarilla, Proporción de Colza, Proporción de Sauce y Proporción de Zarzamora. Se seleccionaron los componentes que acumularon más del 70% de la variabilidad total (Jolliffe y Cadima 2016).

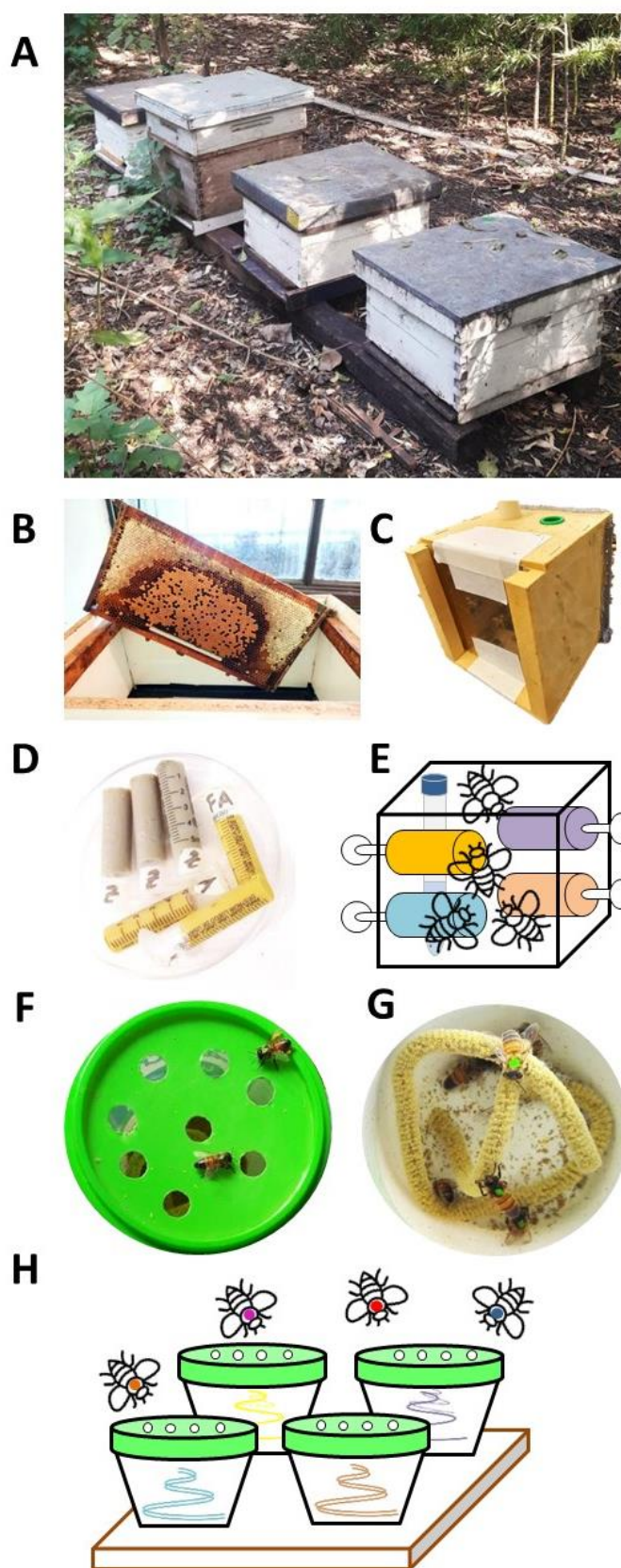


Figura 2.1. Materiales y métodos utilizados en el experimento. **A)** Fotografía de colmenas del apiario experimental de la FCEN, UBA. **B)** Cuadro de cría ubicado en la incubadora a 34°C, 55% de humedad relativa y oscuridad. **C)** Caja de madera de 10x10x10 cm con solución de azúcar al 50%. **D)** Alimentadores de polen (jeringas de 5 ml sin punta) ofrecidos en las cajas experimentales. **E)** Esquema del diseño experimental de las cajas con los alimentadores de polen. **F)** Parte superior (tapa) de los alimentadores con 8 orificios (7 mm $\varnothing$) por los que las abejas pueden entrar y salir cargadas de polen. **G)** Vista interior de los alimentadores con 2-3 g de polen triturado y adherido a las cerdas de un limpiapipas (20 cm) enrollado en forma de espiral. En F y G se ven las marcas de pintura en el tórax de las abejas recolectoras. **H)** Esquema de la estación de forrajeo con los alimentadores de polen (envases de plástico opaco de 360 ml). Se muestran las recolectoras marcadas con distintos colores que fueron adiestradas previamente a visitar la estación con polen multifloral.

2.3. Resultados

Las abejas jóvenes (*serie 1*) consumieron relativamente una mayor proporción de polen de zarzamora, elección que se mantuvo a lo largo de los nueve días (ver Fig. A2.3 en anexo). En segundo lugar y principalmente los primeros cuatro días, las abejas eligieron polen de sauce para su consumo, mientras que la flor amarilla fue, en general, el polen menos consumido. El polen de colza fue el que presentó más fluctuaciones en su consumo dependiendo del día, ubicándose en el segundo, tercer o último lugar (Fig. A2.3). Por su lado, las abejas recolectoras (*serie 2*) que visitaron la estación por primera vez, pasaron más tiempo recolectando principalmente polen de flor amarilla y, en segundo lugar, polen de colza (Fig. A2.4 en anexo). Dedicaron menos tiempo a recolectar polen de sauce y el de zarzamora. Sin embargo, cuatro horas después se vio un aumento importante en las proporciones de tiempo recolectando polen de zarzamora, alcanzando valores cercanos a los registrados para los pólenes de colza y flor amarilla (Fig. A2.4).

La elección de polen varió según el tipo de abeja ($\text{Chisq} = 127,9026$, $\text{Df} = 3$, $P < 2,2\text{e-}16$) y según la experiencia ($\text{Chisq} = 19,9143$, $\text{Df} = 3$, $P = 0,0002$). Para todos los pólenes la proporción seleccionada fue significativamente distinta entre las obreras jóvenes y las recolectoras (Colza: $t\text{-ratio} = -3,722$, $P = 0,0003$; Flor amarilla: $t\text{-ratio} = -6,885$, $P < 0,0001$; Sauce: $t\text{-ratio} = 6,012$, $P < 0,0001$; Zarzamora: $t\text{-ratio} = 5,625$, $P < 0,0001$; Fig. 2.2). Cuando las abejas pudieron experimentar los pólenes por más tiempo (48 horas en jóvenes y 4 horas en recolectoras), la proporción de polen de colza y zarzamora seleccionada fue significativamente diferente entre abejas naïve y experimentadas (Colza: $t\text{-ratio} = 3,035$, $P = 0,0031$; Flor amarilla: $t\text{-ratio} = 1,543$, $P = 0,1261$; Sauce: $t\text{-ratio} = -0,518$, $P = 0,6060$; Zarzamora: $t\text{-ratio} = -3,052$, $P = 0,0029$; Fig. 2.3). No se encontró una interacción significativa entre el tipo de abejas, la experiencia y la identidad del polen ($\text{Chisq} = 3,7220$, $\text{Df} = 3$, $P = 0,2931$), por lo que la proporción seleccionada de cada polen varió según la experiencia de las abejas independientemente de si eran jóvenes o recolectoras y varió según el tipo de abeja independientemente de si era naïve o experimentada.

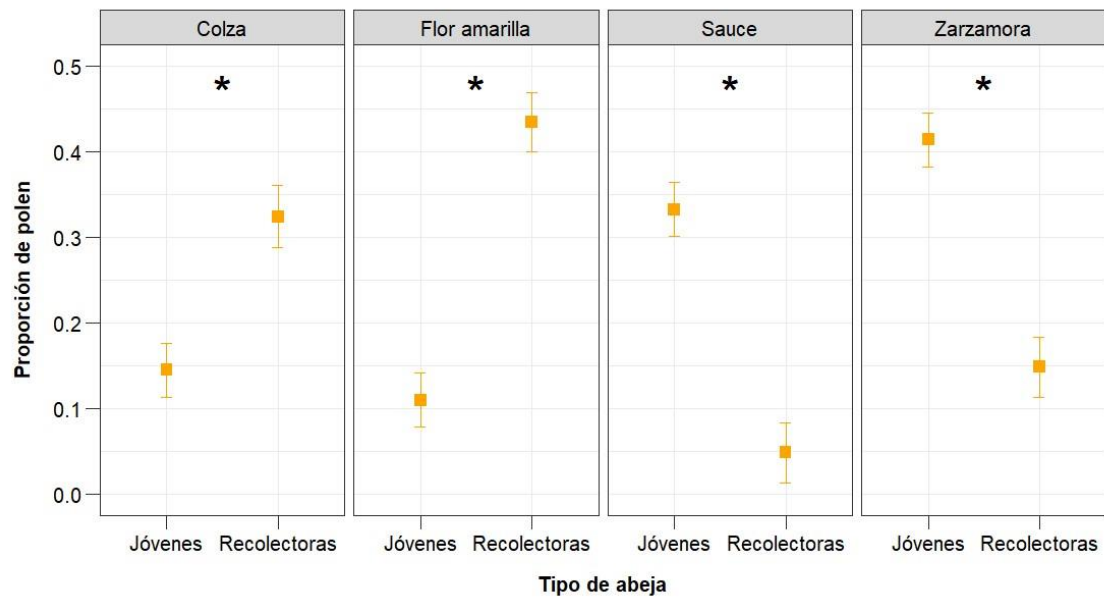


Figura 2.2. Proporción de cada polen seleccionado según el tipo de abeja (Jóvenes vs. Recolectoras). En el caso de las abejas jóvenes la proporción se calculó como el consumo relativo: *mililitros del alimentador Xi/mililitros totales de la jaula*, mientras que para las recolectoras se consideró la duración de visita: *segundos en el alimentador Xi/ segundos totales en la estación*. Los cuadrados indican los valores medios (predichos por el modelo) y las barras muestran los intervalos de confianza del 95%. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

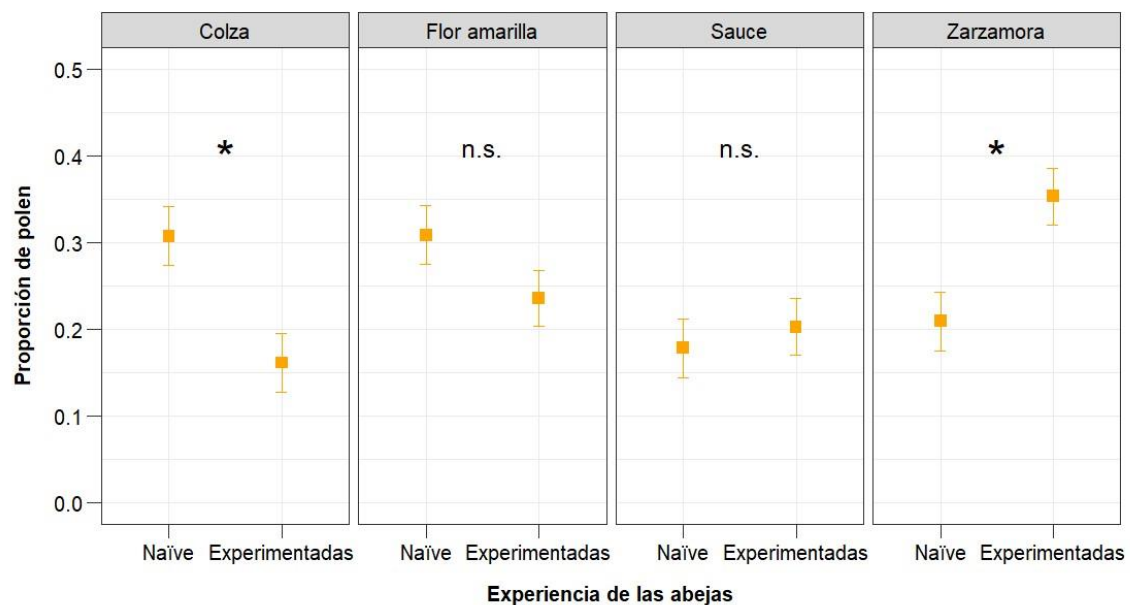


Figura 2.3. Proporción de cada polen seleccionado según la experiencia de las abejas (Naïve vs. Experimentadas). Naïve son abejas que experimentaron los pólenes por primera vez o en un lapso corto de tiempo, mientras que Experimentadas son abejas que tuvieron sucesivas experiencias con los pólenes por un período más largo de tiempo. Los cuadrados indican los valores medios (predichos por el modelo) y las barras muestran los intervalos de confianza del 95%. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

El análisis de componentes principales (ACP) permitió visualizar claramente la separación de los dos grupos de obreras según sus diferencias en el perfil de elección de polen y cómo la experiencia modificó ese perfil. Se seleccionaron los dos primeros componentes ya que juntos explicaban más del 80% de la variación (Tabla A2.1 en anexo). Las correlaciones entre las cuatro variables y los dos primeros componentes principales dados por los *loadings* se presentan en la Tabla A2.2 (en anexo). Se obtuvo una contribución similar de los cuatro pólenes con el componente 1 (Comp. 1), en una relación positiva en el caso de la flor amarilla y la colza, y negativa en el caso del sauce y la zarzamora. Por otro lado, la flor amarilla y la colza presentaron una mayor asociación con el componente 2 (Comp. 2) que el resto de las variables, positiva en el primer caso y negativa en el segundo (Tabla A2.2).

En el gráfico del ACP, donde podemos visualizar cada unidad experimental según al tipo de abeja al que pertenece, se observa que el Comp. 1 separa a las obreras jóvenes de las maduras. El Comp. 1 también evidencia una gran similitud en la elección de polen entre las abejas jóvenes naïve y experimentadas y también, aunque en menor medida, entre las abejas jóvenes y las recolectoras experimentadas. Se observa que el grupo conformado por recolectoras naïve se encuentra completamente separado de los grupos de abejas jóvenes. Esto es debido a la menor elección de polen de sauce y zarzamora y la mayor elección de flor amarilla y colza por parte de las recolectoras naïve, y un perfil de elección opuesto por parte de las abejas jóvenes, lo que es consistente con los resultados mostrados en la Fig. 2.2. Resulta interesante ver que la elección de polen de las recolectoras experimentadas se visualiza muy dispersa, desplazándose sobre el Comp. 1 hacia el cuadrante donde aumenta la zarzamora, solapándose en parte con las abejas jóvenes naïve. Además, las jóvenes naïve, si bien conforman un grupo con mucha cohesión, se desplazan levemente en el Comp. 2

hacia el cuadrante donde aumenta la elección de colza, a diferencia de las jóvenes experimentadas que se ordenan casi exclusivamente sobre el Comp. 1. Estos desplazamientos en el Comp. 2, donde las variables flor amarilla y colza son las más importantes, nos permite visualizar una tendencia opuesta del efecto de la experiencia según el grupo de abeja.

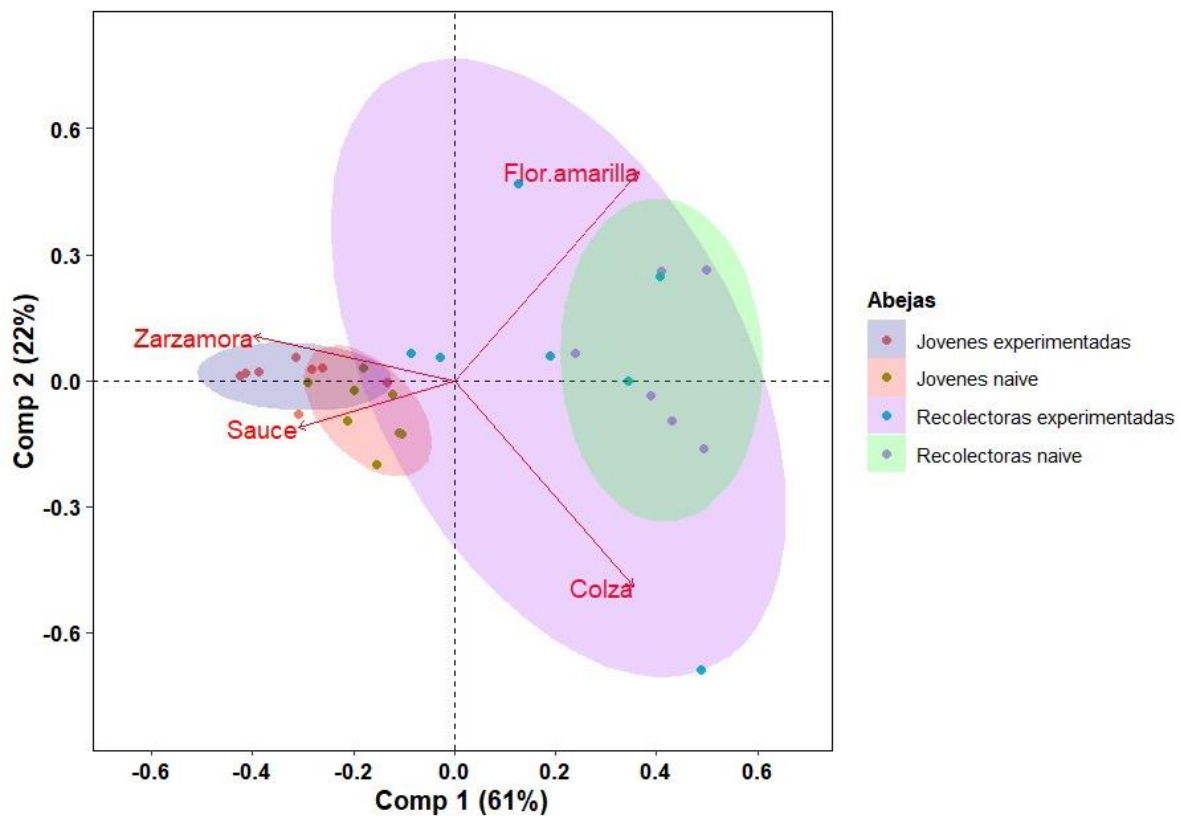


Figura 2.4. Análisis de Componentes Principales (ACP). Gráfico bidimensional mostrando el componente 1 vs. el componente 2 que expresan un 83% de la variación total.

2.4. Discusión

En el presente capítulo se obtuvo evidencia de que las abejas jóvenes y las recolectoras exhiben perfiles distintos de elección para una determinada combinación de pólenes. Además, los resultados sugieren que las respuestas de las recolectoras tienden a converger con las respuestas de las abejas en edad de nodriza tras las sucesivas experiencias con el polen.

Consistentemente con las diferencias en el uso del recurso que hacen las nodrizas y recolectoras dentro de sus repertorios conductuales, las distintas elecciones podrían explicarse a partir del acceso diferencial que tiene cada grupo a los compuestos del polen. Mientras que las recolectoras entrarían en contacto con el polen principalmente en las fuentes y serían excitadas por la estimulación quimiotáctil de sus antenas, piezas bucales y/o tarsos (Nery et al. 2020, Moreno y Arenas 2023), las abejas jóvenes podrían, además, evaluar la composición interna del polen durante y después de la ingestión (Moritz y Crailsheim 1987, Crailsheim et al. 1992). Además de los receptores gustativos de la cavidad bucal y/o el esófago, la detección de nutrientes liberados durante la digestión, permitiría a las abejas jóvenes hacer una mejor evaluación de la composición del polen y, a su vez, modificar las preferencias establecidas antes de la ingestión. Esta alternativa es menos probable que ocurra entre las abejas maduras ya que las recolectoras no consumen polen en la fuente y su capacidad para digerir los granos es muy baja (sección 1.2.3).

Por otro lado, asociado a los cambios en los requisitos nutricionales a lo largo de la vida de la obrera, se podría pensar que la sensibilidad a distintos compuestos del polen varía con la edad. En este sentido, se esperaría que las elecciones de las recolectoras estén fuertemente influenciadas por claves olfativas, mientras que las de las nodrizas recaigan principalmente en la evaluación de claves gustativas. Por ejemplo, los compuestos fagoestimulantes presentes en distintos pólenes, como lípidos y azúcares, actúan aumentando el consumo entre las abejas jóvenes (Robinson y Nation 1968, Schmidt 1985, Schmidt y Hanna 2006), sin embargo, se desconoce si tienen algún efecto excitatorio (Singh et al. 1999) sobre las abejas maduras. Se necesitan más estudios para: i) determinar si las recolectoras y las nodrizas están equipadas con el mismo conjunto de receptores gustativos/olfativos y ii) conocer hasta qué punto sus decisiones recaen en la evaluación de claves del polen en la misma o distintas modalidades sensoriales (Claudianos et al. 2014, Iovinella et al. 2018).

A partir del análisis de componentes principales, se observa que las respuestas de las recolectoras fueron las más afectadas por las experiencias con los pólenes, lo que resultó en una gama más amplia de elecciones que la mostrada por las recolectoras naïve (Fig. 2.4). Resulta interesante observar, además, que estas experiencias modificaron las elecciones de las recolectoras de tal manera que se aproximaron a las de las abejas jóvenes. Este

solapamiento podría resultar ventajoso para la nutrición y el desarrollo de las obreras a edades tempranas, quienes disponen de recursos en una proporción más parecida a la que ellas consumen.

Por un lado, el cambio en la elección de pólenes podría estar determinado por las experiencias adquiridas tras las sucesivas visitas a la estación de forrajeo. Las experiencias individuales en la fuente de polen les permitirían a las recolectoras aprender las claves intrínsecas del recurso (como su olor, textura o sabor) y utilizar esta información para discriminar entre las cuatro fuentes. Más allá de la diferencia en los constituyentes que disminuyen o aumentan la atracción por cada fuente de polen (sección 1.2.4), la dificultad que experimentan las recolectoras al extraer y/o compactar los granos (determinado por el tamaño, forma, y grado de cohesión del grano) es otro factor que podrían influenciar las elecciones al determinar la eficacia del forrajeo. Por otra parte, la elección de las recolectoras podría cambiar a partir de las interacciones con otros miembros de la colonia, o incluso a modificaciones del entorno del nido que se producen tras la incorporación de los distintos pólenes.

El escenario en el que se puso a prueba la hipótesis se limitó a un conjunto de cuatro tipos de polen de abeja que varían en su composición de nutrientes. El polen de colza (*B. napus*) se caracteriza por un alto contenido de lípidos (Evans et al. 1991, Somervielle 2001, 2005), proteína cruda de calidad intermedia (Evans et al. 1991, Roulston et al. 2000, Pernal y Currie 2001, Somervielle y Nicol 2006), y un alto contenido de aminoácidos esenciales que permite cubrir todos los requerimientos de las abejas (Somervielle 2001, Cook et al. 2003, Somervielle y Nicol 2006). Algo similar se vio para el polen de flor amarilla (*D. tenuifolia*), siendo un poco mayor el contenido lipídico (Tourn 2013). Ambos pólenes pertenecen a la familia de las Brassicáceas por lo que podrían compartir algunas características de su composición (ver más abajo). El polen de zarzamora (*Rubus* sp.), varía en su contenido según la especie, siendo generalmente rico en proteínas y aminoácidos esenciales y pobre en lípidos (Schmidt et al. 1987, Day et al. 1990, Di Pasquale et al. 2013, Domenici et al. 2015, Liolios et al. 2016, Sagona et al. 2017, y referencias en Kostryco y Chwil et al. 2021). Además, puede tener una concentración alta de fenoles, flavonoides y carotenoides (Barbieri et al. 2020), responsables de darle un sabor amargo y de su coloración. Al igual que la zarzamora, el polen de sauce (*Salix* spp.) provino del Delta,

donde la mayoría de los sauces son naturalizados. En otros sitios se vio que el polen corbicular de estas especies presenta un bajo contenido de proteína (Todd y Bretherick 1942, Santos et al. 2009, Forcone et al. 2011, Radev 2018) y de aminoácidos (Day et al. 1990) y, particularmente, es deficiente en isoleucina, esencial para las abejas (de Groot 1952, Somervielle 2001, Somervielle y Nicol 2006). También se vio que poseen bajo contenido lipídico total (Somervielle 2001, 2005) aunque pueden presentar un alto contenido de ácidos grasos omega-3, carotenoides y esteroides, entre ellos el 24-metilencolesterol que es muy importante para las abejas (Conte et al. 2017, Primorac et al. 2023). Sin embargo, en el Bajo Delta se registró un valor alto en el contenido proteico del polen corbicular de sauce (López y Gurini 2022), lo que puede explicarse ya que la composición química del polen puede variar no solo entre especies sino también entre individuos, condiciones climáticas y geográficas (Somervielle 2001, Invernizzi et al. 2011). En general, la marcada diferencia en el contenido lipídico total de los pólenes de las Brasicáceas frente a los pólenes del Delta, podría explicar la atracción de las recolectoras, principalmente de las naïve, por los primeros (Singh et al. 1999, Somervielle 2005). La composición del polen de zarzamora lo convertiría en una opción menos atractiva pero muy nutritiva, lo que podría ser responsable, al menos en parte, del cambio en la respuesta de las recolectoras después de experimentarlo. Por otro lado, las Brasicáceas presentan glucosinolatos, típicos metabolitos secundarios de defensa en los tejidos (Hopkins et al. 2009) y en el néctar (Truchado et al. 2010, Bruinsma et al. 2014). Si bien se desconoce si estos compuestos están presentes en el polen de la colza y la flor amarilla, muchos de los metabolitos secundarios de defensa contra la herbivoría se encuentran en concentraciones máximas en el polen (Palmer-Young et al. 2019a, b). La toxicidad de los glucosinolatos se produce post-ingestión (Bruce et al. 2014), por lo que también podría explicar el menor consumo de estos pólenes por parte de las abejas jóvenes. Un estudio detallado de la composición química de los cuatro pólenes usados en este experimento nos permitiría conocer mejor los requisitos nutricionales de las obreras jóvenes e investigar si dicha composición correlaciona (o no) con los cambios observados en la dieta.

La composición en nutrientes esenciales de los diferentes pólenes afecta el desarrollo de las abejas (por ejemplo, al tamaño de la glándula hipofaríngea) y su supervivencia (Schmidt et al. 1987, Di Pasquale et al. 2013, 2016, Arien et al. 2015, Corby-Harris et al.

2018, Lan et al. 2021), por lo que es importante que pueda haber una compensación de dietas nutricionalmente deficientes mediante la elección de las distintas opciones disponibles (Hendriksma y Shafir 2016, Zarchin et al. 2017). En trabajos donde se ofrecía a las abejas dietas de polen multiflorales frente a monoflorales, se vio que con frecuencia eligen las opciones multiflorales (Schmidt 1984, Schmidt et al. 1995, Alaux et al. 2010, Di Pasquale et al. 2013), que permitirían amortiguar las carencias de nutrientes o los excesos de toxinas. Además, una dieta mixta está directamente relacionada con mayores niveles de inmunidad individual y social respecto de una dieta monofloral (Alaux et al. 2010). Sin embargo, en otros estudios se observó que esto no es una regla, sino que existen pólenes monoflorales que pueden ser más consumidos por las abejas que las mezclas de varios pólenes (Singh y Singh 1996, Di Pasquale et al. 2013), posiblemente porque proporcionan una nutrición completa.

Resumiendo, los distintos perfiles de elección de pólenes encontrados en las abejas jóvenes y las maduras, la modificación de estos perfiles con la experiencia, y la posible convergencia de ambos, sugiere que a medida que el recurso es explotado e incorporado al nido, las elecciones individuales de las recolectoras se actualizan en función de las experiencias adquiridas en el campo y en la colmena. Por otra parte, las experiencias de las abejas jóvenes tras consumir los pólenes también cambiaron sus elecciones, lo que posiblemente responde al intercambio de pólenes muy palatables pero poco nutritivos por otros menos palatables pero más nutritivos.

PREFERENCIAS APRENDIDAS EN ABEJAS JÓVENES TRAS EXPERIMENTAR POLEN ADULTERADO

3.1. Introducción

El éxito de los animales depende de la probabilidad de acceder a la fuente de alimento. Para mejorar esta probabilidad los animales dependen en gran medida del aprendizaje y la memoria. En la abeja *Apis mellifera*, las recolectoras evalúan el valor del alimento y asocian las características de la fuente (olores, colores, texturas, etc.) con la recompensa que la fuente proporciona (Ribbands 1955, Koltermann 1969, Menzel 1999, Scheiner et al. 1999, 2001, Arenas y Farina 2012). Como se desarrolló en la sección 1.3.3, el aprendizaje sobre las claves de las fuentes no sólo ocurre en el campo, sino también dentro del nido, por ejemplo, cuando las obreras procesan y almacenan los recursos recolectados por las forrajeras (Deneubourg 1989, Camazine et al. 2001, Gordon 2010). Este aprendizaje social es relevante para generar una respuesta adaptativa colectiva, ya que los individuos que participan en diferentes tareas aprenden y responden a la información sobre los recursos disponibles. La pregunta de cómo los distintos grupos de obreras aprenden la información relativa al alimento, es especialmente interesante en la abeja melífera, ya que las nodrizas consumen el polen, pero no así las forrajeras.

Debido a las diferencias en el estado fisiológico entre las nodrizas y recolectoras y sus distintas necesidades nutricionales (sección 1.2.3), las nodrizas tienen un mayor acceso a los recursos y sus constituyentes, lo que las convierte en buenas candidatas para evaluar, aprender y memorizar información sobre la calidad de los pólenes disponibles en el nido.

Según su origen botánico, los pólenes pueden diferir mucho en su composición además de presentar compuestos tóxicos, disuasorios, y/o compuestos que alteran la digestibilidad (secciones 1.2.4 y 1.2.4.1). En algunos trabajos se vio que las abejas jóvenes muestran preferencias por los pólenes de alta calidad (Schmidt y Johnson 1984, Schmidt et al. 1995) y evitan los tóxicos (Schmidt et al. 1989). Sin embargo, aún no se ha estudiado si las obreras jóvenes son capaces de aprender las claves especie-específicas del polen en función de su propia evaluación de la calidad del recurso.

Teniendo en cuenta que las abejas nodrizas podrían ser las que toman las decisiones sobre qué polen utilizar para nutrir a la colonia, se investigó si su comportamiento es lo suficientemente plástico como para mediar en la selección del polen. La hipótesis que se plantea en el presente capítulo es que las abejas jóvenes pueden asociar claves especie-específicas del polen con compuestos nutritivos/fagoestimulantes o compuestos aversivos en el polen y, en consecuencia, modificar sus elecciones de consumo. Se espera que la adición de sustancias fagoestimulantes y/o nutritivas (por ejemplo, el ácido linoleico, un ácido graso esencial) refuerce positivamente el aprendizaje de las claves del polen. Por otro lado, se espera que el agregado de sustancias desagradables y/o nocivas (por ejemplo, la amigdalina o la quinina), refuercen negativamente el aprendizaje. De este modo, las experiencias apetitivas y aversivas darían lugar a memorias que permiten predecir la calidad del polen a partir de las claves aprendidas.

El objetivo del presente capítulo consistió en investigar la capacidad de las abejas jóvenes de discriminar entre las claves especie-específicas de dos pólenes monoflorales: uno que habían experimentado con el agregado de un compuesto fagoestimulante o aversivo (adulterado) y otro sin adulterar. Este objetivo se puso a prueba utilizando, por un lado, abejas jóvenes criadas en el laboratorio (experimento I) y, por otro, abejas en el contexto social natural de la colmena (experimento II). Se predice que las abejas discriminarán entre los pólenes y reducirán el consumo de aquellos que previamente se asociaron con sustancias nocivas (amigdalina y quinina). Así también se predice que aumentarán el consumo de los pólenes que se asociaron con ácido linoleico.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Sitio de estudio y abejas

Se realizaron los experimentos durante las temporadas de verano de 2018/2019 y 2019/2020 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34°32'S, 58°26'W). Las abejas del experimento I emergieron de cuadros de cría que habían sido colocados dos días antes en una incubadora a 34°C, 55% de humedad relativa y oscuridad. Cada día se colectaron manualmente las obreras emergidas de 0 a 1 día de edad y se colocaron en cajas de madera (10×10×10 cm) conformando grupos de 80 a 90 individuos por caja. Se inició el experimento inmediatamente después del confinamiento, siguiendo el esquema mostrado en la Fig. 3.1A. Las abejas fueron alimentadas con solución azucarada al 50% p/p *ad libitum* durante todo el periodo experimental. Se utilizaron un total de 40 cajas. Las réplicas de cada tratamiento procedían de cuadros de colmenas diferentes. En el experimento II, se utilizaron 24 colonias de unas 15.000 abejas obreras cada una, una reina fecundada, 4-5 marcos de cría y 1-2 marcos con reservas de alimento.

3.2.2. Modificación de la calidad del polen

En la presente tesis, la calidad del polen está definida en términos relativos determinada por la manipulación de los pólenes durante las fases de tratamiento. Así, definimos a un polen como de mejor calidad si permanece sin adulterar durante todo el ensayo o fue suplementado con un compuesto nutritivo/fagoestimulante. Por otro lado, el polen que resultó adulterado con un compuesto nocivo para el tratamiento representa un polen de baja calidad. Teniendo en cuenta que el valor del polen para las abejas puede no estar relacionado con el contenido nutricional (sección 1.2.4), no se analizó la composición química de los pólenes utilizados, por lo que siempre se hicieron controles que incluyeron dependiendo del experimento: los pólenes sin adulterar durante todo el ensayo, las preferencias iniciales de las abejas y/o la serie complementaria donde se adulteró la opción no adulterada en la primera serie.

Para reducir su calidad, se incorporó al polen amigdalina (0,1 M) o quinina (0,1 M), dos sustancias nocivas que provocan una mortalidad significativa luego de ser ingerida por las abejas (Ayestaran et al. 2010). Para aumentar la calidad del polen, se adicionó 4% p/p de ácido linoleico conjugado (CLA), un ácido graso esencial con propiedades fagoestimulantes (Robinson y Nation 1968, Dobson et al. 1988, Manning et al. 2007, Ma et al. 2015). En todos los experimentos se usaron pólenes monoflorales obtenidos de muestras multiflorales o monoflorales recolectadas de forma natural por abejas (proporcionadas y caracterizadas por las cooperativas Pampero, Amuyen y CoopSol). En el caso de las muestras multiflorales, se separaron manualmente las cargas de polen según su origen botánico con base en su color, brillo, textura y grado de aglutinación. La mayoría de las muestras de polen se obtuvieron durante la misma estación de la toma de datos. Para alimentar experimentalmente a las abejas, se trituraron, pesaron e hidrataron los pólenes obteniendo una pasta parecida al pan de abeja que se ofrecieron *ad libitum* por separado, utilizando jeringas graduadas de 5 ml a las que se les habían cortado las puntas.

3.2.3. Experimento I: Evaluación de las preferencias aprendidas de abejas jóvenes confinadas que experimentaron cambios en la calidad del polen.

Con el objetivo de conocer si las abejas jóvenes ajustan sus preferencias hacia los pólenes de mejor calidad, medimos las preferencias de consumo por los pólenes de colza y flor amarilla tras experimentar uno de los dos adulterado. El experimento duró 6 días y constó de tres fases: preferencia inicial, tratamiento y evaluación (Fig. 3.1A).

Durante todo el experimento, las abejas confinadas en cajas recibieron simultáneamente polen de colza y de flor amarilla en alimentadores individuales. Durante la fase de preferencia inicial (días 1 y 2), se alimentó a las abejas con los dos pólenes no adulterados y se registró el volumen consumido de cada uno de ellos. Para el tratamiento (días 3 y 4), se adulteró el polen de colza con ácido linoleico, amigdalina o quinina (*serie colza*). Para controlar el efecto del origen botánico sobre el aprendizaje, se repitió el experimento utilizando flor amarilla como polen adulterado y colza como polen no adulterado durante el tratamiento (*serie flor amarilla*). Los controles recibieron ambos pólenes sin adulterar durante esta fase. Aquí también medimos el consumo de ambos pólenes. En la evaluación (días 5 y 6), las abejas recibieron los dos pólenes no adulterados

y se registró nuevamente el consumo de cada uno de ellos. Con base en el volumen (ml) de polen consumido de cada jeringa durante las últimas 24 horas de cada fase, se calculó el consumo estandarizado (CE) de polen de colza o de flor amarilla. Para la *serie colza*, el CE se definió como el volumen de polen de colza consumido en relación con el volumen total de consumo del polen de colza y flor amarilla. Para la *serie flor amarilla*, el CE se definió como el volumen de polen de flor amarilla consumido en relación con el consumo total de ambos pólenes. Los CE calculados para la preferencia inicial de las abejas por los dos pólenes se utilizaron en el análisis estadístico para contemplar las variaciones de consumo que podrían existir entre las cajas (véase la sección 3.2.5). Los CE obtenidos en el tratamiento nos permitieron confirmar que las sustancias que se utilizaron fueron eficaces para modificar la calidad del polen, ya que las abejas confinadas que experimentaron sustancias nocivas evitaron el polen adulterado en relación a los grupos control y las que experimentaron el ácido linoleico (Tabla A3.2 en anexo). Por último, se compararon los CE obtenidos en la evaluación entre los cuatro tratamientos (ácido linoleico, amigdalina, quinina y control) para responder si las experiencias positivas o negativas con pólenes adulterados conducen a la formación de memorias que sesgan las preferencias de consumo.

3.2.4. Experimento II: Evaluación de las preferencias aprendidas en colonias que experimentaron cambios en la calidad del polen.

Al igual que en el experimento I pero utilizando colonias del apiario, se investigó si las abejas que consumen polen ajustan sus preferencias hacia las opciones de mejor calidad, esta vez en el contexto social de la colmena. Se utilizaron siete pólenes monoflorales: girasol (*Helianthus annuus*), sauce (*Salix* spp.), zarzamora (*Rubus* sp.), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), cardo (*Carduus* sp.), flor amarilla y colza; que se asignaron aleatoriamente de a pares a cada colmena. Se colocaron jeringas con cada polen monofloral entre los cuadros centrales de la colmena siguiendo el mismo esquema temporal utilizado para el experimento I. Para la preferencia inicial, se ofreció y midió el consumo de los dos pólenes. Durante el tratamiento, se suministró a cada colonia uno de los dos pólenes adulterado con quinina, amigdalina o ácido linoleico (Fig. 3.1B). El grupo control recibió ambos pólenes no adulterados. En las colonias tratadas con ácido linoleico, amigdalina o quinina, el polen adulterado dentro de cada par se determinó al azar, de modo que el efecto del tratamiento fuera independiente de

cualquier combinación particular de polen. Para la evaluación, se ofrecieron ambos pólenes no adulterados y medimos su consumo. De forma similar a los experimentos anteriores, se evaluaron las preferencias de consumo mediante los CE del polen que había sido previamente adulterado. Esta vez, dada la intención de determinar si el efecto de los tratamientos era independiente del polen utilizado y no analizar diferencias en la identidad del polen que conformaba cada par, el cálculo del CE se realizó como el volumen consumido del polen que se ofreció adulterado (sin importar cuál) en relación al consumo total del par de pólenes. Los CE de la preferencia inicial se utilizaron para incluir las variaciones entre colonias en el análisis (véase sección 3.2.5). Los CE de la evaluación se utilizaron para comparar las preferencias aprendidas entre los cuatro tratamientos (ácido linoleico, amigdalina, quinina y control).

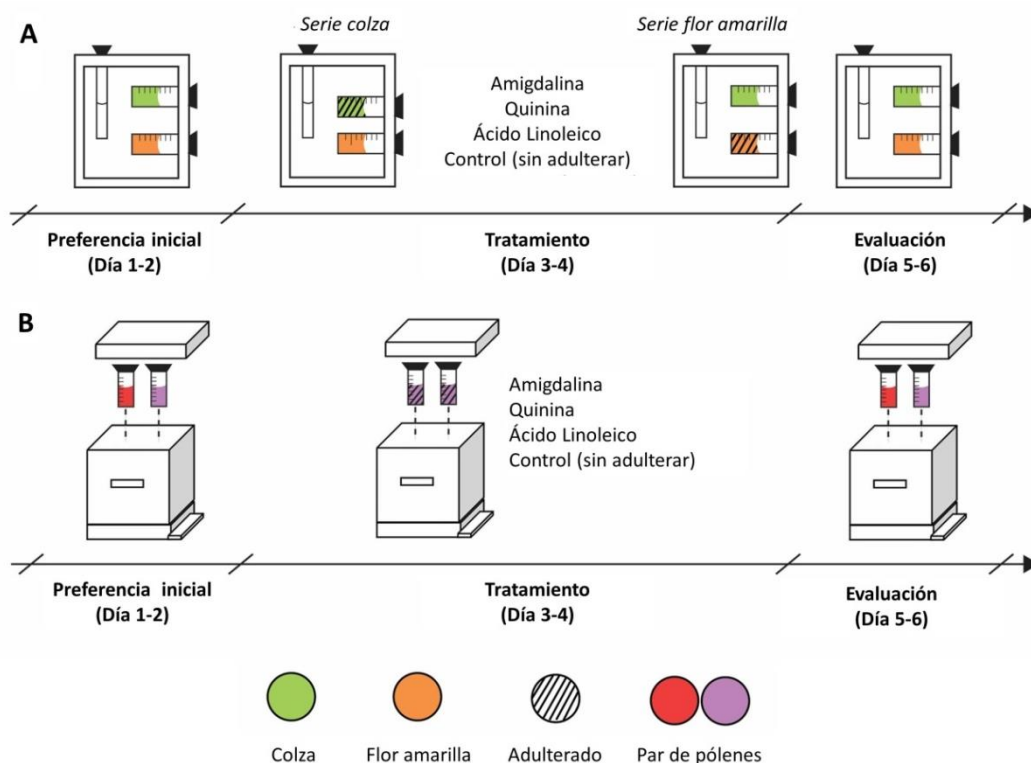


Figura 3.1. Procedimiento seguido en los experimentos I (A) y II (B). Los esquemas muestran las fases experimentales (y los días en que tuvieron lugar), los pólenes utilizados y si estaban (o no) adulterados. En A se ofreció solución azucarada *ad libitum* a través de tubos de plástico de 10 ml.

3.2.5. Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron mediante modelos lineales generales en R (<http://www.R-project.org/>). Las diferencias en los valores del consumo estandarizado (CEs) del experimento I y II, se analizaron mediante una regresión lineal múltiple para la variable CE con distribución normal. En el experimento I, se exploró el impacto del tratamiento (Control, Ácido linoleico, Amigdalina y Quinina) y de la serie (Colza y Flor amarilla) como efectos fijos, así como su interacción. Se añadieron las preferencias iniciales como covariable y el consumo total de polen como offset. En el experimento II, se analizó el efecto del tratamiento (Control, Ácido linoleico, Amigdalina y Quinina) como efecto fijo y se añadieron el consumo total de polen y las preferencias iniciales como covariables. En todos los casos se comprobaron los supuestos de homocedasticidad y normalidad (pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente). Para los contrastes se utilizaron las pruebas de Tukey mediante el paquete multcomp en R (Hothorn et al. 2008).

3.3. Resultados

3.3.1. Experimento I: Efectos del polen adulterado sobre las preferencias de consumo aprendidas de las abejas jóvenes confinadas en cajas.

Las preferencias de consumo de las abejas en edad de nodrizas se vieron afectadas por la identidad y la calidad (adulterada o no) del polen ($F_{3; 31} = 9,8239$, $P = 0,0001$; Fig. 3.2). Los CEs de la *serie colza* fueron inferiores tras la administración de polen adulterado con quinina ($0,244 \pm 0,03$, N jaulas = 5) y con amigdalina ($0,201 \pm 0,08$, N cajas = 4), y fueron significativamente diferentes de los CEs de los tratamientos Control ($0,816 \pm 0,06$, N cajas = 6) y Ácido linoleico ($0,581 \pm 0,05$, N cajas = 5) (Control-Amigdalina: t-ratio = 5,536, $P < 0,0001$; Control-Quinina: t-ratio = 4,171, $P = 0,0012$; Ácido linoleico-Amigdalina: t-ratio = 4,678, $P = 0,0003$; Ácido linoleico-Quinina: t-ratio = 3,677, $P = 0,0047$; Fig. 3.2A). El polen de colza adulterado con ácido linoleico no afectó el CE de las abejas (Control-Ácido linoleico: t-ratio = 0,339, $P = 0,9863$; Fig. 3.2A). No se detectaron diferencias entre el grupo tratado con amigdalina y el tratado con quinina (t-ratio = -1,459, $P = 0,4738$).

El polen de flor amarilla adulterado con quinina ($0,04 \pm 0,04$, N cajas = 5) disminuyó los CE en comparación con el tratamiento control ($0,219 \pm 0,03$, N cajas = 5), aunque esta tendencia no fue significativa (t-ratio = - 0,416, P = 0,9754; Fig. 3.2B). Curiosamente, el polen de flor amarilla adulterado con ácido linoleico ($0,393 \pm 0,10$, N jaulas = 6) aumentó significativamente el CE de las abejas jóvenes (Ácido linoleico-Control: t-ratio = -3,175, P = 0,0169), mientras que el polen adulterado con amigdalina ($0,305 \pm 0,12$) no lo afectó (Amigdalina-Control: t-ratio = - 2,090, P = 0,1787; Fig. 3.2B). Las abejas jóvenes prefirieron el polen de colza al de flor amarilla, pero la preferencia fue similar cuando ambos pólenes fueron adulterados con ácido linoleico (Fig. 3.2). El impacto de sustancias aversivas como la quinina fue alto en la *serie colza*, pero relativamente bajo en la *serie flor amarilla*. Por el contrario, las preferencias de consumo se vieron fuertemente afectadas por la suplementación de la flor amarilla con ácido linoleico, pero sólo ligeramente en el caso de la colza. En conjunto, los resultados muestran que las abejas jóvenes fueron capaces de modificar sus preferencias de consumo en función de la identidad y la calidad del polen.

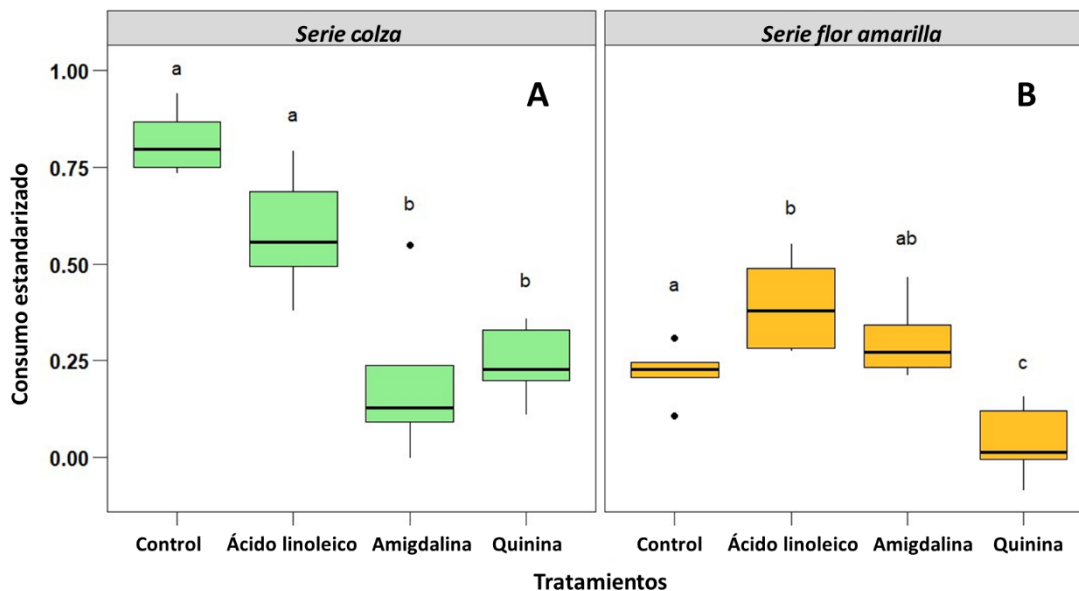


Figura 3.2. Efectos del polen adulterado sobre las preferencias de consumo aprendidas de las abejas jóvenes confinadas. **(A)** El consumo estandarizado de colza se obtuvo después de que las abejas confinadas experimentaran polen de colza sin adulterar (Control) o adulterado con un fagoestimulante (Ácido linoleico) o una sustancia nociva (Amigdalina o Quinina). **(B)** Del mismo modo, se obtuvo un consumo estandarizado de flor amarilla después de que las abejas

experimentaran el polen de flor amarilla adulterado con ácido linoleico, amigdalina, quinina o sin adulterar (Control). Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

3.3.2. Experimento II: Efectos del polen adulterado sobre las preferencias de consumo aprendidas de las abejas jóvenes dentro de la colmena.

Se encontraron diferencias en las preferencias de consumo de colonias expuestas a los distintos tratamientos (Tratamientos: $F_{3; 17} = 7,2482$, $P = 0,0024$; Fig. 3.3). Se observó una reducción significativa en los CEs de las colonias que experimentaron pólenes adulterados con quinina ($0,273 \pm 0,0511$, N colonias = 7) respecto al grupo control (t-ratio = 3,614, $P = 0,0104$; Fig. 3.3). No así (t-ratio = 2,369, $P = 0,1215$) en los CEs de las colonias que experimentaron pólenes adulterados con amigdalina ($0,389 \pm 0,0435$, N colonias = 6). Por otro lado, las colonias alimentadas con polen suplementado con ácido linoleico mostraron un aumento de su preferencia ($0,589 \pm 0,0495$, N colonias = 5), aunque no fue significativamente distinta al grupo control (t-ratio = - 0,851, $P = 0,8293$). Curiosamente, los CEs de las colonias tratadas con ácido linoleico se diferenciaron de los CEs de las colonias tratadas con amigdalina y quinina (t-ratio = 3,049, $P = 0,0332$; t-ratio = 4,138, $P = 0,0035$, respectivamente; Fig. 3.3). Las preferencias de consumo aprendidas establecidas en colonias alimentadas con polen adulterado, fueron coherentes con los resultados observados en jaulas de abejas que experimentaron simultáneamente polen adulterado y no adulterado (experimento I).

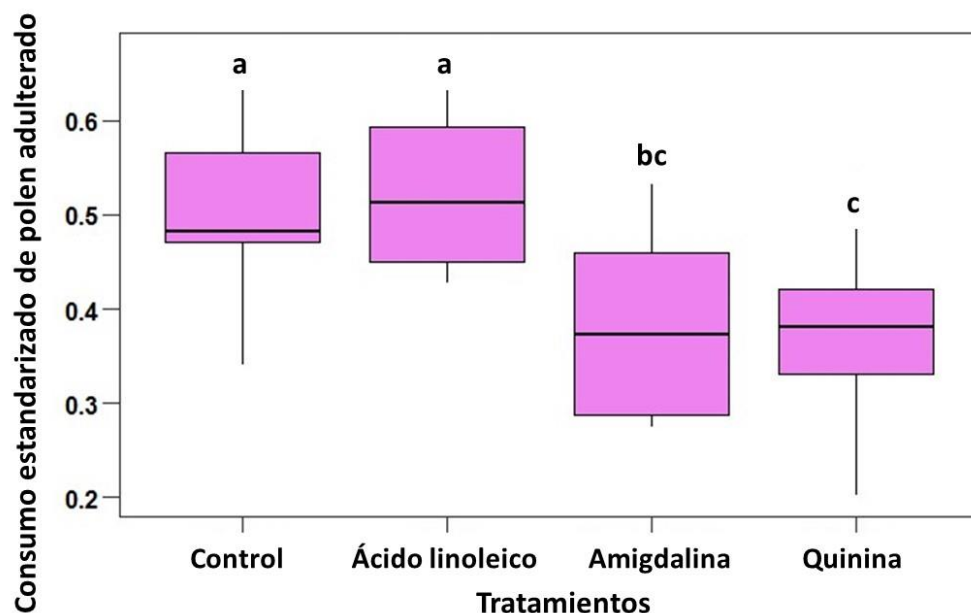


Figura 3.3. Efectos del polen adulterado sobre las preferencias de consumo aprendidas de las abejas jóvenes dentro de la colmena. Se muestra el consumo estandarizado del polen que fue adulterado que se calculó en la fase de evaluación, después de que las colonias experimentaran uno de los dos pólenes sin adulterar (Control) o adulterado con sustancias fagoestimulantes (Ácido linoleico) o nocivas (Amigdalina o Quinina) durante la fase de entrenamiento. Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

3.4. Discusión

Hasta ahora se sabía muy poco sobre la capacidad de las abejas en edad de nodrizas de aprender y retener información sobre el polen. En este capítulo, se observó que las preferencias de consumo de polen pueden cambiar en función de la información sobre la calidad del polen aprendida durante los días previos. Las abejas jóvenes que consumen grandes cantidades de este recurso pueden utilizar la información aprendida para modificar sus respuestas iniciales haciendo, a su vez, su propia elección de pólenes entre los que han sido incorporados al nido por las recolectoras.

3.4.1. Generalización y discriminación de estímulos basados en el polen.

El interés por estudiar la capacidad de las abejas jóvenes para aprender y retener las señales del polen es bastante reciente. Un estudio previo (Arenas y Farina 2014) demostró que las abejas jóvenes alimentadas con dietas únicas de polen monofloral (especies de Solanaceae, *Taxodium* sp., o *Hypochaeris* sp.), no sesgaban la respuesta de orientación hacia el olor específico del polen (es decir, las abejas elegían por igual los olores de los pólenes monoflorales experimentados y los olores de los novedosos). En un experimento adicional del presente capítulo (ver Fig. A3.1 en anexo), tampoco se detectaron diferencias en las preferencias de consumo entre colza y flor amarilla después de que las abejas jóvenes experimentaran el polen de colza adulterado con un compuesto nocivo durante el tratamiento (sin la oferta simultánea de un polen monofloral alternativo no adulterado como se hizo en el experimento I). En línea con otros estudios que observaron que las abejas melíferas pueden generalizar los olores del polen (Cook et al. 2005, Pietrantuono et al. 2019), incluso entre plantas no relacionadas taxonómicamente, se especula que la falta de diferencias podría deberse a la generalización entre las claves del polen aprendido y del novedoso. La generalización permitiría entonces, que el valor predictivo de la información aprendida sobre un tipo de recurso se extiende a otro nuevo que es equivalente pero distinto (Gumbert 2000, Ghirlanda y Enquist 2003, Guerrieri et al. 2005).

Por el contrario, se ha demostrado que las abejas pueden discriminar entre dos olores que suelen generalizarse si se las entrena de forma diferencial, por ejemplo, cuando uno de los olores se presenta con recompensa y el otro sin recompensa (Cook et al. 2005). Consecuentemente, los resultados del experimento I indican que, si las abejas experimentan simultáneamente el polen adulterado y el no adulterado, son capaces de aprender las claves de cada polen de forma diferencial, y así lograr discriminarlos. Del mismo modo, en las colonias (experimento II) las abejas jóvenes pueden haber aprendido el único polen adulterado ofrecido durante el tratamiento discriminándolo de los otros pólenes (indeterminados) que ingresaron al nido de forma natural. Así pues, los resultados sugieren que, aunque las abejas tienden a generalizar las claves de distintos pólenes, pueden discriminarlas si se aprenden de forma diferencial.

3.4.2. Evaluación pre-ingestiva o estado post-ingestión inducido por compuestos aversivos y fagoestimulantes.

Entre las sustancias que se utilizaron para modificar la calidad de los pólenes, los compuestos nocivos, quinina y amigdalina, fueron los más eficaces en inducir la formación de memorias, principalmente, cuando se añadieron al polen de colza altamente preferido (experimento I). La quinina también fue eficaz cuando se añadió a la flor amarilla. La fuerza de estas memorias se correlaciona positivamente con el volumen de polen adulterado consumido durante el tratamiento de los experimentos realizados (Tablas A3.1-A3.3), para lo cual se observó que el consumo de polen adulterado con amigdalina y quinina disminuyó drásticamente en comparación con los grupos Control. Además, los CEs obtenidos en el tratamiento del experimento I (Tabla A3.2), confirmaron que las abejas fueron capaces de evaluar la sustancia nociva, ya que mostraron una clara evitación por los pólenes adulterados con estas sustancias en relación con los no adulterados. Sin embargo, los experimentos desarrollados no permiten identificar el mecanismo que utilizan las abejas para hacer su evaluación. Trabajos anteriores en los que se probaron soluciones de quinina y amigdalina en abejas recolectoras enjauladas, no detectaron un efecto pre-ingestivo (por ejemplo, de evitación) durante la recolección. Por el contrario, mostraron que el efecto ocurría post-ingestión (de Brito Sanchez et al. 2005, Ayestaran et al. 2010), ya que las abejas asociaban las claves gustativas con los compuestos nocivos de manera retardada (pero véase también Avarguès-Weber et al. 2010). Aprendiendo de forma retardada a través del estado inducido por la ingestión de sustancias nocivas, las abejas nodrizas podrían evitar recursos inapropiados que las recolectoras incorporan a la colonia, implementando de esta manera, una instancia de control de la calidad del polen adicional a la realizada por las recolectoras en el campo.

3.4.3. Respuestas comportamentales de las abejas jóvenes frente a los compuestos naturales y los agroquímicos en el polen.

Las sustancias nocivas en el polen ejercen respuestas repulsivas o inducen experiencias desagradables y/o de malestar (sección 1.2.4.1). Entre ellos, los compuestos secundarios como la nicotina en *Nicotiana tabacum* (tabaco) o la amigdalina en *Prunus*

dulcis (almendro), se encuentran de forma natural en el polen (Detzel y Wink 1993, London-Shafir et al. 2003). Además, otras sustancias artificiales aplicadas a los campos podrían contaminar el polen. En particular, productos agroquímicos como herbicidas, insecticidas y fungicidas pueden estar presentes en los recursos que las recolectoras incorporan al nido, y afectar la salud y el funcionamiento de la colonia (Bohan et al. 2005, Elbert et al. 2008, Kakumanu et al. 2016, Rondeau y Raine 2022, Perkins et al. 2023). El imidacloprid, por ejemplo, uno de los insecticidas más utilizados en todo el mundo, influye en el comportamiento de las abejas melíferas jóvenes al afectar la adquisición de información durante el aprendizaje asociativo y provocar una disminución de la sensibilidad a la sacarosa (Mengoni Goñalons y Farina 2015, 2018). Por otro lado, el glifosato, un herbicida de amplio espectro utilizado para el control de malezas, no interfiere en el aprendizaje simple, pero sí reduce la discriminación olfativa en las obreras jóvenes. Curiosamente en Mengoni Goñalons y Farina (2018), las abejas alimentadas con solución azucarada con glifosato consumieron menos que el grupo control, lo que sugiere que el glifosato se detecta de algún modo antes o después de la ingestión. Dada la capacidad observada en las abejas jóvenes para evitar el polen previamente experimentado como nocivo, es relevante estudiar este proceso a futuro utilizando polen contaminado con pesticidas. Este mecanismo les permitiría mitigar los efectos deletéreos de estos compuestos en las colonias que polinizan en agroecosistemas.

3.4.4. *¿Pueden las abejas jóvenes influir en las decisiones de búsqueda de las recolectoras?*

A partir de los resultados obtenidos en el capítulo 2, se evidenció que la elección de polen es diferente en las abejas forrajeras y en las abejas en edad de nodrizas, al menos para la combinación de pólenes utilizada. Además, el perfil de elecciones cambió con la experiencia de ambos tipos de abejas, por lo que se espera que tanto las recolectoras como las nodrizas puedan estar implicadas en el proceso de selección del polen. Teniendo en cuenta que la búsqueda de alimento se ve influida por las interacciones que se producen dentro del nido (Deneubourg 1989, Roces 2002), una pregunta importante es si la elección entre pólenes que hacen las abejas jóvenes influye o no en las decisiones de las recolectoras.

DECISIONES DE FORRAJEO DE LAS COLONIAS DE *A. mellifera* TRAS EXPERIMENTAR PÓLENES ADULTERADOS

4.1. Introducción

Los animales dependen de su capacidad perceptual para seleccionar los recursos alimentarios más adecuados para obtener nutrientes. Para ello, los individuos que buscan alimento evalúan los recursos *in situ* para decidir si es conveniente recolectarlos o no. La recolección, sin embargo, no sólo satisface las necesidades inmediatas de los recolectores, sino que también puede cubrir las necesidades de otros miembros del grupo (Pierce y Ollason 1987). En este contexto, la selección de recursos puede ser conflictiva si las necesidades de los que recolectan y los que los utilizan no son las mismas. Como se desarrolló en la introducción (sección 1.1), la búsqueda de alimento en los insectos sociales está restringida a un subconjunto de obreras cuyas necesidades pueden diferir de las de otras compañeras de colonia (Dussutour y Simpson 2009). Por ejemplo, en la abeja *A. mellifera*, el polen no es utilizado directamente por las recolectoras, sino por las abejas nodrizas que consumen la mayor parte del polen y lo procesan para alimentar a las larvas y al resto de las compañeras de la colonia (Moritz y Crailsheim 1987, Crailsheim et al. 1992). Hasta el momento, quedan dudas si la selección del polen se basa en la evaluación de las recolectoras en el sitio de forrajeo, o si está influenciada por las experiencias relacionadas con el polen dentro del nido.

Teniendo en cuenta su forma de explotar el polen (sección 1.2.1), es poco probable que las recolectoras evalúen la composición del recurso en las fuentes, ya que la liberación de muchos de sus constituyentes (y, por ende, su detección) requiere de la ingestión del

recurso (sección 1.2.3). La evaluación del polen entonces podría ser pre-ingestiva, a partir de las claves disponibles en el “pollenkitt” (capa externa del grano) que también permiten discriminar entre recursos de diferente origen floral y que, a la vez, podría proporcionar información sobre los constituyentes internos del polen (sección 1.2.4). De forma consistente, las investigaciones sobre aprendizaje y memoria muestran que las abejas melíferas no necesitan ingerir polen para reforzar el aprendizaje asociativo, ya que el refuerzo del polen se produce a través de la estimulación quimiotáctil de los tarsos o las antenas (Nery et al. 2020, Moreno y Arenas 2023).

Dentro del nido, las abejas jóvenes mayormente nodrizas que consumen tanto polen fresco como pan de abeja, comparten jalea con las recolectoras (Crailsheim 1991, 1998), proporcionándoles proteínas y, probablemente, información sobre la calidad nutricional de la dieta de la colonia. Sin embargo, se desconoce si la información específica de las especies de pólenes puede compartirse a través de este mecanismo.

Durante el proceso de selección de alimentos, evitar la intoxicación es tan importante como nutrirse. Como se vio en el capítulo 3, las abejas jóvenes evitan consumir el polen que anteriormente experimentaron como de mala calidad (por ejemplo, adulterado con amigdalina o quinina), lo que sugiere que participan en el proceso de selección del polen dentro del nido. Sin embargo, queda por comprobar si las recolectoras también son capaces de evitar los recursos de baja calidad cuando se presentan dentro de su repertorio comportamental, es decir al momento de recolectarlos, lo que implicaría tener la capacidad de evaluar la composición del polen en las fuentes o como consecuencia de la información adquirida dentro del nido (Hendriksma y Shafir 2016, Zarchin et al. 2017). La hipótesis que se plantea en el presente capítulo es que las recolectoras ajustan sus preferencias tras experiencias mediadas por el polen que se procesa dentro del nido. Al igual que las nodrizas, las recolectoras podrían aprender a rechazar las claves de un polen de mala calidad directamente después de ingerir pequeñas muestras almacenadas en las celdas (Dreller et al. 1999, Dreller y Tapy 2000, Calderone y Johnson 2002). Alternativamente, podrían asociar las claves intrínsecas del polen con los efectos que el recurso causa en la colonia según su calidad (Seeley 2009), por ejemplo, debido a la acumulación de un polen en las reservas de la colmena si no es consumido por las nodrizas o a la distribución de alimento con toxinas que indujera malestar en las recolectoras provocando el ajuste de la recolección de polen.

En el presente capítulo, se propuso como objetivo investigar la capacidad de las recolectoras de aprender y memorizar las claves del polen en función de la calidad de este y de sus experiencias en la colmena. En experimentos de doble elección con colonias confinadas en jaulas de vuelo, se evaluó, en primer lugar, la respuesta de evitación de las recolectoras frente a un polen adulterado con amigdalina en la fuente de alimento (experimento I). En otro experimento (experimento II), se cuantificaron las preferencias por dos pólenes no adulterados, después de que uno de ellos se encuentre adulterado dentro del nido. Finalmente, se registró la selección de polen en el campo mediante la diversidad de muestras de polen recolectado por colmenas a las que se suministró (o no) polen adulterado con amigdalina (experimento III). En este último caso, el polen manipulado pertenecía a la flor amarilla (*D. tenuifolia*), una de las plantas dominantes en los alrededores.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Sitio de estudio y abejas

Se realizaron experimentos durante las temporadas de verano de 2019/2020 y 2020/2021. Los experimentos I y II se realizaron en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34°32'S, 58°26'W). Se utilizaron 8 colonias para el experimento I, 8 para el experimento IIA y 8 para el experimento IIB. Todas las colonias contenían una reina fecundada, 3-4 marcos de cría y 1-2 marcos con reservas de alimento. Para estos experimentos, se confinaron las colonias en dos jaulas de vuelo (9m x 3m x 3m), una colmena a la vez. El confinamiento dentro de la jaula de vuelo impedía la interferencia de las recolectoras con abejas de otras colonias. Al mismo tiempo, limitaba las fuentes de polen y néctar a aquellas ofrecidas durante los ensayos. Una vez en la jaula de vuelo, se entrenó a las recolectoras a visitar una estación de forrajeo que ofrecía polen de abeja multifloral triturado, en un alimentador *ad libitum*. La estación estaba a 8 metros de la entrada de la colmena. Las colonias estuvieron confinadas en las jaulas durante aproximadamente una semana antes del inicio de los experimentos, que era el tiempo mínimo necesario para conseguir un número constante y relativamente elevado de recolectoras de polen que visitaran la estación.

El Experimento III se realizó en un cultivo de girasol, ubicado en Coronel Pringles, Buenos Aires, Argentina (68°6'11.94 "S - 61°25'46.00 "O). Se utilizaron 22 colonias elegidas al azar de un total de 68 colonias ubicadas en 3 lotes diferentes dentro del campo. Todas las colonias contenían una reina fecundada, 7-8 cuadros de cría y 2 cuadros con reservas de alimento.

4.2.2. Polen monofloral y modificación de la calidad

En los experimentos se utilizaron pólenes monoflorales (sección 3.2.2) para que, por un lado, las abejas distingan el polen en función de sus claves (olor, sabor, textura, etc.), y, por otro, para que las preferencias entre las opciones de polen sean comparables dentro de las fases experimentales. Para reducir la calidad del polen, se trituró, pesó y mezcló el polen monofloral con amigdalina (Sigma-Aldrich, BioXtra, $\geq 97,0\%$). Se utilizó una concentración de 0,1 M previamente probada en el capítulo 3.

4.2.3. Experimento I: Evaluación de las preferencias de las recolectoras por el polen no adulterado frente al adulterado con amigdalina en la fuente de alimento.

En el primer experimento, se estudió si las recolectoras son capaces de evaluar la composición del recurso en el sitio de forrajeo y, por tanto, de evitar el polen adulterado con amigdalina durante sus visitas a las fuentes. Para ello, se midieron las preferencias iniciales de las recolectoras por dos pólenes monoflorales diferentes: uno ofrecido adulterado y otro sin adulterar (Ri). Dichas respuestas se compararon con las preferencias medidas en un grupo diferente de colonias, cuyas recolectoras elegían entre los mismos dos pólenes monoflorales cuando ambos se ofrecieron sin adulterar (Fig. 4.1A). En este caso, se utilizó polen de quebracho (*Schinopsis lorentzii*) versus polen de sauce (*Salix* spp). En la estación de forrajeo, el polen de quebracho se ofreció siempre sin adulterar. Por otro lado, el polen de sauce podía presentarse adulterado o sin adulterar según el tratamiento asignado a la colonia (Fig. 4.1A). Los dos pólenes se ofrecieron en alimentadores separados situados uno al lado del otro (a 2 cm de distancia). Los alimentadores de polen consistían en envases de plástico opaco de 360 ml con 8 orificios (7 mm) en la parte superior (tapa) por los que las abejas podían entrar y salir con sus cargas de polen. En el interior de los envases, había 2-3

g de polen adheridos a las cerdas de un limpiapipas (20 cm) enrollado en forma de espiral (Fig. 2.1F y G). El diseño de estos alimentadores favorece el uso de las claves olfativas del polen por parte de las recolectoras, mientras que limita el alcance de las claves visuales.

Las abejas cargadas con polen que abandonaron los alimentadores fueron contadas y capturadas para garantizar que no llevaran el recurso de vuelta al nido. Aquí, y en los experimentos siguientes, las abejas contabilizadas fueron retenidas en tubos de plástico hasta el final de la evaluación, por lo que en ningún caso una abeja pudo haber sido medida dos veces. Las recolectoras de polen no tenían experiencia previa con el polen ofrecido durante las pruebas, por lo que las preferencias que medimos no estuvieron influenciadas por la experiencia.

El diseño experimental consistió en 2 eventos de evaluación en días sucesivos (intervalo de 24 horas): evaluación de las respuestas de recolección iniciales (R_i) con ambos pólenes sin adulterar y la evaluación (E_v) con sauce ofrecido adulterado o no (Fig. 4.1A). Aunque todas las colmenas experimentales procedían de la misma población y del mismo apiario, no se descarta que pueda haber variabilidad entre las colonias, probablemente relacionada con los diferentes tipos de pólenes que experimentaron antes del confinamiento en la jaula de vuelo o con las necesidades nutricionales particulares de las colonias. Los ensayos se realizaron a las 10.00 horas y se prolongaron hasta que medimos las preferencias de al menos 30 abejas o hasta que transcurrió 1 hora. De cada evaluación (R_i y E_v), obtuvimos la proporción de recolectoras que preferían sauce como el número de abejas que recolectaban en el alimentador de sauce sobre el número total de recolectoras que recogían polen en ambos alimentadores. Se utilizaron las preferencias obtenidas en R_i como covariable en el análisis (véase sección 4.2.6). A continuación, se compararon las preferencias de las colonias por el polen de sauce sin adulterar o adulterado presentado en la estación de forrajeo.

4.2.4. Experimento II: Evaluación de las preferencias de las recolectoras tras la incorporación de polen adulterado con amigdalina en el interior de la colmena.

El objetivo de este experimento fue evaluar si las preferencias de las colonias que habían experimentado polen adulterado diferían de las preferencias de las colonias que habían experimentado el mismo polen sin adulterar. El diseño experimental se basó en que

las abejas puedan aprender los efectos de un polen adulterado contrastándolos o diferenciándolos de los efectos de un polen diferente, no adulterado. Esto es ya que previamente se vio que la experiencia asociativa entre un único polen monofloral y una sustancia aversiva, no logró establecer una memoria que sesgara las preferencias de consumo de las abejas jóvenes (Fig. A3.1 en anexo del capítulo 3). En cambio, cuando se ofreció a las abejas la oportunidad de aprender discriminando las claves de dos pólenes, uno adulterado y otro sin adulterar, aprendieron con éxito a evitar el polen adulterado (experimento I del capítulo 3).

Los experimentos consistieron en 2 fases de tratamiento y 3 eventos de evaluación (Fig. 4.1B y 4.1C). En una primera evaluación (Ri) medimos las preferencias iniciales por dos pólenes monoflorales. Una vez más, las respuestas iniciales se utilizaron como covariable en el análisis de datos para incorporar las posibles variaciones entre las preferencias de las colonias experimentales (véase sección 4.2.6). Inmediatamente después de Ri, se llevó a cabo la primera fase de tratamiento (Tr1) que se extendió durante dos días, en la que ofrecimos el polen adulterado o no adulterado. En el experimento IIA, se ofreció polen de sauce adulterado o sin adulterar en la estación de forrajeo y se permitió que las abejas lo recolectaran y lo introdujeran al nido. Aquí se evaluó el polen de sauce frente al de quebracho, que siempre se presentó sin adulterar (Fig. 4.1B). En el experimento IIB, el polen de colza adulterado (o sin adulterar) se hidrató hasta obtener una pasta parecida al pan de abeja, la que vertimos directamente en el interior de la colmena (10 ml cada día durante dos días). El polen se volcó en la parte superior de los cuadros centrales. En la estación de recolección se evaluó polen de colza versus flor amarilla, ambos sin adulterar (Fig. 4.1C). Nótese que, a pesar de ser similar, el experimento IIA incluye la posibilidad de que las abejas que recolectan el polen adulterado en Tr1 establezcan asociaciones aversivas con el recurso durante las sucesivas visitas.

Dos días después del inicio del experimento, medimos el efecto de la experiencia en la colmena sobre las preferencias por los pólenes (ambos sin adulterar) en un segundo ensayo de evaluación (Ev1; Fig. 4.1B). A continuación, se realizó la segunda fase de tratamiento (Ev2), que se desarrolló entre el día 2 y el día 4. En la segunda fase del experimento IIA, se permitió que las recolectoras llevaran de forma natural el polen de sauce no adulterado de la estación de vuelta al nido para evaluar si las memorias establecidas con

pólenes inadecuados pueden revertirse en base a la nueva información disponible. En la segunda fase del experimento IIB, también se dejó que las recolectoras se llevaran el polen de colza sin adulterar al nido, pero al mismo tiempo se lo ofrecimos adulterado dentro de la colmena por segunda vez (Tr2). De este modo, se comprobó hasta qué punto las experiencias mediadas por el polen dentro de la colmena resisten la información contradictoria. El día 4, se evaluaron las preferencias recolectoras por tercera vez (Ev2; Fig. 4.1C). Se comparó la proporción de abejas en las pruebas entre las colonias tratadas con polen adulterado y no adulterado.

4.2.5. Experimento III: Evaluación de la selección de polen tras el ofrecimiento de polen adulterado con amigdalina dentro de la colmena.

En el tercer y último experimento, se investigó si las experiencias dentro de la colmena mediadas por polen inadecuado afectaban a la selección de polen de las colmenas comerciales que forrajeaban en un entorno agrícola, así como a su esfuerzo recolector. Para ello, se suministró a un primer grupo de colonias, polen de flor amarilla (una planta de floración dominante muy disponible en los alrededores antes y durante el primer día del experimento), adulterado con amigdalina. A un segundo grupo de colonias se le suministró polen no adulterado de flor amarilla. Por último, un tercer grupo de colonias no recibió polen adicional. El polen de flor amarilla se trituró e hidrató para ser ofrecido como en el experimento IIB.

Se utilizó la diversidad floral del polen recogido por cada colmena como indicador de la selección de polen y el peso total de las muestras como indicador del esfuerzo recolector. Las muestras se recogieron utilizando trampas de polen convencionales (trampa de entrada frontal), que consisten en una estructura de madera con una malla metálica en su interior. La malla permite el paso de las abejas hacia el interior de la colmena mientras que retiene las cargas de polen, las cuales caen y se acumulan en un cajón colector en la parte inferior. Se tomaron muestras de las colonias durante 4 horas, un día antes (Ri) y dos días después de haber ofrecido el polen en la colmena (Ev; Fig. 4.1D). Se separaron las cargas de polen de las muestras en función de su color. Se ponderaron para calcular la proporción relativa de cada especie de polen y, a su vez, se utilizaron esas proporciones para calcular el índice de diversidad de Shannon (H). El índice H mide la probabilidad de seleccionar

todas las especies en la proporción con que existen en la comunidad (Hill 1973). El valor de H aumenta tanto cuando la riqueza de especies es mayor como cuando estas se distribuyen más homogéneamente. Se incluyó la diversidad de las muestras tomadas en Ri como covariable para controlar las diferencias entre colonias antes de la manipulación.

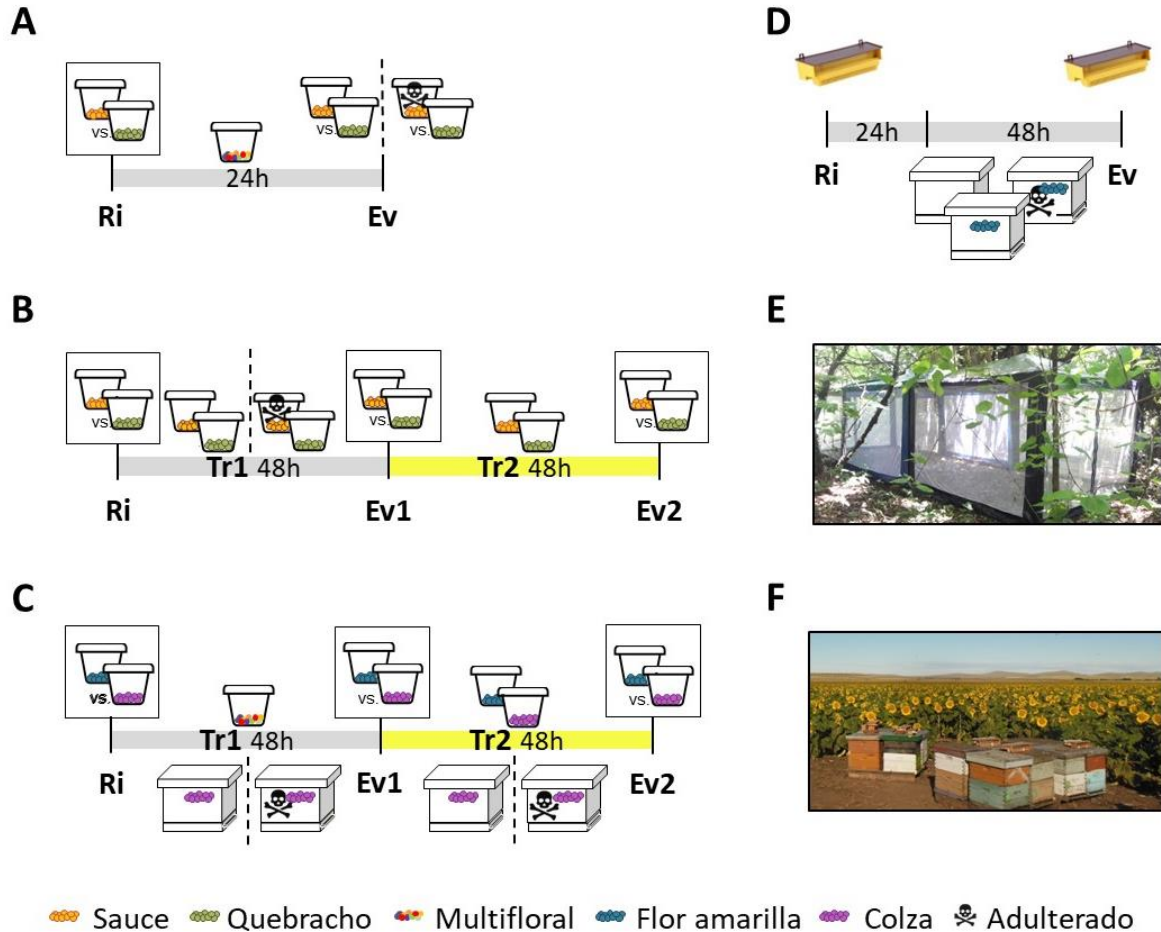


Figura 4.1. Esquema de los procedimientos experimentales. En el experimento I (A), las preferencias por los pólenes ofrecidos en alimentadores (envases de plástico), se evaluaron en la estación de recolección antes (Ri) y después (Ev) de la adición de amígdalina. En el experimento IIA (B), las preferencias por los pólenes se evaluaron en la estación (Ri, Ev1 y Ev2), permitiendo a las abejas su recolección e incorporación a la colmena durante la primera (Tr1) y la segunda fase de tratamiento (Tr2). En el experimento IIB (C), las preferencias se analizaron en la estación de recolección, mientras que se suministró polen dentro del nido durante la primera (Tr1) y la segunda fase (Tr2) de tratamiento. En Tr2, las recolectoras también recolectaron los pólenes en la estación y los incorporaron a la colmena. En el experimento III (D), la diversidad de los pólenes recogidos en

las trampas se midió antes (Ri) y después (Ev) de que el polen de flor amarilla se ofreciera adulterado, sin adulterar o no se ofreciera en el interior de la colmena. (E) Jaula de vuelo donde se realizaron los experimentos I y II. (F) Entorno agrícola donde se realizó el experimento III.

4.2.6. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en R (<https://www.r-project.org/>). Las diferencias en las elecciones de las recolectoras (proporciones) del experimento I se abordaron mediante un modelo lineal generalizado (MLG) y en el experimento II, las diferencias se abordaron mediante un modelo lineal generalizado mixto (MLGM), ambos experimentos con distribuciones binomiales (Crawley 2012). Los supuestos de los modelos se comprobaron con la librería DHARMA (<https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>) y la variación en el número de individuos analizados en cada evento se tuvo en cuenta mediante las ponderaciones. En el experimento I, se exploró el impacto del tratamiento (no adulterado y adulterado) como efecto fijo y añadimos las preferencias iniciales como covariable. En este caso, se utilizó la función `glm` del paquete Stats. En los experimentos IIA y IIB, se analizó el efecto del tratamiento (no adulterado y adulterado) y la evaluación (Ev1 y Ev2) como efectos fijos y su interacción. Se incluyó la colonia y el mes en que se estudió la colonia como factores aleatorios y las preferencias iniciales como covariable. En este caso, se utilizó la función `glmer` del paquete lme4 (<https://cran.r-project.org/package=lme4>), que utiliza las pruebas Z de Wald para aproximar los valores p de los MLGM (Bolker et al. 2009). Se realizaron contrastes *post hoc* en los modelos para evaluar los efectos y la significación entre factores fijos utilizando la función "emmeans" del paquete 'emmeans' versión 1.5 (<https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>) con un nivel de significación de 0,05.

Las diferencias en el índice de diversidad de Shannon (H) del experimento III, se evaluaron mediante modelos lineales generales (GLM) con distribución normal. Se exploró el efecto del tratamiento con polen (ausencia, no adulterado, adulterado) y se utilizaron las respuestas iniciales como covariable. Se comprobaron los supuestos de homocedasticidad y normalidad (pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente). Se utilizaron las pruebas de Tukey para los contrastes utilizando el paquete multcomp en R (Hothorn et al. 2008).

4.3. Resultados

4.3.1. Experimento I: Evaluación de las preferencias de las recolectoras por el polen no adulterado frente al adulterado con amigdalina en la fuente de alimento.

Las colonias no cambiaron sus preferencias de recolección cuando se añadió amigdalina al polen en el alimentador. Así, los resultados mostraron que las preferencias de las recolectoras expuestas al polen adulterado ($0,567 \pm 0,025$) o no adulterado ($0,586 \pm 0,026$) fueron similares (Tratamientos: $\text{Chiq} = 0,291$, $\text{df} = 1$, $P = 0,590$; Fig. 4.2).

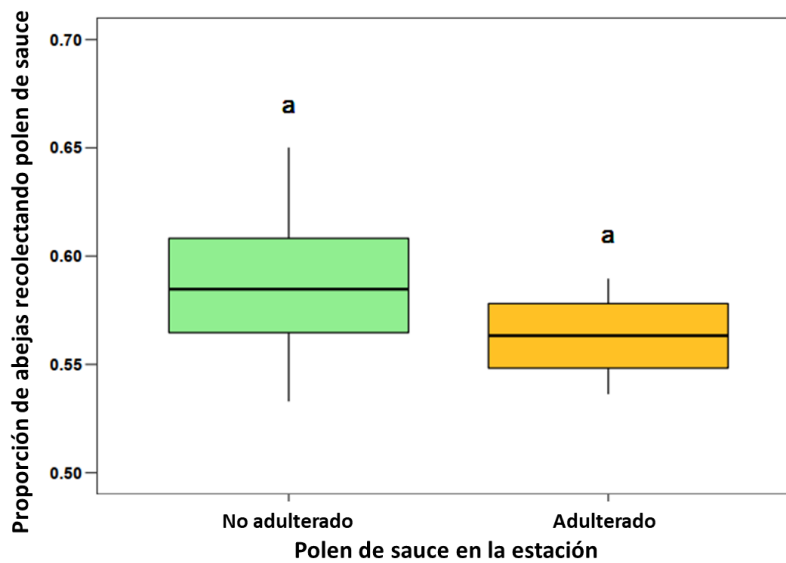


Figura 4.2. Preferencias de recolección por polen adulterado o no adulterado. Las preferencias por el polen de sauce y quebracho se establecieron presentando polen de sauce adulterado o sin adulterar en la estación de recolección. Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre las colonias expuestas al polen de sauce adulterado ($N = 4$) o no adulterado ($N = 4$).

4.3.2. Experimento II: Evaluación de las preferencias de las recolectoras tras la incorporación de polen adulterado con amigdalina dentro de la colmena.

Las colonias redujeron significativamente sus preferencias de forrajeo por el polen que se había ofrecido adulterado en el interior del nido, tanto si era incorporado por las

recolectoras (exp. IIA; Tratamiento*Tiempo Chisq = 12,606, df = 1, $P < 0,001$; Fig. 4.3A) como si era presentado directamente en el interior del nido (exp. IIB, Tratamiento: Chisq = 17,999, df = 1, $P < 0,001$; Tratamiento*Prueba: Chisq = 0,076, df = 1, $P = 0,782$; Fig. 4.3B). Ambos experimentos (IIA y IIB) mostraron resultados similares para Ev1. En el experimento IIA, las colonias tratadas con amigdalina mostraron una menor preferencia por el polen de sauce (adulterado: $0,479 \pm 0,049$, $N = 4$) que las colonias que habían recibido el mismo polen no adulterado ($0,682 \pm 0,043$, $N = 4$) (no adulterado - adulterado: z-ratio = 3,023, $P = 0,003$). Del mismo modo, en el experimento IIB, las abejas de las colonias tratadas con amigdalina eligieron menos polen de colza (adulterado: $0,255 \pm 0,049$, $N = 4$) que los controles (no adulterado: $0,459 \pm 0,055$, $N = 4$) (no adulterado - adulterado: z-ratio = 3,387, $P < 0,001$).

Los resultados de los experimentos IIA y IIB sí difirieron en el evento de evaluación Ev2. En el experimento IIA, en el que las forrajeras pasaron de recolectar polen de sauce adulterado a recolectar sauce no adulterado, las diferencias entre el grupo tratado y el control se perdieron (adulterado: $0,565 \pm 0,049$; sin adulterar: $0,523 \pm 0,050$; no adulterado - adulterado: z-ratio = -0,608, $P = 0,543$). Por el contrario, cuando se dejó que las recolectoras incorporaran polen de colza no adulterado mientras que aún se les ofrecía el mismo polen adulterado dentro de la colmena (experimento IIB), la preferencia por el polen de colza siguió siendo menor en el grupo tratado que en el control (sin adulterar: $0,495 \pm 0,062$; adulterado: $0,265 \pm 0,049$; no adulterado - adulterado: relación z = 3,405, $P < 0,001$).

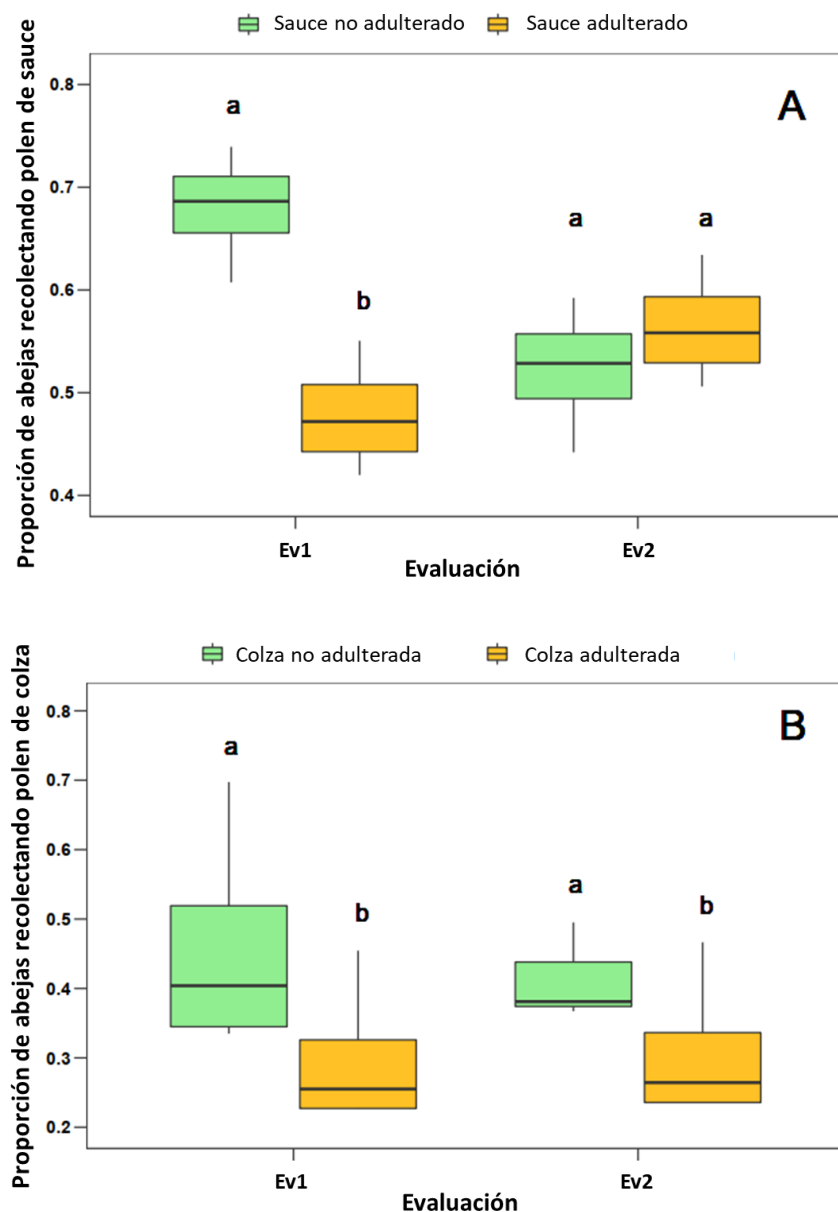


Figura 4.3. Preferencias de recolección de las colonias tratadas con polen adulterado o no adulterado. **A)** Las preferencias por los pólenes de sauce y quebracho se establecieron dos días después de que las recolectoras incorporaran el polen de sauce adulterado o no adulterado dentro del nido (Ev1) o el día 4 (Ev2), dos días después de que las recolectoras incorporaran el polen de sauce no adulterado. Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las colonias que experimentaron polen no adulterado ($N = 4$) o adulterado ($N = 4$). **B)** Las preferencias por los pólenes de colza y flor amarilla se establecieron dos días después de que el polen de colza adulterado

o no adulterado se ofreciera en el interior del nido (Ev1) o en el día 4 (Ev2), dos días después de que las recolectoras incorporaran el polen de colza no adulterado de forma natural mientras que el polen de colza adulterado o no adulterado se continuaba ofreciendo artificialmente en el interior de la colmena. Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las colonias que experimentaron polen no adulterado ($N = 4$) o adulterado ($N = 4$).

4.3.3. Experimento III: Evaluación de la selección del polen tras la oferta de polen adulterado con amigdalina en el interior de la colmena.

Las colonias mostraron diferencias en la selección de los pólenes recolectados luego del tratamiento (Tratamientos: $F_{2;17} = 4,671$, $df = 2$, $P = 0,024$; Fig. 4.4). Las colonias que no recibieron polen mostraron índices H bajos (ausencia: $1,1 \pm 0,29$, $N = 6$), mientras que las colonias que recibieron polen adulterado mostraron índices con los valores más altos ($1,88 \pm 0,5$, $N = 8$). Se observaron valores intermedios de diversidad en las colonias que recibieron polen no adulterado ($1,43 \pm 0,59$, $N = 7$). El análisis estadístico detectó diferencias significativas en el índice H entre las colonias tratadas con polen adulterado y las colonias sin polen añadido (adulterado - ausencia: $t\text{-ratio} = -2,584$, $P = 0,048$), pero no entre las colonias sin polen añadido y las colonias suministradas con polen no adulterado (ausencia - no adulterado: $t\text{-ratio} = -0,976$, $P = 0,601$) o entre las colonias suministradas con polen no adulterado y adulterado con amigdalina (no adulterado - adulterado: $t\text{-ratio} = -1,725$, $P = 0,225$). Por otro lado, no se detectaron cambios en el peso total de las muestras de polen cosechadas en las colonias tratadas sin polen, con polen adulterado, o con polen no adulterado (Tratamientos: $F_{2;17} = 1,274$, $df = 2$, $P = 0,303$; Fig. 4.5), lo que sugiere que la actividad de recolección de polen no cambió tras el ofrecimiento de un polen de baja calidad (ausencia - no adulterado: $t\text{-ratio} = -0,233$, $df = 18$, $P = 0,970$; ausencia - adulterado: $t\text{-ratio} = 1,329$, $df = 18$, $P = 0,398$; no adulterado - adulterado: $t\text{-ratio} = 1,600$, $df = 18$, $P = 0,271$).

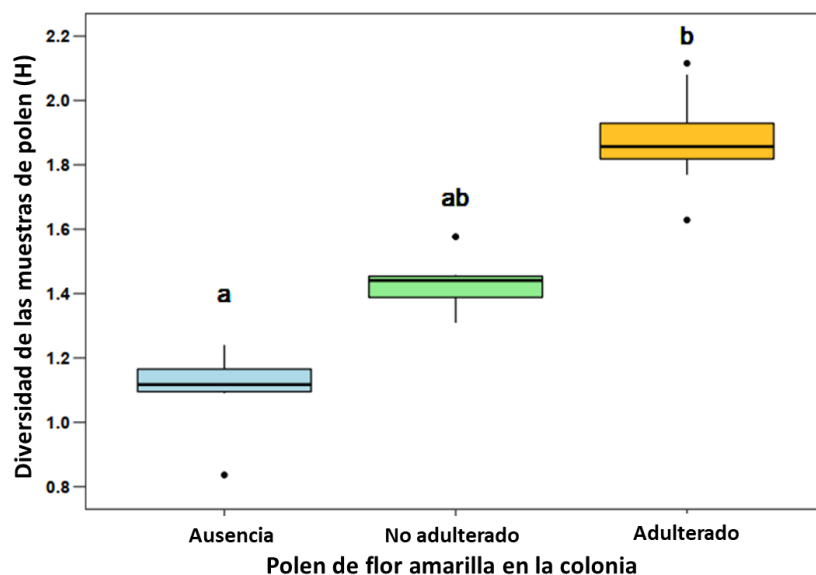


Figura 4.4. Diversidad del polen recolectado en colonias tratadas con polen no adulterado, adulterado o sin polen. El índice de diversidad de Shannon (H) se calculó después de que las colonias recibieran polen de flor amarilla no adulterado (N = 7) o adulterado (N = 8) incorporado en el interior del nido, o no recibieran polen adicional (ausencia; N = 6). Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

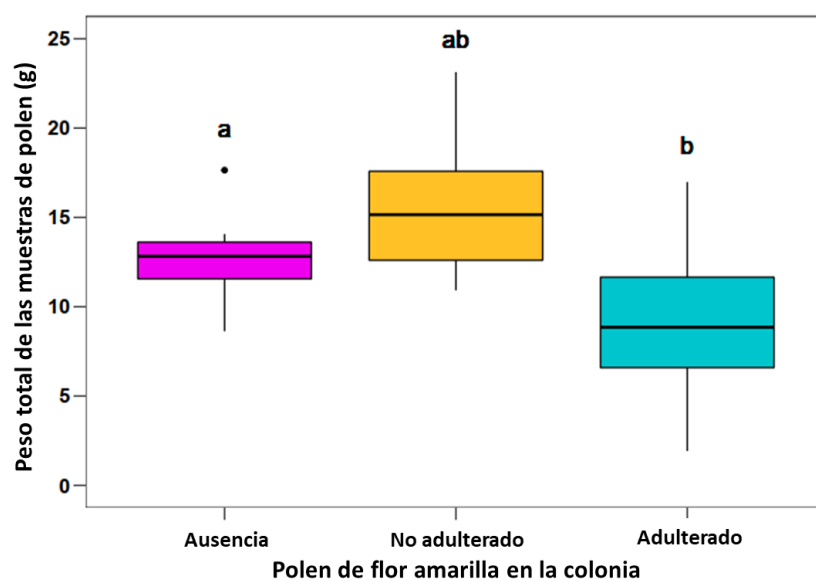


Figura 4.5. Peso total de las muestras del polen recolectado en colonias tratadas sin polen, con polen de flor amarilla sin adulterar o adulterado. Las muestras de polen se recogieron en las trampas instaladas en las colonias durante 4 horas dos días después del tratamiento. Las colonias recibieron dentro de la colmena: i) ningún polen (ausencia; N = 7); ii) polen de flor amarilla no adulterado (no adulterado; N = 7); o iii) polen de flor amarilla adulterado con amigdalina (adulterado; N = 8). Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

4.4. Discusión

En el presente capítulo se estudió cómo las colonias de abejas melíferas responden frente a la presencia de compuestos nocivos en el polen. Por un lado, se observó que las recolectoras no rechazan el agregado de un compuesto nocivo como la amigdalina en la fuente de polen. Por otro lado, la oferta de polen adulterado con amigdalina dentro de la colmena fue suficiente para cambiar las preferencias de recolección de la colonia. Así pues, las recolectoras pueden tomar decisiones que no se basan únicamente en la percepción del recurso en la fuente, sino en la información relacionada con el recurso adquirida en el interior de la colmena. La evitación retardada de pólenes de baja calidad podría ser un proceso adaptativo para la colonia que evita que las forrajeras recolecten y acumulen recursos que, aunque no pueden percibir como nocivos, lo son para las abejas jóvenes y las larvas.

El impacto de las experiencias en el nido sobre las respuestas de recolección ha sido bien documentado entre los insectos sociales, incluidas las abejas melíferas (por ejemplo, Farina et al. 2020), abejas sin aguijón (Mc Cabe y Farina 2009), abejorros (Dornhaus y Chittka 1999), chaqueta amarilla (Jandt y Jeanne 2005); y colonias de hormigas (Arenas y Roces 2017), tanto en contextos apetitivos (Arenas et al. 2007, 2008) como aversivos (Arenas y Roces 2016a, 2017). En el presente capítulo, se amplió el conocimiento de los comportamientos que están influenciados por las experiencias en el nido, mostrando que la incorporación de polen de mala calidad afecta la recolección de polen.

4.4.1. Efecto de la amigdalina: ¿Rechazo espontáneo o rechazo retardado?

La composición del polen es variable según su origen botánico y algunos contienen niveles bajos de proteínas y/o carecen de nutrientes esenciales (Herbert et al. 1970, Wille et al. 1985, Roulston et al. 2000, Rasmont et al. 2005, Somerville y Nicol 2006, Weiner et al. 2010). Por lo tanto, se esperaba que la recolección esté sesgada hacia el polen con mayor valor nutritivo para la colonia. Sin embargo, se han observado preferencias por el polen rico en proteínas en otras especies de abejas (Vaudo et al. 2016), pero en menor medida en la abeja melífera (Solberg y Remedios 1980, Schmidt 1984, van der Moezel et al. 1987, Pernal y Currie 2001, Pernal y Currie 2002, Leonhardt y Blüthgen 2012, Ruedenauer et al. 2015, Beekman et al. 2016). Como se esperaba aquí, las recolectoras de *A. mellifera* fueron incapaces de rechazar espontáneamente la amigdalina en la estación de recolección, tanto cuando las abejas recolectaban polen finamente triturado (es decir, en polvo; experimento I) como en presencia de polen hidratado y en distintas combinaciones de a pares (Fig. A4.1).

Si bien no hay dudas de la participación del gusto en el proceso de evaluación del polen por parte de las recolectoras, aún no se sabe con exactitud si las abejas están equipadas con receptores gustativos capaces de detectar pre-ingestivamente ciertos compuestos del recurso. En la abeja se han descrito hasta el momento alrededor de 12 receptores gustativos con los que podrían detectar aminoácidos libres, proteínas cortas y lípidos (Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006, Robertson y Wanner 2006, Lim et al. 2019). Este número contrasta fuertemente con, por ejemplo, los 25 receptores gustativos con los que está provisto el abejorro (Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006, Robertson y Wanner 2006, Sadd et al. 2015, Lim et al. 2019), que, a diferencia de la abeja melífera, ha demostrado tener la capacidad de responder frente a cambios en el contenido nutricional de las fuentes de polen (Levin y Bohart 1955, Standifer 1967, Schmidt 1982, Roulston et al. 2000, Ruedenauer et al. 2015). En este escenario, la regulación de la recolección de polen mediante la retroalimentación de la colonia encaja bien en *A. mellifera* y es menos probable en colonias de abejorros, donde las interacciones entre las obreras en el nido y las recolectoras son menos frecuentes (Goulson 2003).

La falta de preferencias en el experimento I, también es coherente con trabajos previos que muestran que las abejas no pueden distinguir entre una solución azucarada adulterada con amigdalina y una solución azucarada no adulterada de forma inmediata

(Wright et al. 2010), aunque si de forma retardada, posiblemente, a través de los efectos del consumo del alimento adulterado. La idea de que la amigdalina provoca malestar tras la ingestión se propuso al observar que una solución de azúcar adulterada que actúa como recompensa, empeora el desempeño de las abejas hacia el final de un condicionamiento olfativo (Wright et al. 2010). Más evidencia procede de que las abejas disminuyen su nivel de respuesta al olor aprendido tras asociar la recompensa de azúcar con una solución acuosa de amigdalina (Ayestaran et al. 2010). Por lo tanto, los cambios en las preferencias de recolección tras la incorporación de polen adulterado al nido podrían implicar el aprendizaje de claves del polen con las consecuencias negativas y retardadas de consumir amigdalina.

4.4.2. Diversificación de los pólenes recolectados como respuesta de la colonia frente a recursos inadecuados.

La hipótesis de que la toma de decisiones sobre el polen está influenciada por el acceso a la información sobre los diferentes recursos que se procesan en el nido, está respaldada por un experimento adicional con colonias privadas de la incorporación de polen durante 3 días consecutivos (Fig. A4.2 en anexo). Utilizando colmenas con trampas de polen permanentes que fueron alimentadas con suplementos proteicos artificiales, se observó una disminución de la diversidad de pólenes recolectados en comparación con las colonias que incorporaron polen libremente (Fig. A4.2). Se especula que la falta de información sobre los diferentes pólenes dentro del nido llevó a las recolectoras a elegir los recursos basándose en sus preferencias innatas por las claves del polen, más que por cómo impactó el polen sobre el estado nutricional de la colonia.

Las recolectoras de colonias a las que se suministró polen adulterado con amigdalina (experimento III) mostraron un cambio hacia la diversificación de las fuentes de polen. Este hallazgo es coherente con la evidencia de que las colonias expuestas a pólenes pobres en contenido proteico, carentes de nutrientes esenciales y/o que contienen toxinas, aumentan la diversidad de tipos de polen que recolectan (Di Pasquale et al. 2013, 2016), probablemente como estrategia para diluir el efecto del polen inadecuado. Así también, las respuestas de las colonias a los déficits nutricionales incluyen la elección de pólenes con nutrientes complementarios (Hendriksma y Shafir 2016, Zarchin et al. 2017). La diversificación podría lograrse mediante la reasignación de las recolectoras a nuevos

recursos, probablemente inducida por la respuesta de evitación a pólenes que habían sido considerados inadecuados dentro de la colmena. La evidencia de que la actividad de recolección de polen no cambió tras el ofrecimiento de un polen de baja calidad (Fig. 4.5), descarta que la diversificación se deba a un aumento generalizado de la actividad que permita la incorporación de polen de especies florales menos representadas en la dieta de la colonia debido a una mejor exploración/explotación del entorno.

En un intento de medir los cambios en la proporción de polen de flor amarilla recolectado por las colmenas tras ser ofrecido adulterado dentro de las mismas, se observaron importantes fluctuaciones en la disponibilidad de este polen que impidieron detectar cualquier efecto entre los tratamientos. La flor amarilla fue abundante durante el primer día del experimento (28 de enero de 2021), sin embargo, su disponibilidad disminuyó durante los días siguientes (31 de enero en adelante), resultando en una baja representatividad del polen de flor amarilla en las muestras de todos los tratamientos (Fig. A4.3 en anexo). Curiosamente, un estudio preliminar realizado en 2020 (del 11 al 15 de enero), donde la flor amarilla fue abundante durante todo el periodo experimental, reveló que las colonias tratadas con este polen adulterado con amigdalina mostraron una reducción en las proporciones de polen de flor amarilla recolectado en comparación con las colonias control (Fig. A4.3 en anexo). En la temporada 2020, las colonias tratadas que recolectaron menos polen de flor amarilla también mostraron una disminución en la diversidad de las muestras de polen recolectadas (Fig. A4.4 en anexo). Esto sugiere que, a pesar de las diferencias en las condiciones experimentales entre el experimento II (sólo dos pólenes disponibles dentro de una jaula de vuelo) y el experimento III (las colmenas recolectando libremente en el campo), la respuesta de las colonias frente al polen de baja calidad fue la misma.

La idea de que las colmenas responden a la incorporación de un recurso inadecuado aumentando la diversidad de los pólenes recolectados, se complementó utilizando un tercer grupo de colonias tratadas con polen adulterado con quinina (Fig. A4.4 en anexo), un alcaloide natural de sabor amargo que las abejas detectan (y rechazan) antes de la ingestión (Wright et al. 2010). Así, se confirmó que los cambios en los patrones de selección del polen no sólo se producen con el polen adulterado con amigdalina, sino que se extienden a los

pólenes adulterados con otros compuestos aversivos que pueden actuar antes o después de la ingestión.

4.4.3. *¿Cómo aprenden las recolectoras la calidad del polen dentro del nido?*

Los resultados de este capítulo destacan la importancia de las experiencias mediadas por los recursos dentro del entorno social de la colmena y van más allá, sugiriendo que el aprendizaje social participa en la selección de recursos cuyos constituyentes no pueden ser percibidos en la fuente de alimento. A partir de esto, se plantea la pregunta de cómo podrían aprender las recolectoras sobre la calidad del polen. Por un lado, las recolectoras podrían evaluar los constituyentes de los recursos a partir de pólenes parcialmente digeridos que están disponibles en las celdas que inspeccionan antes y después de sus viajes de recolección (Dreller et al. 1999, Dreller y Tarpy 2000). Otra posibilidad es que las recolectoras aprendan sobre la calidad del polen, no a partir del recurso en sí (ni en la fuente de alimento, ni dentro de la colmena), sino a través de las interacciones con las nodrizas o de los cambios que éstas generan en el nido. Estos y otros mecanismos serán estudiados en el próximo capítulo.

MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE INFORMACIÓN RELATIVA A LA CALIDAD DEL POLEN EN LAS COLMENAS

5.1. Introducción

Las respuestas comportamentales a nivel de colonia suelen ser el resultado de la respuesta de muchos individuos ante un estímulo que aporta información local (Bonabeau et al. 1997, Gordon 1999, Seeley 2009). La información entre los compañeros de nido se transfiere a través de diferentes modalidades sensoriales. Entre las modalidades más estudiadas se encuentran las quimiosensoriales y táctiles que se pueden transferir de forma inadvertida (claves) o a través de rasgos específicamente moldeados por la selección natural (señales). Por ejemplo, la propagación de claves gustativas y olfativas durante la distribución de alimento líquido dentro de la colmena brinda información sobre los recursos explotados en el exterior (Farina et al. 2005, Grüter et al. 2006, 2008, Ramírez et al. 2010). Esto permite a las obreras que no participan directamente en la recolección obtener información de las fuentes y recursos (Grüter et al. 2006, 2009). Por ejemplo, luego de incorporar al nido soluciones aromatizadas de azúcar de distinta calidad, se vio que tanto las recolectoras como abejas más jóvenes receptoras y nodrizas, aprenden mejor el olor asociado al alimento de mayor calidad (Grüter et al. 2006). Además del aprendizaje que tiene lugar durante la circulación del alimento, las claves olfativas se pueden aprender desde las reservas del nido (von Frisch 1923, Wenner et al. 1969, Free 1969, Grüter et al. 2009), o incluso desde el alimento ofrecido experimentalmente en el interior de la colmena (Arenas et al. 2007, 2008, revisión de Farina et al. 2023).

Las obreras también pueden aprender de manera asociativa aquellos alimentos que tienen un efecto negativo para el desarrollo de la colonia. En hormigas cortadoras de hojas

se observa un comportamiento denominado evitación retardada por el cual las obreras evitan los recursos nocivos que afectan el crecimiento de su hongo simbiote (Arenas y Roces 2016a, 2016b, 2017). Tanto las obreras recolectoras como las jardineras y las basureras mostraron comportamientos de evitación hacia los recursos inadecuados (Arenas y Roces 2016a). Las jardineras responden a las plantas inadecuadas interrumpiendo el procesamiento de las hojas y desechando este material en los basureros del nido (Arenas y Roces 2016a). A partir de las claves específicas presentes en el basurero, las recolectoras pueden aprender a evitar las plantas que son nocivas para el hongo (Arenas y Roces 2016b, 2017).

En la abeja melífera, aún se desconoce el mecanismo por el cual las claves de pólenes adulterados desalientan su recolección. Por un lado, las claves podrían actuar directamente sobre las recolectoras adquiriendo información por sí mismas de los recursos que están siendo procesados en el nido, así como del estado interno de la colonia. Las recolectoras de polen podrían relevar el balance cría-reserva al inspeccionar las celdas con reservas de polen y de las larvas (Pankiw et al. 1998, Vaughan y Calderone 1998, Dreller et al. 1999, Dreller y Tarpy 2000). Bajo esta hipótesis sería necesario que las recolectoras puedan evaluar y discriminar entre las claves específicas de cada polen y asociarlas, por ejemplo, a un mal estado nutricional o de salud de la cría. Por otro lado, las recolectoras podrían adquirir la información de forma indirecta a través de claves que están presentes en la jalea proteica que distribuyen las nodrizas (Camazine 1993, Camazine et al. 1998, Nicholls et al. 2017). Así, cuando una colonia dispone de abundantes reservas de polen, las abejas jóvenes suministran más alimento proteínico a las maduras lo que inhibe la recolección de polen. Bajo esta hipótesis sería necesario que, en la trofalaxia, además del contenido proteico, se compartan claves especie-específicas del recurso que brinden información sobre la calidad de los pólenes que se están consumiendo en el nido.

Además de la transferencia de información a partir de la evaluación de claves incidentales del alimento existen otras interacciones que podrían transmitir información sobre las condiciones del nido que no dependen de la utilización de claves como intermediarios. En este sentido, no se descarta la posibilidad de que las nodrizas que experimentaron y aprendieron sobre la calidad de ciertos pólenes puedan transmitir dicha información a través de interacciones con las recolectoras. Como ejemplo de estas

interacciones se puede mencionar a la antenación, cuya frecuencia y número de contactos puede ser modulada por las necesidades nutricionales de la colonia y la calidad de las fuentes de alimento (McCabe et al. 2006, Mailleux et al. 2011).

Además de las experiencias asociativas que ocurren en el interior de la colonia (Menzel 1999), las claves olfativas pueden también aprenderse de manera no asociativa. Se observó, por ejemplo, que la exposición a volátiles no asociados a una recompensa específica inducía respuestas de evitación entre las recolectoras (Arenas et al. 2008). Este resultado fue explicado en términos de la inhibición latente (una forma de aprendizaje no asociativo en el que la repetida exposición a un único estímulo retrasa la posibilidad de que este adquiera un valor predictivo sobre la recompensa; Abramson y Bitterman 1986, Chandra et al. 2000). En este escenario, la inhibición latente frente a olores emanados desde las reservas de polen podría indicar fuentes de alimento que fueron explotadas en el pasado pero que ya no están disponibles en el exterior ni circulan en el interior del nido. En el mismo sentido, se planteó que la presencia de volátiles de ciertos pólenes que han sido rechazados por las nodrizas y se acumularon en las reservas del nido, podrían afectar las preferencias de las recolectoras en el campo tras haber sido aprendidos de forma latente en el entorno del nido. Las hipótesis planteadas no son mutuamente excluyentes y proveen un marco para el estudio de los mecanismos de evaluación y regulación de la calidad del polen en las colonias de la abeja melífera.

Conociendo hasta acá que la elección de pólenes que realizan las abejas jóvenes y recolectoras es diferente, que las jóvenes aprenden los pólenes de distinta calidad luego de consumirlos, y que las recolectoras los aprenden luego de que sean incorporados al nido (no así en las fuentes), en el presente capítulo se propone investigar los mecanismos que permiten la transferencia de información relativa a la calidad del polen en el interior del nido entre abejas jóvenes y recolectoras. Se plantea como hipótesis general que el mecanismo por el cual las recolectoras ajustan su elección de polen depende de la participación de las abejas jóvenes.

En los primeros tres experimentos se estudió la importancia de las experiencias con polen “procesado” para sesgar las preferencias de las recolectoras. Se plantean como hipótesis que las recolectoras adquieren información directamente del polen procesado (experimento I); las abejas jóvenes con acceso al polen procesado transfieren la información

de la calidad del polen a las recolectoras (experimento II); las abejas nodrizas que experimentaron el polen adulterado transfieren la información de su calidad a las recolectoras en ausencia de las claves del polen adulterado (experimento III). En los experimentos en que las recolectoras eviten recolectar el polen en la estación de forrajeo (el polen que fue previamente adulterado cuando se ofreció procesado), las hipótesis particulares no serán rechazadas. Finalmente, en el experimento IV, se realizó una aproximación hacia el rol de los volátiles del polen dentro de la colmena sobre las preferencias de las recolectoras. Se plantea que el aumento en la intensidad de los volátiles de aquel polen que es evitado por las nodrizas brinda información incidental sobre la calidad del polen. Se predice entonces, que las recolectoras mostrarán una disminución en la elección del polen evitado por las nodrizas cuyos volátiles se concentran y aromatizan el interior del nido.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Experimento I: Adquisición de información del polen en recolectoras aisladas a través del recurso “procesado”.

Con el fin de investigar si las recolectoras pueden, por sí mismas y de manera directa, adquirir la información relativa a la calidad del polen, se realizó un primer experimento (Fig. 5.1A) en el que medimos las preferencias iniciales (R_i) de colonias confinadas en jaulas de vuelo por dos pólenes ofrecidos en la estación de forrajeo (colza y flor amarilla). Las abejas que aterrizaban y comenzaban a manipular el polen de uno u otro alimentador, eran marcadas con color obteniendo una muestra de la población de recolectoras. La captura y marcado de las recolectoras se extendió por 2-3 horas. Las recolectoras capturadas ya marcadas, se confinaron en cajas de madera de 10x10x10 cm las que se mantuvieron en el interior de la colmena original (Fig. 5.1B), cada una con un alimentador que proveía solución azucarada 50% (tubo de 20 ml con un orificio en la punta) y 2 alimentadores de polen (jeringas de 5 ml cortadas). En la primera serie experimental (*serie colza*), las abejas confinadas recibieron 4 ml de polen de flor amarilla sin adulterar y 4 ml de colza adulterado con amigdalina (0,1 M). En la segunda serie (*serie flor amarilla*), un segundo grupo de cajas recibieron polen de colza sin adulterar y el de flor amarilla

adulterado con amigdalina. Luego de permanecer en el interior de las colmenas por 24 horas (tratamiento: Tr), las abejas en confinamiento fueron liberadas en la entrada del nido con la intención de que muchas de ellas vuelven a retomar la tarea de recolección y puedan ser evaluadas al día siguiente en la estación de forrajeo. El tiempo aproximadamente desde el inicio de la medición inicial y el inicio de la evaluación (Ev) fue de 48 horas. En la estación de forrajeo medimos las preferencias por los pólenes ofrecidos tanto en las recolectoras marcadas (las que estuvieron expuestas a los pólenes en las cajas) como de sus compañeras no marcadas, las que permanecieron naïve para el polen adulterado. De esta manera pudimos comparar: i) recolectoras marcadas en Ri versus recolectoras marcadas en Ev; ii) recolectoras marcadas en Ev versus recolectoras sin marcas en Ev. En esta última comparación incluimos a las abejas marcadas en Ri como covariable del modelo (ver sección 5.2.5).

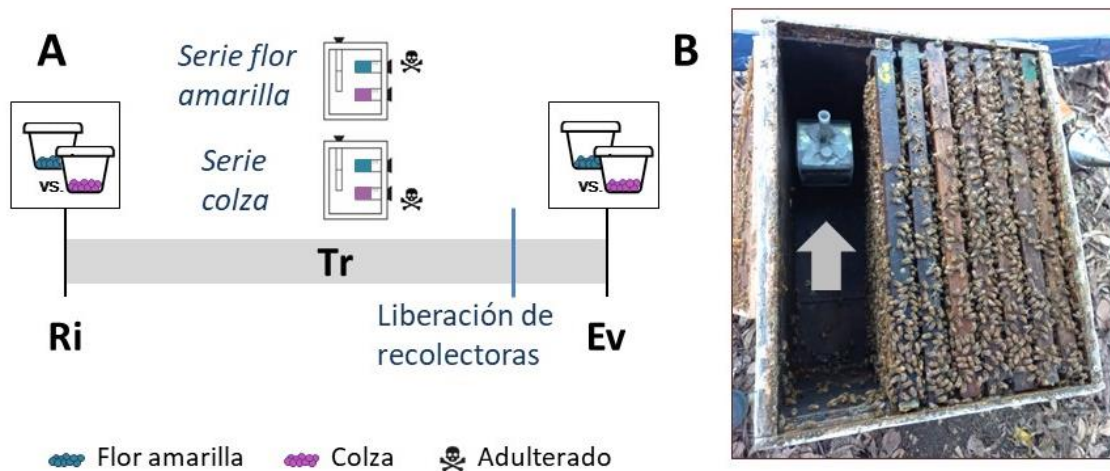


Figura 5.1. Procedimiento seguido en el experimento I. **A)** Esquema de las fases del experimento I (preferencia de recolección inicial: Ri; tratamiento: Tr; evaluación: Ev) y los pólenes ofrecidos en la estación o en las cajas (adulterado o no según la serie). **B)** Caja de 10x10x10 cm "incubada" en el interior de la colmena dentro de la jaula de vuelo, durante el tratamiento (Tr).

5.2.2. Experimento II: Adquisición de información del polen en recolectoras a través de abejas jóvenes con acceso al recurso.

Con el objetivo de evaluar si el cambio en las preferencias de recolección está mediado por las interacciones que puedan ocurrir entre las abejas recolectoras, las jóvenes y el polen ofrecido adulterado, se realizó un segundo experimento en el que se confinaron abejas jóvenes en edad de nodrizas junto con abejas recolectoras que habían sido marcadas y capturadas como en el experimento anterior (5.2.1). En este caso, la estación de forrajeo que visitaron las recolectoras presentaba pólenes de quebracho (*Schinopsis lorentzii*) y flor amarilla (Fig. 5.2A).

Las abejas jóvenes se obtuvieron desde un cuadro de cría sellada, de la misma forma que en experimentos anteriores en esta tesis (sección 2.2.1). Durante dos días, las cajas con abejas recolectoras y jóvenes juntas se mantuvieron en una incubadora en el laboratorio y fueron expuestas a los dos pólenes utilizados. En una primera serie (*serie flor amarilla*), las cajas de abejas recibieron polen de flor amarilla adulterado mientras que, en la segunda serie (*serie quebracho*), el polen adulterado fue el de quebracho. En este experimento los pólenes se ofrecieron dentro de celdas de una sección de panal de 10x8x2 cm que se colocó en la caja antes de la incorporación de las abejas (Fig. 5.2B). Luego del tratamiento (Tr: 48 horas), las abejas confinadas (jóvenes y recolectoras) fueron liberadas en la entrada de la colmena. Entre 19 y 21 horas después de la liberación, se evaluaron las preferencias de las recolectoras marcadas por ambos pólenes no adulterados en la estación (Ev). Al igual que en 5.2.1, también medimos las preferencias de recolectoras que no tenían marcas, es decir de recolectoras naïve para los pólenes evaluados.

que recolecten e incorporen estos pólenes a las reservas de la colmena para luego medir nuevamente las preferencias de la población de abejas marcadas (Ev2).

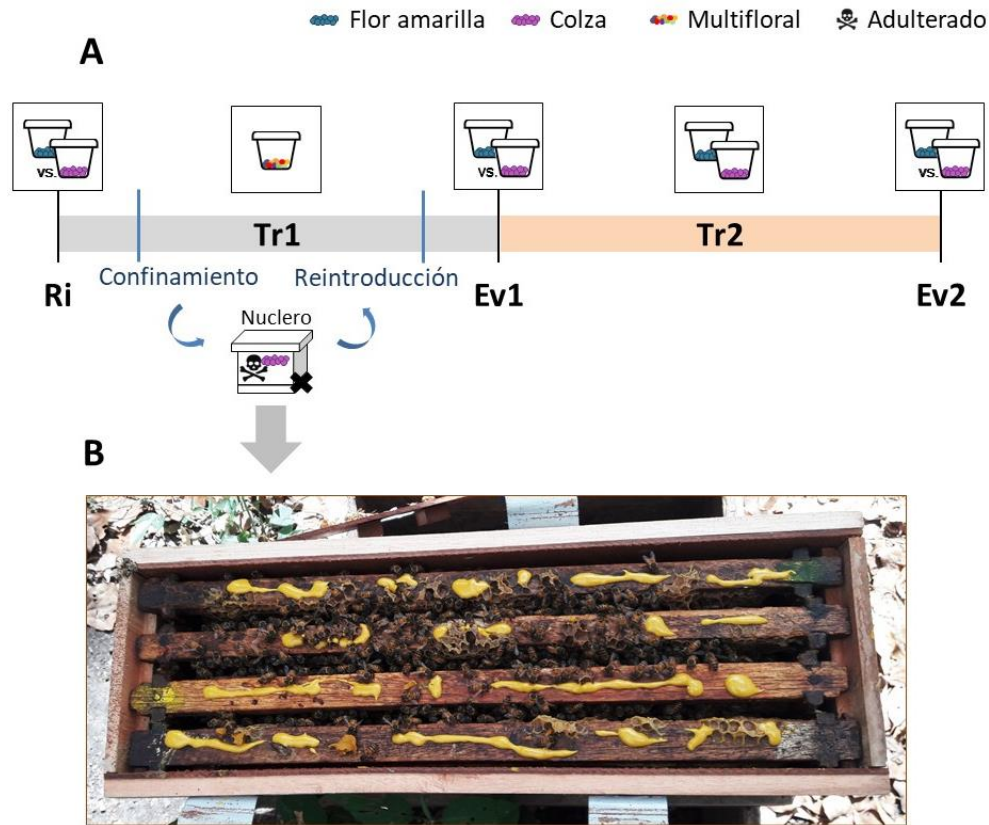


Figura 5.3. Procedimiento seguido para el experimento III. **A)** Esquema de las fases del experimento III (preferencia de recolección inicial: Ri; tratamiento 1: Tr1; evaluación 1: Ev1; tratamiento 2: Tr2; evaluación 2: Ev2) y los pólenes ofrecidos en la estación. En Tr1 se retiraron los cuadros de cría junto con las abejas presentes en la zona de cría de la colmena original y se colocaron en un nuclero cerrado (confinamiento). Luego de 48 horas se reincorporaron los cuadros junto con las abejas a la colmena original (reintroducción). **B)** Durante el confinamiento en Tr1, se les ofreció a las abejas aisladas polen de colza en forma de pasta adulterado con amigdalina (0,1M). De esta manera las abejas que permanecieron en la colmena original no experimentaron el polen adulterado.

5.2.4. Experimento IV: Rol de los volátiles del polen en el nido sobre las preferencias de las recolectoras.

Por último, para estudiar si los cambios en las decisiones de recolección están mediados por la adquisición de información relativa a los pólenes a través de modificaciones que ocurran en el interior del nido, se utilizaron colmenas confinadas en jaulas de vuelo. El procedimiento llevado a cabo pretendió recrear una situación en la que los pólenes menos adecuados, y por ende sus olores, se acumulan en el interior del nido. Al igual que en los experimentos anteriores, se registraron las elecciones iniciales de las abejas por recolectar los pólenes de quebracho y girasol (Ri; Fig. 5.4A). En la etapa de tratamiento (Tr1), se utilizaron bombas de aire de flujo continuo para introducir volátiles de polen de quebracho en la colonia. El flujo de aire ingresaba a la colmena por medio de una manguera introducida por la piquera (entrada de la colmena) hacia el interior (Fig. 5.4B). La manguera estaba conectada a una jeringa de 20 ml que contenía una muestra de polen de quebracho (Fig. 5.4B). Luego de 48 horas durante las cuales la bomba permaneció encendida, se interrumpió el flujo y se midieron las preferencias en la estación de forrajeo ofreciendo los dos pólenes experimentales (Ev1). Finalmente, se apagó la bomba y se esperaron 48 horas más durante las cuales estuvo disponible polen multifloral en la estación (Tr2) y se midieron nuevamente las preferencias (Ev2).

efectos fijos y su interacción, las preferencias iniciales (R_i) como covariable y la identidad de la colmena utilizada como efecto aleatorio. En un segundo análisis, se exploró el impacto de la serie y el evento de evaluación (R_i y Ev) como factores de efecto fijo, incorporando la colmena como factor de efecto aleatorio. En ambos casos, se agregó al modelo el “weight” como el número total de abejas que visitaron ambos alimentadores. En el experimento II, se evaluó el impacto de la exposición al polen adulterado (Naïve y Expuestas) como efecto fijo, y la identidad de la colmena como efecto aleatorio. Incluimos las preferencias iniciales como covariable y el número total de abejas como el “weight”. En el experimento III, se exploró el impacto del evento de evaluación (R_i , Ev_1 y Ev_2) como efecto fijo, la identidad de la colmena utilizada como variable de efectos aleatorios y el “weight”. En el experimento IV, se estudió el impacto del evento de evaluación (R_i , Ev_1 y Ev_2) como efecto fijo y la colmena como aleatorio. Una vez más, el “weight” fue el número total de abejas medidas.

Se utilizó la función “glmer” del paquete “lme4” (<https://cran.r-project.org/package=lme4>) que utiliza las pruebas Z de Wald para aproximar los valores p de los MLGM (Bolker et al. 2009). Se realizaron contrastes *post hoc* en los modelos para evaluar los efectos y la significación entre factores fijos utilizando la función “emmeans” del paquete ‘emmeans’ versión 1.5 (<https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>) con un nivel de significación de 0,05.

5.3. Resultados

5.3.1. Experimento I: Adquisición de información del polen en recolectoras aisladas a través del recurso “procesado”.

Se realizaron dos series experimentales, una donde se adulteró el polen de colza (*serie colza*; $N = 3$) y otra adulterando el polen de flor amarilla (*serie flor amarilla*; $N = 3$). Para ambas series, los resultados sugieren que las recolectoras por sí solas no pueden adquirir información directamente del polen. La probabilidad de recolección de polen de flor amarilla no se modificó significativamente, tanto cuando se comparó entre abejas previamente expuestas al polen adulterado y abejas naïve, como cuando se focalizó en las abejas expuestas al polen adulterado y se compararon sus preferencias iniciales (R_i) con las elecciones después del tratamiento (Ev). No se encontró un efecto significativo de la

interacción entre la exposición de las abejas y la serie experimental (Abejas*Serie: Chisq = 2,9142, Df = 1, P = 0,0878). La experiencia de las abejas por sí sola, no influyó en las elecciones de los pólenes en la fuente (Abejas: Chisq = 0,6379, Df = 1, P = 0,4245), mientras que tanto el factor Serie como la covariable de las preferencias iniciales, fueron significativas (Serie: Chisq = 5,8098, Df = 1, P = 0,0159; Ri: Chisq = 13,0717, Df = 1, P = 0,0003). Esto último indica una diferencia inicial en las elecciones de las recolectoras de distintas colmenas pertenecientes a las dos series que, luego del tratamiento que no modificó las elecciones, fueron igualmente distintas.

En la segunda comparación entre los eventos de evaluación (Ri y Ev) de cada serie, ninguno de los factores ni su interacción tuvieron un impacto en las elecciones de las recolectoras (Eventos de evaluación: Chisq = 0,2609, Df = 1, P = 0,6095; Serie: Chisq = 0,0209, Df = 1, P = 0,8850; Eventos*Serie: Chisq = 0,0065, Df = 1, P = 0,9357).

5.3.2. Experimento II: Adquisición de información del polen en recolectoras a través de abejas jóvenes con acceso al recurso.

Cuando las abejas jóvenes y recolectoras fueron aisladas en las cajas junto con el polen “procesado” de flor amarilla adulterado y de quebracho sin adulterar (*serie flor amarilla*), las abejas recolectoras cambiaron significativamente sus preferencias de recolección por los pólenes ofrecidos (sin adulterar) en la estación de forrajeo en relación con las preferencias registradas en las recolectoras naïve (Chisq = 3.9372, Df = 1, P = 0,04723; Fig. 5.5).

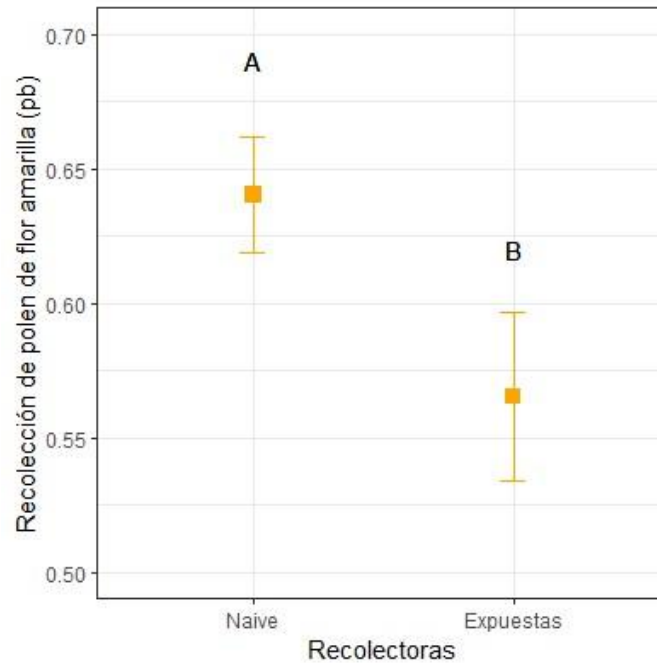


Figura 5.5. Probabilidad de recolección de polen de flor amarilla en abejas previamente expuestas a polen adulterado “procesado” comparadas con abejas naïve. Durante el tratamiento, se aislaron abejas jóvenes y recolectoras con polen de flor amarilla adulterado y polen de quebracho sin adulterar (*serie flor amarilla*; N cajas = 9). Para la evaluación, se registraron las preferencias de las recolectoras por el polen de flor amarilla (*número de abejas que recolectaron polen de flor amarilla/total de abejas que recolectaron de los dos pólenes sin adulterar en la estación de forrajeo*). Los cuadrados indican los valores medios (predichos por el modelo) y las barras los intervalos de confianza del 95%. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Se realizó una segunda serie experimental donde se adulteró el polen de quebracho (*serie quebracho*; N = 4), la cual no fue incluida en el análisis.

5.3.3. Experimento III: Adquisición de información relativa al polen a través de nodrizas con experiencia.

Las abejas recolectoras no cambiaron sus preferencias por los pólenes ofrecidos aún luego de interactuar con abejas jóvenes experimentadas, es decir que habían sido expuestas al polen de colza adulterado ($\text{Chisq} = 1,0067$, $\text{Df} = 2$, $P = 0,6045$; Fig. 5.6). Asumiendo que las abejas jóvenes aprendieron las características del polen adulterado (ver capítulo 3), no fueron capaces de transferir esta información a las abejas recolectoras. Esto ocurrió tanto en

el primer evento de evaluación, pocas horas después de haber reincorporado a las abejas jóvenes a la colmena original (Ri-Ev1: z-ratio = 0,095, P = 0,9951), como en el segundo evento de evaluación, cuando las colmenas ya habían incorporado polen de colza y de flor amarilla a las reservas (Ri-Ev2: z-ratio = 0,968, P = 0,5969). Tampoco se detectaron diferencias cuando se compararon las preferencias recolectoras entre las evaluaciones Ev1 y Ev2 (z-ratio = 0,776, P = 0,7179; Fig. 5.6).

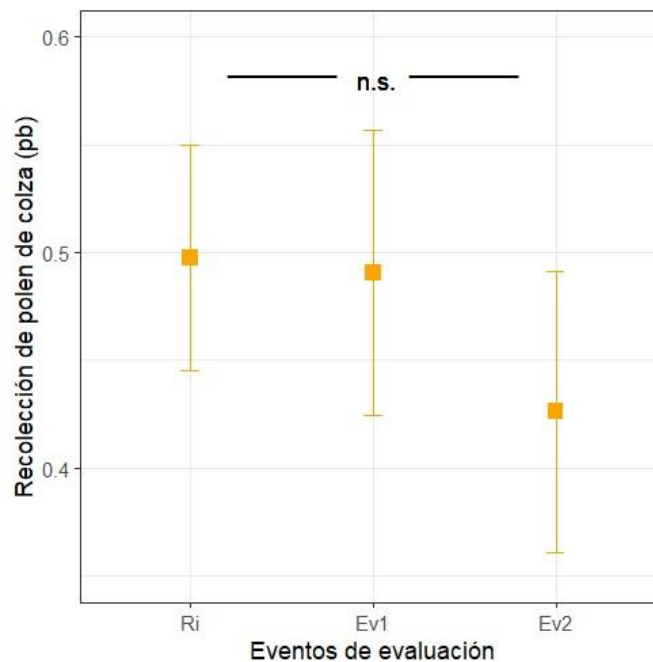


Figura 5.6. Probabilidad de recolección de polen de colza antes (Ri) y después (Ev1) de que las abejas jóvenes aisladas sean expuestas a polen adulterado “procesado”, y luego de que las recolectoras incorporen los pólenes sin adulterar de la estación a las reservas (Ev2; N colmenas = 4). En cada evento, se evaluaron las preferencias por recolectar polen de colza (*número de abejas que recolectaron polen de colza/total de abejas que recolectaron de los dos pólenes sin adulterar en la estación de forrajeo*). Los cuadrados indican los valores medios (predichos por el modelo) y las barras los intervalos de confianza del 95%. “n.s.” indica que no hay diferencias significativas (P > 0,05).

5.3.4. Experimento IV: Rol de los volátiles del polen en el nido sobre las preferencias de las recolectoras.

Las recolectoras cambiaron sus preferencias luego de que las colonias estuvieron expuestas a los volátiles de polen de quebracho (Chisq = 6,565, Df = 2, P = 0,037; Fig. 5.7). Contrariamente a lo esperado según la hipótesis planteada, tras recibir los volátiles del polen por 48 horas (Tr1), las abejas aumentaron significativamente sus preferencias por el polen de quebracho respecto a las preferencias iniciales (Ri-Ev1: z-ratio = -2,562, P = 0,028). Cuando los volátiles dejaron de ser bombeados al nido y las recolectoras volvieron a incorporar el polen multifloral ofrecido en la estación por 48 horas, las diferencias se perdieron tanto con respecto a las preferencias iniciales como a las aprendidas (Ri-Ev2: z-ratio = -1,181, P = 0,4647; Ev1-Ev2: z-ratio = 1,458, P = 0,3113; Fig. 5.7).

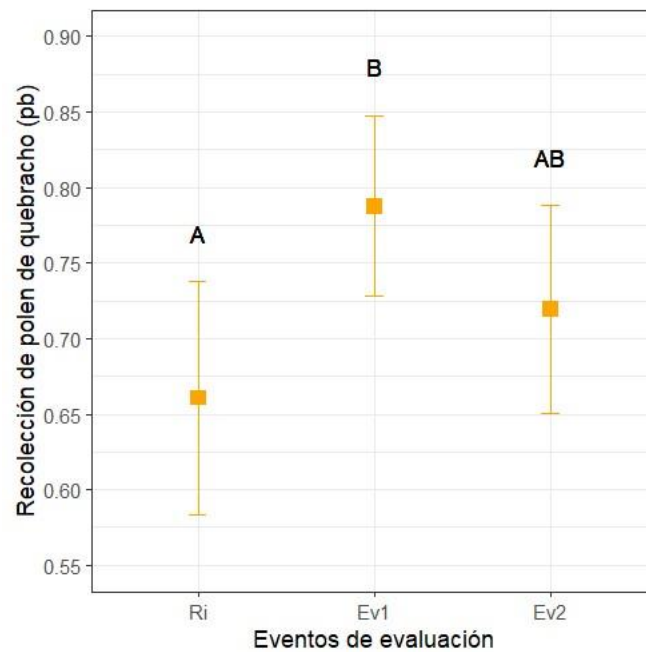


Figura 5.7. Probabilidad de recolección de polen de quebracho (*S. lorentzii*) antes (Ri) y después (Ev1) de que las colmenas (N = 4) sean expuestas a los volátiles del polen, y luego de que las recolectoras incorporen los pólenes de quebracho y girasol (*H. annuus*) ofrecidos en la estación a las reservas (Ev2). En cada evento, se evaluaron las preferencias de recolección por el polen de quebracho (número de abejas que recolectaron polen de quebracho/total de abejas que recolectaron de los dos pólenes en la estación de forrajeo). Los cuadrados indican los valores medios (predichos por el modelo) y las barras los intervalos de confianza del 95%. Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0,05).

5.4. Discusión

En el presente capítulo se indagó por los posibles mecanismos que podrían actuar en la transferencia de información relativa al polen en la colonia. Tomando en conjunto los resultados obtenidos, las preferencias de las recolectoras cambiaron únicamente cuando interactuaron con abejas jóvenes experimentadas mientras el polen “procesado” estuvo disponible para ambos grupos. Esto apoya la hipótesis de que la selección del polen depende de las experiencias de las abejas jóvenes, quienes pueden transferir la información sobre la calidad del recurso a las recolectoras a través de las claves especie-específicas de los pólenes presentes en las reservas del nido.

Tras evaluar la posibilidad de que la información se transfiera directamente desde el polen “procesado” (experimento I), se observó que las recolectoras por sí mismas, no fueron capaces de aprender sobre la calidad de los pólenes adulterados. Esto es consistente con la incapacidad de las recolectoras de aprender sobre la calidad del polen (ver Fig. 4.2 en capítulo 4), incluso cuando se lo ofrece “procesado” (hidratado) en la fuente (Fig. A4.1 en anexo del capítulo 4). A partir de los resultados, se descarta la posibilidad de que el compuesto que se usó para adulterar experimentalmente el polen (amigdalina) pueda ser evaluado de forma pre-ingestiva por las abejas maduras (sección 1.2.4.1). Como se pudo observar en los resultados del experimento II, la incorporación de obreras en edad de nodrizas permitió que las recolectoras sesgaran sus preferencias de recolección, evitando las fuentes de menor calidad. Entonces, las abejas jóvenes con acceso al polen “procesado” pudieron (de alguna manera) transferir la información de la calidad del polen a las recolectoras. Una posibilidad es que las obreras jóvenes hayan compartido claves específicas del polen adulterado junto con trazas de amigdalina (o alguno de los productos intermediarios de su catabolismo) las que, al cabo de un tiempo, podrían provocarles malestar a las propias recolectoras.

En el experimento III, en donde las recolectoras estuvieron en contacto con nodrizas experimentadas y el polen en cuestión no estuvo presente en el entorno, no se observó una evitación en la estación de forrajeo. Esto sugiere que el “sustrato”, es decir el polen y sus claves, es fundamental para que las abejas jóvenes puedan transferir la información, y descarta la posibilidad de que haya una interacción directa entre nodriza y recolectora que

codifique información de la calidad del recurso (por ejemplo, antenación en McCabe et al. 2006; o “stop signal” durante el reclutamiento en Kietzman y Visscher 2021).

En el experimento IV donde se estudió el rol de los volátiles de polen acumulados en el nido sobre las preferencias de las recolectoras, los resultados fueron contrarios a los esperados. Si bien se esperaba que las recolectoras disminuyan sus preferencias por el polen cuyos volátiles se expusieron de forma pasiva el interior del nido, se observó un incremento de estas. A la vez que estos resultados mostraron que los volátiles del recurso pueden transferir información, resulta necesario revisar las condiciones experimentales que llevaron a un aumento de las preferencias. Por un lado, la ventana temporal en la cual se realizó el bombeo fue de 48 horas, la que podría no ser lo suficientemente duradera como para que las recolectoras consideren que los volátiles provenían de pólenes rechazados por las abejas jóvenes. Si se toman como referencia trabajos que muestran que el polen recientemente almacenado es mayormente consumido durante los primeros días, pero significativamente menos a partir del día 4 (Anderson et al. 2014, Carroll et al. 2017), es posible que una exposición más prolongada permitiría recrear mejor un entorno de colmena enriquecido en olores del polen de baja calidad. Por otro lado, es posible que los pólenes que no se consumen en el nido cambien su perfil de volátiles a partir de que “envejecen”. En el experimento se utilizó polen corbicular cosechado el mismo año y conservado en freezer, por lo que es esperable que no presente indicios de envejecimiento. Por el contrario, y con base en estos mismos argumentos, una exposición relativamente breve con volátiles de lo que se consideraría un polen “fresco”, podría haber favorecido la propagación de información que advierte sobre una nueva fuente de alimento productiva que está siendo explotada en el exterior. El efecto positivo a partir de la exposición de los olores del polen podría explicarse por el reclutamiento de recolectoras que salen en búsqueda del polen cuyas claves aprendieron en el nido, el cual podría recrear un escenario en donde circulan recolectoras con aromas de polen impregnados en su cuerpo, o que son emitidos por las mismas cargas de polen (Díaz et al. 2007).

Un mecanismo alternativo de transferencia de información a evaluar es la señalización de las celdas de pólenes adulterados con “marcas”, presumiblemente depositadas por las abejas jóvenes que experimentaron su calidad. Estas modificaciones podrían brindar información a las recolectoras que les permita evitar el recurso en el campo.

La participación de marcas o señales químicas en la comunicación de insectos está bien documentada (Richard y Hunt 2013). En las abejas podemos destacar aquellas marcas que tienen un efecto atrayente o incluso repelente sobre conspecíficos en el contexto recolector (Free 1987, Winston 1987, Williams 1998, Giurfa y Núñez 1992, Saleh et al. 2007). En un experimento adicional se estudió la presencia de marcas y su efecto sobre el consumo de abejas jóvenes en una colmena naïve. Este experimento consistió en transferir un cuadro (panel) con 3 pólenes monoflorales no adulterados que provenía de otra colmena cuyas abejas habían experimentado uno de los pólenes adulterado (Fig. A5.1 en anexo). Tras varias horas, las abejas de la colmena naïve no mostraron una reducción en el consumo del polen que se esperaba marcado (Fig. A5.2 en anexo). Así, la posibilidad de que exista alguna marca o señalización que modifique las elecciones del polen, tanto de consumo como de recolección, resulta poco probable.

Resumiendo, luego de indagar por distintos mecanismos que puedan mediar en la selección de pólenes de las colonias, se propone que las abejas jóvenes transfieren a las recolectoras claves específicas del polen además de información de su calidad que les permite ajustar sus decisiones de recolección. Si bien los resultados muestran que en el mecanismo que permite la evitación de recursos de baja calidad participan las abejas jóvenes y el sustrato, no se descarta que en el contexto de la colonia también participen otros actores, tales como las larvas. Queda por investigar, entre otras cosas (sección 6.3), si el aprendizaje de evitación podría lograrse a través de la evaluación del estado nutricional de las abejas jóvenes y las larvas, de modo que las recolectoras tenderían a visitar las mismas fuentes que permitieron la correcta alimentación de la colonia. En este escenario, por ejemplo, la feromona del hambre que emiten las larvas ante un ayuno prolongado (He et al. 2016) podría reforzar el aprendizaje aversivo de las claves del polen que “envejece” en las reservas.

DISCUSIÓN GENERAL

6.1. Conclusiones generales

A lo largo de la tesis se obtuvieron resultados relevantes para entender cómo las colonias evalúan los pólenes disponibles en el ambiente y modifican sus decisiones de recolección en función de la calidad de estos. Se observó que el proceso de selección de pólenes es complejo y participan las experiencias de las abejas recolectoras y de las abejas jóvenes, que tienen la posibilidad de evaluar la calidad de los distintos recursos tras ingerirlos. La selección de polen involucra también la transferencia de información relativa a la calidad del recurso en el contexto social del nido.

El hallazgo de que la calidad del recurso se evalúa en el interior del nido y no en las fuentes (al menos para un compuesto nocivo que actúa post-ingestión), es consistente con que la elección que realizan las abejas jóvenes y las maduras es diferente. Por un lado, las abejas jóvenes elegirían los pólenes con base tanto en una evaluación de las claves externas como en la composición interna del grano. Por otro lado, las recolectoras se guiarían principalmente por las claves asociadas a su composición externa. El cambio de las elecciones de las abejas luego de experimentar los pólenes disponibles ya sea a través del consumo o de la recolección, es consistente con un proceso plástico, en el que las experiencias permiten ajustar las respuestas iniciales (es decir, de abejas naïve) a partir de que cada grupo de abejas perciba los pólenes como adecuados para el desarrollo de la colonia. Aunque no se ha hecho hincapié en estudiar la dinámica temporal de estos cambios, es importante resaltar que los ajustes en las respuestas no ocurren de forma inmediata, sino retardada, proceso que ya fue documentado en otros insectos sociales (Arenas y Roces 2016a, 2016b, 2017).

La respuesta retardada que exhiben tanto las abejas jóvenes como las maduras, involucra el aprendizaje de las claves especie-específicas del polen asociadas a su composición o calidad del recurso que actúa como recompensa y que da lugar a memorias de largo término. Este tipo de aprendizaje asociativo es fundamental para la toma de decisiones de las abejas en el campo, donde los recursos disponibles en el ambiente cambian constantemente (Giurfa 2007). Además, un recurso que se incorpora al nido puede representar un riesgo (por ejemplo, al contener un metabolito tóxico o al estar contaminado) para la colonia por lo que el aprendizaje asociativo por aversión (Papaj y Prokopy 1989), es central en los insectos sociales donde un grupo de obreras distinto a las recolectoras es el principal destinatario de los recursos forrajeados. Si bien no se descartó que sucesivas experiencias de las recolectoras en las fuentes tengan un efecto en sesgar las preferencias (para lo cual se debería haber aislado el ciclo recolector de un individuo del resto de la colonia o evitado que ingresen sus cargas de polen al nido), sí se evidenció que es suficiente con que el polen esté presente en el interior del nido para que las recolectoras cambien sus decisiones hacia las opciones de mejor calidad (Fig. 6.1). Sumado a esto, se vio que las recolectoras no adquieren la información de la calidad de forma directa desde el polen procesado. Todo esto indica que las abejas consumidoras de polen, que principalmente son nodrizas, participan tanto en la evaluación como en la transferencia de información relativas a la calidad del polen (Fig. 6.1). En este sentido, se vio que las abejas jóvenes median la adquisición de esta información y que este proceso requiere que los pólenes estén presentes en las reservas (las nodrizas no pueden transferir la información sin la presencia del sustrato).

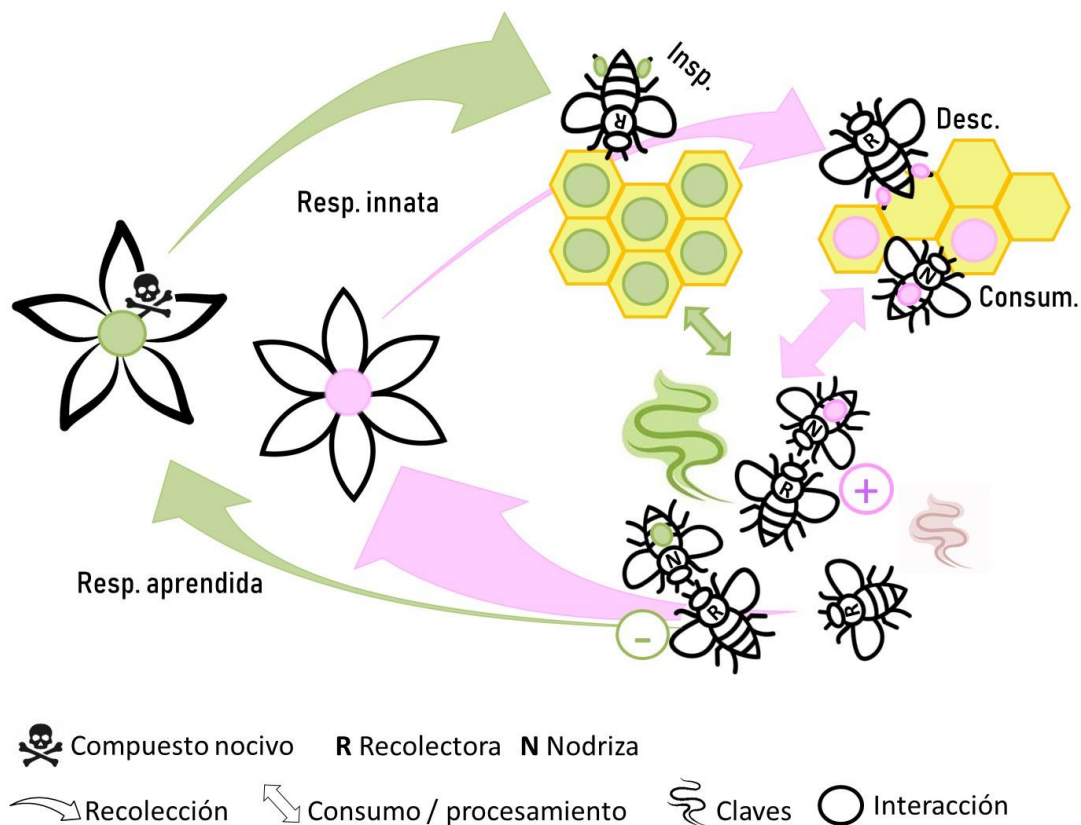


Figura 6.1. Elección del polen en la abeja *Apis mellifera*. El esquema muestra los actores, claves, comportamientos e interacciones involucrados en la elección de pólenes de distinta calidad. Las recolectoras (R) se basan en respuestas innatas (Resp. Innata) para elegir entre fuentes de polen novedosas. De regreso al nido inspeccionan (Insp.) los panales buscando celdas en donde descargar (Desc.) sus corbículas. Las abejas jóvenes (mayormente nodrizas, N) consumen (Consum.) los pólenes disponibles y aprenden a evitar sus claves en función de la calidad de estos. Las nodrizas experimentadas interactúan con las recolectoras en presencia de las claves de los pólenes lo que les permite ajustar sus respuestas en el campo (respuestas aprendidas, Resp. aprendida). Tras sucesivas visitas a las fuentes, este proceso permite evitar la acumulación de compuestos nocivos en las reservas del nido que afecta el desarrollo de las colonias.

6.2. Limitaciones en el desarrollo de la tesis

El adiestramiento de recolectoras de vuelo libre de colmenas abiertas para visitar una estación de recolección (experimento en sección 2.2.3.2) presentó algunas dificultades. Por un lado, fue necesario mantener las fuentes de azúcar y polen todos los días durante la temporada alta ya que la motivación de las recolectoras por visitar la estación disminuía con el aumento en la disponibilidad de diversas fuentes florales. Esto dificultaba mantener una población grande y estable de recolectoras al momento de iniciar el ensayo. Por otro lado, en temporada baja, las abejas de otras colmenas (distintas a la adiestrada) encontraban fácilmente la estación, lo que representaba un problema para mantener una población recolectora proveniente de una única colonia.

En los experimentos donde se trabajó con colmenas confinadas en jaulas de vuelo (en capítulos 4 y 5), se encontraron varias restricciones. Por un lado, aunque se utilizaron colonias de características similares, el período necesario para adiestrar a las recolectoras de cada colonia fue muy variable. Esto hizo muy difícil planificar el cronograma necesario para realizar cada replica. Por otro lado, y en relación con lo anterior, las fluctuaciones en las condiciones internas del nido y en las condiciones climáticas dentro de una misma temporada, impidieron alcanzar tamaños muestrales mayores (por ejemplo, la *serie quebracho* en el experimento 5.2.2) y, en algunos casos puntuales, realizar series complementarias o controles necesarios (experimentos 5.2.3 y 5.2.4).

Los experimentos a campo del capítulo 4, se realizaron en el mismo campo de cultivo y en fechas similares durante las temporadas 2020 y 2021. Aun así, hubo variaciones considerables en la disponibilidad de los recursos florales entre temporadas. Además, dentro de una misma temporada (2021), la flor amarilla, especie dominante al inicio del ensayo, disminuyó su disponibilidad durante los días siguientes. Debido a que la flor amarilla había sido el polen manipulado (experimento 4.2.5), la disponibilidad de la flor amarilla del ambiente (muy representada al inicio, pero muy poco al final del ensayo) no permitió realizar el análisis planteado inicialmente.

Por otro lado, la utilización de pólenes monoflorales restringió la posibilidad de poner a prueba distintas combinaciones de pólenes en el estudio de los perfiles de elección de las abejas jóvenes y recolectoras (experimentos del capítulo 2). Es común la comercialización de muestras de pólenes multiflorales como suplemento nutricional para la

dieta humana, pero es más difícil conseguir muestras monoflorales o multiflorales enriquecidas en un tipo de polen que pueda separarse manualmente en gran cantidad.

Para modificar artificialmente la calidad de los pólenes monoflorales, se utilizaron distintas sustancias según el experimento. De esta manera, la calidad del polen se definió en relación con los pólenes no manipulados (polen no adulterado versus adulterado). Dada esta manipulación, el desconocimiento de la composición química de los pólenes usados pudo interferir en el efecto esperado, por ejemplo, si un polen que se esperaba que resulte de mejor calidad tras ser suplementado con un nutriente, resultaba no ser afectado ya que el mismo se encontraba altamente disponible en el polen original (Manning et al. 2007).

6.3. Perspectivas

Un estudio detallado de la composición química de los pólenes utilizados, o la obtención y utilización de pólenes cuyos constituyentes ya fueron descritos, enriquecería el entendimiento de las respuestas observadas y contribuiría a mejorar los diseños de experimentos futuros. El estudio de la composición nos permitiría entender incluso las respuestas iniciales de las abejas. Además, nos permitiría plantear experimentos para conocer mejor los requisitos nutricionales de las obreras jóvenes e investigar si dicha composición correlaciona (o no) con los cambios observados en la dieta tras sucesivas experiencias en el tiempo. A su vez, esto se podría complementar con variables fisiológicas medidas en las abejas ya que la composición en nutrientes esenciales de los diferentes pólenes afecta el desarrollo (por ejemplo, tamaño de la glándula hipofaríngea, los cuerpos grasos y ovarios) y la supervivencia (Schmidt et al. 1987, Di Pasquale et al. 2013, 2016, Arien et al. 2015, Corby-Harris et al. 2018, Lan et al. 2021).

Si bien se estudiaron distintos mecanismos, hasta el momento no se logró identificar claramente cómo ocurre la transferencia de información relativa a la calidad del polen en el contexto social de la colonia. Además, aun cuando la participación de las abejas jóvenes y del polen es necesaria para el proceso de evitación del polen de baja calidad, sería importante estudiar si también participan otros actores en el contexto de la colonia, tales como las larvas, y qué efecto producen (por ejemplo, acelerar o amplificar la información). Las larvas emiten señales (por ejemplo, la feromona del hambre) frente a alteraciones en su dieta tales como un ayuno prolongado (He et al. 2016). Esa información disponible en el

ambiente del nido podría reforzar el aprendizaje aversivo de, por ejemplo, las recolectoras de polen que frecuentemente entran en contacto con las celdas de polen próximas a la cría (Pankiw et al. 1998; Vaughan y Calderone 1998; Dreller et al. 1999; Dreller y Tarpy 2000). Una posibilidad experimental sería combinar la información proveniente de las claves de un polen que “envejece” en las reservas y la referente a un mal estado nutricional de las larvas.

Las conclusiones de los capítulos 4 y 5 se basan en la utilización del compuesto amigdalina que actúa post-ingestión. Sería enriquecedor poder repetir algunos experimentos utilizando un compuesto amargo que provoque una respuesta de evitación pre-ingestión, como la quinina utilizada en el capítulo 3 y en anexo del capítulo 5 (Fig. A5.2; y ver también Avarguès-Weber et al. 2010). De esta manera quizás podríamos observar recolectoras que, al aterrizar en el polen adulterado, detecten el compuesto y lo eviten en la estación de forrajeo. Esto enriquecería el estudio de las respuestas comportamentales de las abejas frente a la calidad del polen.

Ante la diferencia en la elección de pólenes de abejas jóvenes versus maduras y que el cambio en las elecciones de las maduras es retardado luego de adquirir información en el nido, sería interesante estudiar como resuelven las obreras la presencia de polen tóxico o contaminado en el nido. En este sentido se describió un fenómeno de “entombed pollen” o polen enterrado (vanEngelsdorp et al. 2009), altamente representado en colmenas muertas en el marco del CCD (colony collapse disorder) y asociado a concentraciones altas de pesticidas. A través de esta modificación del polen almacenado en el nido, las recolectoras podrían adquirir información adicional que refuerce el aprendizaje de un polen de mala calidad para evitarlo.

6. 4. Implicancias

Los insectos sociales, y la abeja melífera en particular, son un modelo ampliamente estudiado en las áreas de neurociencias, fisiología, comportamiento y sociobiología. Numerosos estudios en distintas disciplinas han estudiado a estos insectos con el fin de entender cómo los miembros de las colonias manejan la información sobre las necesidades del nido y los recursos del ambiente, y cómo la integran según sus propias experiencias para generar una respuesta adaptativa a nivel del grupo. En la presente tesis se obtuvieron resultados que son relevantes para entender cómo la abeja *A. mellifera* recolecta polen de manera eficiente en función de cambios en la calidad de los recursos. Además, la realización de esta tesis permitió desarrollar técnicas y procedimientos originales que contribuirán en el diseño de estudios futuros sobre la selección de polen mediada por interacciones sociales.

En un contexto actual atravesado por un fuerte cambio en el uso de la tierra, las prácticas de agricultura modernas, y la consecuente pérdida de diversidad floral que provoca una reducción en la disponibilidad de polen y néctar que afecta negativamente al estado nutricional de las colonias (Winfrey 2009, vanEngelsdorp y Meixner 2010, Goulson et al. 2015, Scofield y Mattila 2015, Maggi et al. 2016, Steinhauer et al. 2018, de Groot et al. 2021), es prioritario ampliar el conocimiento sobre los mecanismos por los cuales las abejas seleccionan sus fuentes de polen ante las fluctuaciones en la oferta y en la calidad de las mismas.

Los compuestos tóxicos que se presentan en concentraciones mínimas en la naturaleza pueden aumentar en las reservas almacenadas en la colonia, sobre todo si la disponibilidad y/o diversidad de fuentes de alimento es baja (Liu et al. 2006, Alaux et al. 2010, Di Pasquale et al. 2013, Palmer-Young et al. 2017). En un contexto de monocultivo, por ejemplo, la posibilidad de que las colonias puedan detoxificar las reservas al “diluir” los pólenes tóxicos con otros de mejor calidad, es poco probable debido a la baja disponibilidad de pólenes alternativos que puedan ser incorporados y mezclados (Kevan y Erbert 2005). Por esto, considero que los resultados de esta tesis podrían aportar conocimientos sobre las capacidades y limitaciones de las abejas a la hora de seleccionar sus fuentes de alimento que permitan mejorar las prácticas de manejo de colmenas instaladas en entornos agrícolas

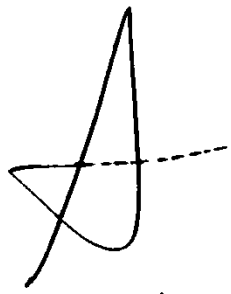
que sean sustentables para la salud y nutrición de las colonias mientras que favorecen la productividad de los cultivos.

Además de los compuestos nocivos que se encuentran de forma natural en el polen, otras sustancias artificiales aplicadas a los campos podrían contaminarlo. En particular, productos agroquímicos como herbicidas, insecticidas y fungicidas pueden estar presentes en los recursos que las recolectoras incorporan al nido, afectando a la salud y el funcionamiento de la colonia (Bohan et al. 2005, Elbert et al. 2008, Kakumanu et al. 2016, Rondeau y Raine 2022, Perkins et al. 2023), por lo que es relevante estudiar si las abejas también podrían evitar el polen contaminado con pesticidas, un mecanismo que les permitiría mitigar los efectos deletéreos de estos compuestos en las colonias que polinizan en agroecosistemas (Fig. 6.2).

En resumen, dado el contexto actual dominado por las prácticas de producción extensiva, los hallazgos presentados en esta tesis son oportunos y abren la puerta a nuevas investigaciones sobre los mecanismos y estrategias que despliega la abeja melífera para seleccionar sus fuentes de polen.



Figura 6.2. Colmenas instaladas en un campo de cultivo de girasol en donde proveen el servicio de polinización (Coronel Pringles, Buenos Aires).


Andrés Arenas


Rocío Lajad

REFERENCIAS

Abramson C.I., Bitterman M.E. (1986). Latent inhibition in honeybees. *Anim Learn Behav*, 14, 184-189.

Alaux C., Ducloz F., Crauser D., Le Conte Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol Lett*, 6, 562-565.

Anderson L.M., Dietz A. (1976). Pyridoxine requirement of the honey bee (*Apis mellifera*) for brood rearing. *Apidologie*, 7, 67-84.

Anderson K.E., Carroll M.J., Seehan T., et al. (2014). Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Mol Ecol*, 23, 5904–17.

Arenas A., Farina W.M. (2008). Age and rearing environment interact in the retention of early olfactory memories in honeybees. *J Comp Physiol A*, 194, 629-640.

Arenas A., Fernández V.M., Farina W.M. (2009). Associative learning during early adulthood enhances later memory retention in honeybees. *PLoS One*, 4, e8046.

Arenas A., Farina W.M. (2012). Learned olfactory cues affect pollen-foraging preferences in honeybees, *Apis mellifera*. *Anim Behav*, 83, 1023-1033.

Arenas A., Farina W.M. (2014). Bias to pollen odors is affected by early exposure and foraging experience. *J Insect Physiol*, 66, 28-36.

Arenas A., Rocas F. (2016a). Gardeners and midden workers in leaf-cutting ants learn to avoid plants unsuitable for the fungus at their worksites. *Anim Behav*, 115, 167-174.

Arenas A., Rocas F. (2016b). Learning through the waste: olfactory cues from the colony refuse influence plant preferences in foraging leaf-cutting ants. *J Exp Biol*, 219, 2490–2496.

Arenas A., Rocas F. (2017). Avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus in leaf-cutting ants: learning can take place entirely at the colony dump. *PLoS One*, 12, e0171388.

Arenas A., Fernández V.M., Farina W.M. (2007). Floral odor learning within the hive affects honeybees' foraging decisions. *Sci Nat*, 94, 218-222.

Arenas A., Fernández V.M., Farina W.M. (2008). Floral scents experienced within the colony affect long-term foraging preferences in honeybees. *Apidologie*, 39, 714-722.

Arenas A., Lajad R., Farina W. (2021). Selective recruitment for pollen and nectar sources in honeybees. *J Exp Biol*, 224, jeb242683.

Arien Y., Dag A., Zarchin S., et al. (2015). Omega-3 deficiency impairs honey bee learning. *PNAS*, 112, 15761–66.

Avarguès-Weber A., de Brito Sanchez M.G., Giurfa M., Dyer A.G. (2010). Aversive reinforcement improves visual discrimination learning in free-flying honeybees. *PLoS One*, 5, e15370.

Avni D., Hendriksma H.P., Dag A., et al. (2014). Nutritional aspects of honey bee-collected pollen and constraints on colony development in the eastern Mediterranean. *J Insect Physiol*, 69, 65–73.

Ayestaran A., Giurfa M., de Brito Sanchez M.G. (2010). Toxic but drunk: gustatory aversive compounds induce post-ingestional malaise in harnessed honeybees. *PLoS One*, 5, e15000.

Backhaus W. (1993). Color vision and color choice behavior of the honey bee. *Apidologie*, 24, 309–331.

Baker H.G. (1978). Chemical aspects of the pollination biology of woody plants in the tropics. En: *Tropical trees as living systems* (pp. 57-82). Ed. P.B. Tomlinson, M.H. Zimmerman. Cambridge University Press.

Baker H.G., Baker I. (1975). Studies of nectar-constitution and pollinator-plant coevolution. En: *Coevolution of Animals and Plants: Symposium V, First International Congress of Systematic and Evolutionary Biology, 1973* (pp. 100-140). University of Texas Press.

Baker I., Baker H.G. (1982a). Some chemical constituents of floral nectars of *Erythrina* in relation to pollinators and systematics. *Allertonia*, 3, 25-38

Balbuena M.S., Arenas A., Farina W.M. (2012a). Floral scents learned inside the honeybee hive have a longlasting effect on recruitment. *Anim Behav*, 84, 77-83.

Barbieri D., Gabriele M., Summa M., et al. (2020). Antioxidant, nutraceutical properties, and fluorescence spectral profiles of bee pollen samples from different botanical origins. *Antioxidants*, 9, 1001.

- Beekman M., Preece K., Schaerf T.M. (2016). Dancing for their supper: do honeybees adjust their recruitment dance in response to the protein content of pollen? *Insectes Soc*, 63, 117-126.
- Behmer S.T. (2009). Animal behaviour: feeding the superorganism. *Curr Biol*, 19, R366-R368.
- Bell W. J. (2012). *Searching behaviour: the behavioural ecology of finding resources*. Springer Science & Business Media.
- Bernklau E., Bjostad L., Hogeboom A., et al. (2019). Dietary phytochemicals, honey bee longevity and pathogen tolerance. *Insects*, 10, 1-12.
- Boch R. (1982). Relative attractiveness of different pollens to honeybees when foraging in a flight room and when fed in the hive. *J Apic Res*, 21, 104-106.
- Bohan D.A., Boffey C.W., Brooks D.R., et al. (2005). Effects on weed and invertebrate abundance and diversity of herbicide management in genetically modified herbicide-tolerant winter-sown oilseed rape. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 272, 463-474.
- Bolker B.M., Brooks M.E., Clark C.J., et al. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol*, 24, 127-135.
- Bonabeau E., Theraulaz G., Deneubourg J.L., et al. (1997). Self-organization in social insects. *Trends Ecol Evol*, 12, 188-193.
- Brodschneider R., Crailsheim K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41, 278-294.
- Bruce T.J.A. (2014). Glucosinolates in oilseed rape: secondary metabolites that influence interactions with herbivores and their natural enemies. *Ann App Biol*, 164, 348-353.
- Bruinsma, M., Lucas-Barbosa, D., ten Broeke, C. J., et al. (2014). Folivory affects composition of nectar, floral odor and modifies pollinator behavior. *J Chem Ecol*, 40, 39-49.
- Buchmann S.L. (1986). Vibratile pollination in *Solanum* and *Lycopersicon*: a look at pollen chemistry. En: *Solanaceae: biology and systematics* (pp. 237-252). Columbia University Press, New York.
- Butler C.G. (1951). The importance of perfume in the discovery of food by the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 138, 403-413.

- Calderone N.W., Johnson B.R. (2002). The within-nest behaviour of honeybee pollen foragers in colonies with a high or low need for pollen. *Anim Behav*, 63, 749-758.
- Carroll M.J., Brown N., Goodall C., et al. (2017). Honey bees preferentially consume freshly-stored pollen. *PLoS One*, 12, e0175933.
- Camazine S. (1993). The regulation of pollen foraging by honey bees: how foragers assess the colony's need for pollen. *Behav Ecol Sociobiol*, 32, 265-272.
- Camazine S., Crailsheim K., Hrassnigg N., et al. (1998). Protein trophallaxis and the regulation of pollen foraging by honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 29, 113-126.
- Camazine S., Deneubourg J., Franks N., et al. (2001). *Self-Organization in Biological Systems*. Princeton University Press.
- Campana B.J., Moeller F.E. (1977). Honey bees: preference for and nutritive value of pollen from five plant sources. *J Econ Entomol*, 70, 39-41.
- Carew T.J. (2000). *Behavioral Neurobiology: the cellular organization of natural behavior*. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Carter J.H., McLafferty M.A., Goldman P. (1980). Role of the gastrointestinal microflora in amygdalin (laetrile)-induced cyanide toxicity. *Biochem Pharmacol*, 29, 301-304.
- Casteel D.B. (2022). *The behavior of the honey bee in pollen collection*. DigiCat.
- Chandra S.B., Hosler J.S., Smith B.H. (2000). Heritable variation for latent inhibition and its correlation with reversal learning in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol*, 114, 86.
- Chittka L., Thomson J.D., Waser N.M. (1999). Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Sci Nat*, 86, 361-377.
- Claudianos C., Lim J., Young M., et al. (2014). Odor memories regulate olfactory receptor expression in the sensory periphery. *Eur J Neurosci*, 39, 1642-1654.
- Conte G., Benelli G., Serra A., et al. (2017). Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. *J Food Compos Anal*, 55, 12-19.
- Cook S.M., Awmack C.S., Murray D.A., Williams I.H. (2003). Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecol Entomol*, 28, 622-627.

- Cook S.M., Sandoz J.C., Martin A.P., et al. (2005). Could learning of pollen odours by honey bees (*Apis mellifera*) play a role in their foraging behaviour? *Physiol Entomol*, 30, 164-174.
- Corby-Harris V., Maes P., Anderson K.E. (2014a). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS One*, 9, e95056.
- Corby-Harris V., Snyder L., Meador C., Ayotte T. (2018). Honey bee (*Apis mellifera*) nurses do not consume pollens based on their nutritional quality. *PLoS One*, 13, e0191050.
- Crailsheim K. (1986). Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifica carnica* Pollm). *J Insect Physiol*, 32, 629-634.
- Crailsheim K. (1990). The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie*, 21, 417-29.
- Crailsheim K. (1991). Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J Comp Physiol B*, 161, 55-60.
- Crailsheim K. (1992). The flow of jelly within a honeybee colony. *J Comp Physiol B*, 162, 681-689.
- Crailsheim K. (1998). Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 29, 97-112.
- Crailsheim K., Schneider L.H.W., Hrassnigg N., et al. (1992). Pollen consumption and utilisation in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *J Insect Physiol*, 38, 409-419.
- Crawley M.J. (2012). The R Book. West Sussex, United Kingdom, John Wiley & Sons.
- Day S., Beyer R., Mercer A., Ogden S. (1990). The nutrient composition of honeybee-collected pollen in Otago, New Zealand. *J Apic Res*, 29, 138-146.
- de Brito Sanchez M.G. (2011). Taste perception in honey bees. *Chem Senses*, 36, 675-692.
- de Brito Sanchez M.G., Giurfa M., de Paula Mota T.R., Gauthier M. (2005). Electrophysiological and behavioural characterization of gustatory responses to antennal 'bitter' taste in honeybees. *Eur J Neurosci*, 22, 3161-3170.
- de Brito Sanchez M.G., Lorenzo E., Su S., et al. (2014). The tarsal taste of honey bees: behavioral and electrophysiological analyses. *Front Behav Neurosci*, 8, 25.

de Groot A.P. (1952). Amino acid requirements for growth of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Experientia*, 8, 192-194.

de Groot G.S., Aizen M.A., Sáez A., Morales C.L. (2021). Large-scale monoculture reduces honey yield: The case of soybean expansion in Argentina. *Agr Ecosyst Environ*, 306, 107203.

de Mesquita L.X., Maracajá P.B., Sakamoto S.M., Soto-Blanco B. (2010). Toxic evaluation in honey bees (*Apis mellifera*) of pollen from selected plants from the semi-arid region of Brazil. *J Apic Res*, 49, 265-269.

Delaplane K.S., Mayer D.F. (2000). *Crop pollination by bees*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Deneubourg J.L., Goss S. (1989). Collective patterns and decision-making. *Ethol Ecol Evol*, 1, 295-311.

Detzel A., Wink M. (1993). Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. *Chemoecol*, 4, 8-18.

Di Pasquale G., Salignon M., Le Conte Y., et al. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One*, 8, e72016.

Di Pasquale G., Alaux C., Le Conte Y., et al. (2016). Variations in the availability of pollen resources affect honey bee health. *PLoS One*, 11, e0162818.

Díaz P.C., Grüter C., Farina W.M. (2007). Floral scents affect the distribution of hive bees around dancers. *Behav Ecol Sociobiol*, 61, 1589-1597.

Díaz P.C., Arenas A., Fernández V. M., et al. (2013). Honeybee cognitive ecology in a fluctuating agricultural setting of apple and pear trees. *Behav Ecol*, 24, 1058-1067.

Dietz A. (1969). Initiation of pollen consumption and pollen movement through the alimentary canal of newly emerged honey bees. *Ann Entomol Soc Am*, 62, 43-46.

Dobson H.E. (1988). Survey of pollen and pollenkitt lipids—chemical cues to flower visitors? *Am J Bot*, 75, 170-182.

Dobson H.E., Danielson E.M., Wesep I.D.V. (1999). Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb.(Rosaceae). *Plant Species Biol*, 14, 153-166.

Dobson H.E., Bergström G. (2000). The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Syst Evol*, 222, 63-87.

- Dogterom M.H., Winston M.L. (1999). Pollen storage and foraging by honey bees (Hymenoptera: Apidae) in highbush blueberries (Ericaceae), cultivar Bluecrop. *Can Entomol*, 131, 757-768.
- Domenici V., Gabriele M., Parri E., et al. (2015). Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins. *IJFS*, 27, 120-131.
- Dornhaus A., Chittka L. (1999). Evolutionary origins of bee dances. *Nature*, 401, 38-38.
- Doull K.M. (1966). The relative attractiveness to pollen-collecting honeybees of some different pollens. *J Apic Res*, 5, 9-13.
- Dreller C., Page R.E.Jr., Fondrk M.K. (1999). Regulation of pollen foraging in honeybee colonies: effects of young brood, stored pollen, and empty space. *Behav Ecol Sociobiol*, 45, 227-233.
- Dreller C., Tarpay D.R. (2000). Perception of the pollen need by foragers in a honeybee colony. *Anim Behav*, 59, 91-96.
- Dussutour A., Simpson S.J. (2009). Communal nutrition in ants. *Curr Biol*, 19, 740-744.
- Ebert T.A., Kevan P.G., Bishop B.L., et al. (2007). Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *J Apic Res*, 46, 220-224.
- Eckert C.D., Winston M.L., Ydenberg R.C. (1994). The relationship between population size, amount of brood, and individual foraging behaviour in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Oecologia*, 97, 248-255.
- Elbert A., Haas M., Springer B., et al. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci*, 64, 1099-1105.
- Ellis A.M., Hayes Jr G.W. (2009). An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*). *J Apic Res*, 48, 215-216.
- Evans D.E., Rothnie N.E., Palmer M.V., et al. (1987). Comparative analysis of fatty acids in pollen and seed of rapeseed. *Phytochem*, 26, 1895-1898.
- Evans D.E., Taylor P.E., Singh M.B., Knox R.B. (1991). Quantitative analysis of lipids and protein from the pollen of *Brassica napus* L. *Plant Sci*, 73, 117-126.
- Farina W.M., Grüter C., Díaz P.C. (2005). Social learning of floral odours inside the honeybee hive. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 272, 1923-1928.

Farina W.M., Grüter C., Acosta L., McCabe S. (2007). Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive. *Sci Nat*, 94, 55-60.

Farina W.M., Arenas A., Díaz P.C., et al. (2020). Learning of a mimic odor within beehives improves pollination service efficiency in a commercial crop. *Curr Biol*, 30, 4284-4290.

Farina W.M., Arenas A., Estravis-Barcala M.C., Palottini F. (2023). Targeted crop pollination by training honey bees: advances and perspectives. *Front Bee Sci*, 1, 1253157.

Fewell J.H. (2003). Social insect networks. *Science*, 301, 1867-1870.

Fewell J.H., Ydenberg R.C., Winston M.L. (1991). Individual foraging effort as a function of colony population in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Anim Behav*, 42, 153-155.

Fewell J.H., Winston M.L. (1992). Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Behav Ecol Sociobiol*, 30, 387-393.

Fewell J.H., Page R.E. (1993). Genotypic variation in foraging responses to environmental stimuli by honey bees, *Apis mellifera*. *Experientia*, 49, 1106-1112.

Fewell J.H., Bertram S.M. (1999). Division of labor in a dynamic environment: response by honeybees (*Apis mellifera*) to graded changes in colony pollen stores. *Behav Ecol Sociobiol*, 46, 171-179.

Filipiak M., Kuszewska K., Asselman M., et al. (2017). Ecological stoichiometry of the honeybee: Pollen diversity and adequate species composition are needed to mitigate limitations imposed on the growth and development of bees by pollen quality. *PLoS One*, 12, e0183236.

Forcone A., Aloisi P.V., Ruppel S., Muñoz M. (2011). Botanical composition and protein content of pollen collected by *Apis mellifera* L. in the north-west of Santa Cruz (Argentinean Patagonia). *Grana*, 50, 30-39.

Franchi G.G., Bellani L., Nepi M., Pacini E. (1996). Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *Flora*, 191, 143-159.

Free J.B. (1957). The transmission of food between worker honeybees. *British J Anim Behav*, 5, 41-47.

Free J.B. (1963). The floral constancy of honeybees. *J Anim Ecol*, 32, 119-32.

Free J.B. (1967). Factors determining the collection of pollen by honeybee foragers. *Anim Behav*, 15, 134-144.

Free J.B. (1969). Influence of the odour of a honeybee colony's food stores on the behaviour of its foragers. *Nature*, 222, 778-778.

Free J.B. (1987). *Pheromones of social bees*. Chapman and Hall. London, UK.

Gardener M.C., Gillman M.P. (2001). Analyzing variability in nectar amino acids: Composition is less variable than concentration. *J Chem Ecol*, 27, 2545-58.

Ghirlanda S., Enquist M. (2003). A century of generalization. *Anim Behav*, 66, 15-36.

Gil M., De Marco R. J. (2005). Olfactory learning by means of trophallaxis in *Apis mellifera*. *J Exp Biol*, 208, 671-680.

Giurfa M. (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J Comp Physiol A*, 193, 801-824.

Giurfa M., Núñez J.A. (1992). Honeybees mark with scent and reject recently visited flowers. *Oecologia*, 89, 113-117.

Gilliam M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol Lett*, 155, 1-10.

Gordon D.M. (1999). *Ants at work: how an insect society is organized*. Simon and Schuster.

Gordon D.M. (2010). *Ant Encounters*. Princeton University Press.

Goulson D. (2003). The conservation of bumble bees. *Bee World*, 84, 105-106.

Goulson D., Nicholls E., Botías C., Rotheray E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347, 6229.

Gronquist M., Bezzerides A., Attygalle A., et al. (2001). Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*). *PNAS*, 98, 13745-13750.

Grüter C., Acosta L.E., Farina W.M. (2006). Propagation of olfactory information within the honeybee hive. *Behav Ecol Sociobiol*, 60, 707-715.

Grüter C., Arenas A., Farina W.M. (2008). Does pollen function as a reward for honeybees in associative learning? *Insectes Soc*, 55, 425-427.

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

- Guerrieri F., Schubert M., Sandoz J.C., Giurfa M. (2005). Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol*, 3, e60.
- Gumbert A. (2000). Color choices by bumble bees (*Bombus terrestris*): innate preferences and generalization after learning. *Behav Ecol Sociobiol*, 48, 36-43.
- Hagler J.R., Buchmann S.L. (1993). Honey bee (Hymenoptera: Apidae) foraging responses to phenolic-rich nectars. *J Kans Entomol Soc*, 66, 223-230.
- Haydak M.H., Dietz A. (1965). Influence of the diet on the development and brood rearing of honey bees. *Proc. XV. Beekeeping Cong. Bucharest*, 1-6.
- He X.J., Zhang X.C., Jiang W.J., et al. (2016). Starving honey bee (*Apis mellifera*) larvae signal pheromonally to worker bees. *Sci Rep*, 6, 22359.
- Heinrich B. (1984). Learning in invertebrates. En: *The Biology of Learning: Report of the Dahlem Workshop on the Biology of Learning Berlin* (pp. 135-147). Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Hendriksma H.P., Shafir S. (2016). Honey bee foragers balance colony nutritional deficiencies. *Behav Ecol Sociobiol*, 70, 509-517.
- Hendriksma H.P., Toth A.L., Shafir S. (2019). Individual and colony level foraging decisions of bumble bees and honey bees in relation to balancing of nutrient needs. *Front Ecol Evol*, 7, 177.
- Herbert E.W., Bickley W.E., Shimanuki H. (1970). The brood-rearing capability of caged honey bees fed dandelion and mixed pollen diets. *J Econ Entomol*, 63, 215-218.
- Herbert E.W., Shimanuki H. (1978a). Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee stored pollen. *Apidologie*, 9, 33-40.
- Herbert E.W., Shimanuki H. (1978c). Effect of fat soluble vitamins on the brood rearing capabilities of honey bees fed a synthetic diet. *Ann Entomol Soc Am*, 71, 689-691.
- Hesse M. (1993). *Pollenkitt development and composition in Tilia platyphyllos (Tiliaceae) analysed by conventional and energy filtering TEM* (pp. 39-52). Springer Vienna.
- Hill M.O. (1973). Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54, 427-432.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443, 931-49.

- Hopkins R.J., van Dam N.M., van Loon J.J. (2009). Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Ann Rev Entomol*, 54, 57-83.
- Hothorn T., Bretz F., Westfall P. (2008). “Simultaneous Inference in General Parametric Models”. *Biom J*, 50, 346-363.
- Human H., Nicolson S.W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochem*, 67, 1486-92.
- Hurst V., Stevenson P.C., Wright G.A. (2014). Toxins induce ‘malaise’ behaviour in the honeybee (*Apis mellifera*). *J Comp Physiol A*, 200, 881-890.
- Invernizzi C., Santos E., García E., et al. (2011). Caracterización sanitaria y nutricional de colonias de abejas melíferas en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. *Archivos de zootecnia*, 60, 1303-1314.
- Iovinella I., Cappa F., Cini A., et al. (2018). Antennal protein profile in honeybees: Caste and task matter more than age. *Front Physiol*, 9, 387031.
- Jandt J.M., Jeanne R.L. (2005). German yellowjacket (*Vespula germanica*) foragers use odors inside the nest to find carbohydrate food sources. *Ethology*, 111, 641-651.
- Johnson B.R. (2023). *Honey Bee Biology*. Princeton University Press.
- Johnson D.L., Wenner A.M. (1966). A relationship between conditioning and communication in honey bees. *Anim Behav*, 14, 261-265.
- Jolliffe I.T., Cadima J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans R Soc A: Math, Phys Eng Sci*, 374, 20150202.
- Kakumanu M.L., Reeves A.M., Anderson T.D., Rodrigues R.R., Williams M.A. (2016). Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Front Microbiol*, 7, 1255.
- Kevan P., Ebert T. (2005). Can almond nectar & pollen poison honey bees. *Am Bee J*, 145, 507-509.
- Khandekar J.D., Edelman H. (1979). Studies of amygdalin (laetrile) toxicity in rodents. *JAMA*, 242, 169-171.
- Kietzman P.M., Visscher P.K. (2021). The influence of available comb storage space on the performance of honey bee communication signals that regulate foraging. *Apidologie*, 52, 133-140.

Klein A.M., Vaissière B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C., Tscharntke T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 274, 303-313.

Knox D.A., Shimanuki H., Herbert E.W. (1971). Diet and longevity of adult honey bees. *J Econ Entomol*, 64, 1415-1416.

Kolesarova A., Baldovska S., Roychoudhury S. (2021). The multiple actions of amygdalin on cellular processes with an emphasis on female reproduction. *J Pharm*, 14, 881.

Koltermann R. (1969). The factor of time in the learning process of honeybees. *Zoologische Anzeiger (Supplement)*, 33, 205-208.

Kostryco M., Chwil M. (2021). Structure of anther epidermis and endothecium, production of pollen, and content of selected nutrients in pollen grains from six *Rubus idaeus* L. cultivars. *J Agron*, 11, 1723.

Kovacikova E., Kovacik A., Halenar M., et al. (2019). Potential toxicity of cyanogenic glycoside amygdalin and bitter apricot seed in rabbits-health status evaluation. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 103, 695-703.

Lan J., Ding G., Ma W., et al. (2021). Pollen source affects development and behavioral preferences in honey bees. *Insects*, 12, 130.

Lass A., Crailsheim K. (1996). Influence of age and caging upon protein metabolism, hypopharyngeal glands and trophallactic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Soc*, 43, 347-358.

Leonhardt S.D., Blüthgen N. (2012). The same, but different: pollen foraging in honeybee and bumblebee colonies. *Apidologie*, 43, 449-464.

Levin M.D., Bohart G.E. (1955). Selection of pollens by honey bees. *Am Bee J*, 95, 392.

Lim S., Jung J., Yunusbaev U., et al. (2019). Characterization and its implication of a novel taste receptor detecting nutrients in the honey bee, *Apis mellifera*. *Sci Rep*, 9, 11620.

Lindauer M. (1952). Ein beitrag zur frage der arbeitsteilung im bienenstaat. *Z vergl Physiol*, 34, 299-345.

Lindauer M. (1955). The water economy and temperature regulation of the honeybee colony. *Bee World*, 36, 81-92.

Liolios V., Tananaki C., Dimou M., et al. (2016). Ranking pollen from bee plants according to their protein contribution to honey bees. *J Apic Res*, 54, 582-592.

- Liu F.L., Fu W.J., Yang D.R., et al. (2004). Reinforcement of bee–plant interaction by phenolics in food. *J Apic Res*, 43, 155-157.
- Liu F.L., Zhang X.W., Chai J.P., Yang D.R. (2006). Pollen phenolics and regulation of pollen foraging in honeybee colony. *Behav Ecol Sociobiol*, 59, 582-588.
- London-Shafir I., Shafir S., Eisikowitch D. (2003). Amygdalin in almond nectar and pollen-facts and possible roles. *Plant Syst Evol*, 238, 87-95.
- López V.C., Gurini L. (2022). Origen botánico y proteína bruta de polen cosechado por *Apis mellifera* en colmenas de la unidad demostrativa apícola Wayna Porá, Delta Frontal, Buenos Aires. GACETA 649. Sociedad Argentina de Apicultura (SADA). <https://sada.org.ar/origen-botanico-y-proteina-bruta-de-polen-cosechado-por-apis-mellifera-en-colmenas-de-la-unidad-demostrativa-apicola-wayna-pora-delta-frontal-buenos-aires/>
- Lunau K. (2000). The ecology and evolution of visual pollen signals. *Plant Syst Evol*, 222, 89-111.
- Ma L., Wang Y., Hang X., et al. (2015). Nutritional effect of alpha-linolenic acid on honey bee colony development (*Apis mellifera* L.). *J Apic Sci*, 59, 63-72.
- Maes P.W., Rodrigues P.A., Oliver R., et al. (2016). Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and Nosema disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Mol Ecol*, 25, 5439-5450.
- Maggi M., Antúnez K., Invernizzi C., et al. (2016). Honeybee health in South America. *Apidologie*, 47, 835-854.
- Mailleux A.C., Buffin A., Detrain C., Deneubourg J.L. (2011). Recruitment in starved nests: the role of direct and indirect interactions between scouts and nestmates in the ant *Lasius niger*. *Insectes Soc*, 58, 559-567.
- Manning R. (2001). Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World*, 82, 60-75.
- Manning R., Rutkay A., Eaton L., Dell B. (2007). Lipid-enhanced pollen and lipid-reduced flour diets and their effect on the longevity of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Aust J Entomol*, 46, 251-257.
- Mayda N., Özkök A., Ecem Bayram N., et al. (2020). Bee bread and bee pollen of different plant sources: Determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles. *J Food Meas Charact*, 14, 1795-1809.

McCabe S., Farina W.M., Josens R.B. (2006). Antennation of nectar-receivers encodes colony needs and food-source profitability in the ant *Camponotus mus*. *Insectes Soc*, 53, 356-361.

McCabe S.I., Farina W.M. (2009). Odor information transfer in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*: effect of in-hive experiences on classical conditioning of proboscis extension. *J Comp Physiol A*, 195, 113-122.

Mengoni Goñalons C., Farina W.M. (2015). Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behaviour. *PLoS One*, 10, e0140814.

Mengoni Goñalons C., Farina W.M. (2018). Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *J Exp Biol*, 221, jeb176644.

Menzel R. (1990). Learning, memory and ‘cognition’ in honey bees. En: *Neurobiology of Comparative Cognition* (pp. 237-292). Ed. R.P. Kesner, D.S. Olton. Hillsdale, New Jersey, L. Erlbaum.

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

Menzel R., Erber J. (1978). Learning and memory in bees. *Sci Am*, 239, 102-111.

Menzel R., Gumbert A., Knuze J., et al. (1997). Pollinators’ strategies in finding flowers. *Isr J Plant Sci*, 45, 141-156.

Menzel R., Müller U. (1996). Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Ann Rev Neurosci*, 19, 379-404.

Millward D.J., Fereday A., Gibson N., Pacy P.J. (1997). Aging, protein requirements, and protein turnover. *AJCN*, 66, 774-786.

Moreno E., Arenas A. (2023). Changes in resource perception throughout the foraging visit contribute to task specialization in the honey bee *Apis mellifera*. *Sci Rep*, 13, 8164.

Moritz B., Crailsheim K. (1987). Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol*, 33, 923-931.

Münch D., Amdam G. V. (2010). The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS letters*, 584, 2496-2503.

Nation J.L., Robinson F.A. (1968). Brood rearing by caged honey bees in response to inositol and certain pollen fractions in their diet. *Ann Entomol Soc Am*, 61, 514-517.

- Nery D., Moreno E., Arenas A. (2020). Pollen reinforces learning in honey bee pollen foragers but not in nectar foragers. *J Exp Biol*, 223, 230-250.
- Newton G.W., Schmidt E.S., Lewis J.P., et al. (1981). Amygdalin toxicity studies in rats predict chronic cyanide poisoning in humans. *W J Med*, 134, 97.
- Nicholls E., Hempel de Ibarra N. (2017). Assessment of pollen rewards by foraging bees. *Funct Ecol*, 31, 76-87.
- Nicolson S.W. (2007). Amino acid concentrations in the nectars of southern African bird-pollinated flowers, especially *Aloe* and *Erythrina*. *J Chem Ecol*, 33, 1707-1720.
- Nicolson S.W. (2009) Water homeostasis in bees, with the emphasis on sociality. *J Exp Biol*, 212, 429-434.
- Nicolson S.W. (2011). Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *Afr Zool*, 46, 197-204.
- Nicolson S.W., Thornburg R.W. (2007) Nectar chemistry. En: *Nectaries and Nectar* (pp. 215-264). Ed. S.W. Nicolson, M. Nepi, E. Pacini. Springer, Dordrecht.
- Oksanen J., Blanchet G. F., Friendly M., et al. (2018) Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-2. <https://cran.rproject.org/web/packages/vegan/index.html>.
- Orians G.H., Pearson N.E. (1979). On the theory of central place foraging. En: *Analysis of Ecological Systems* (pp. 154-177). Ed. Horn D.J., Mitchell R.D., Stairs G.R. Ohio State University Press, Columbus.
- Pacini E. (1996). Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sex Plant Reprod*, 9, 362-366.
- Pacini E., Hesse M. (2005). Pollenkitt—its composition, forms and functions. *Flora-Morphol, Distrib, Funct Ecol Plants*, 200, 399-415.
- Palmer-Young E.C., Sadd B.M., Stevenson P.C., et al. (2016). Bumble bee parasite strains vary in resistance to phytochemicals. *Sci Rep*, 6, 37087.
- Palmer-Young E.C., Tozkar C.Ö., Schwarz R.S., et al. (2017). Nectar and pollen phytochemicals stimulate honey bee (Hymenoptera: Apidae) immunity to viral infection. *J Econ Entomol*, 110, 1959-1972.
- Palmer-Young E.C., Farrell I.W., Adler L.S., et al. (2019a). Chemistry of floral rewards: intra-and interspecific variability of nectar and pollen secondary metabolites across taxa. *Ecol Monogr*, 89, e01335.

- Palmer-Young E.C., Farrell I.W., Adler L.S., et al. (2019b). Secondary metabolites from nectar and pollen: a resource for ecological and evolutionary studies. *Ecology*, 100.
- Pankiw T., Page Jr R.E., Kim Fondrk M. (1998). Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behav Ecol Sociobiol*, 44, 193-198.
- Papaj D.R., Prokopy R.J. (1989). Ecological and evolutionary aspects of learning in phytophagous insects. *Ann Rev Entomol*, 34, 315-350.
- Parkinson B.M., Pacini E. (1995). A comparison of tapetal structure and function in pteridophytes and angiosperms. *Plant Syst Evol*, 198, 55-88.
- Peng Y.S., Nasr M.E., Marston J.M., Fang Y. (1985). The digestion of dandelion pollen by adult worker honeybees. *Physiol Entomol*, 10, 75-82.
- Peng Y.S., Nasr M.E., Marston J.M. (1986). Release of alfalfa, *Medicago sativa*, pollen cytoplasm in the gut of the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Ann Entomol Soc Am*, 79, 804-807.
- Perkins J.A., Kim K., Gut L.J., Sundin G.W., Wilson J.K. (2023). Fungicide exposure in honey bee hives varies by time, worker role, and proximity to orchards in spring. *J Econ Entomol*, 116, 435-446.
- Pernal S.F., Currie R.W. (2001). The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol Sociobiol*, 51, 53-68.
- Pernal S.F., Currie R.W. (2002). Discrimination and preferences for pollenbased cues by foraging honeybees, *Apis mellifera* L. *Anim Behav*, 63, 369-390.
- Pierce G.J., Ollason J.G. (1987). Eight reasons why optimal foraging theory is a complete waste of time. *Oikos*, 49, 111-118.
- Pietrantuono A.L., Requier F., Fernández-Arhex V., et al. (2019). Honeybees generalize among pollen scents from plants flowering in the same seasonal period. *J Exp Biol*, 222, jeb201335.
- Piskorski R., Kroder S., Dorn S. (2011). Can pollen headspace volatiles and pollenkitt lipids serve as reliable chemical cues for bee pollinators? *Chem Biodivers*, 8, 577-586.
- Primorac L., Bilić Rajs B., Gal K., et al. (2023). The specificity of monofloral bee pollen fatty acid composition from Croatia and its nutritional value. *JCEA*, 24, 104-114.
- Radev Z. (2018). Variety in protein content of pollen from 50 plants from Bulgaria. *Bee World*, 95, 81-83.

- Ramírez G.P., Martínez A.S., Fernández V.M., et al. (2010). The influence of gustatory and olfactory experiences on responsiveness to reward in the honeybee. *PLoS One*, 5, e13498.
- Rasmont P., Regali A., Ings T.C., et al. (2005). Analysis of pollen and nectar of *Arbutus unedo* as a food source for *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol*, 98, 656-663.
- Reinhard J., Srinivasan M.V., Guez D., Zhang S.W. (2004). Floral scents induce recall of navigational and visual memories in honeybees. *J Exp Biol*, 207, 4371-4381.
- Ribbands C.R. (1954). The defence of the honeybee community. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 142, 514-524.
- Ribbands C.R. (1955). The scent perception of the honeybee. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 143, 367-379.
- Richard F.J., Hunt J.H. (2013). Intracolony chemical communication in social insects. *Insectes soc*, 60, 275-291.
- Richardson L.L., Adler L.S., Leonard A.S., et al. (2015). Secondary metabolites in floral nectar reduce parasite infections in bumblebees. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 282, 20142471.
- Rivest S., Forrest J.R. (2020). Defence compounds in pollen: why do they occur and how do they affect the ecology and evolution of bees? *New Phytol*, 225, 1053-1064.
- Robertson H.M., Wanner K.W. (2006). The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Res*, 16, 1395-1403.
- Robinson F.A., Nation J.L. (1968). Substances that attract caged honeybee colonies to consume pollen supplements and substitutes. *J Apic Res*, 7, 83-88.
- Robinson G.E., Page Jr R.E., Strambi C., Strambi A. (1992). Colony integration in honey bees: mechanisms of behavioral reversion. *J Ethol*, 90, 336-348.
- Roces F. (2002). Individual complexity and self-organization in foraging by leaf-cutting ants. *Biol Bull*, 202, 306-313.
- Rondeau S., Raine N.E. (2022). Fungicides and bees: a review of exposure and risk. *Environ Int*, 165, 107311.
- Rösch G.A. (1925). Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. vergl. Physiol*, 2, 571-631.

Roulston T.H., Cane J.H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Syst Evol*, 222, 187-209.

Roulston T.A.H., Cane J.H., Buchmann S.L. (2000). What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? *Ecol Monogr*, 70, 617-643.

Ruedenauer F.A., Spaethe J., 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. *J Exp Biol*, 218, 2233-2240.

Ruedenauer F.A., Wöhrle C., Spaethe J., Leonhardt S.D. (2018). Do honeybees (*Apis mellifera*) differentiate between different pollen types? *PLoS One*, 13, e0205821.

Sadd B.M., Barribeau S.M., Bloch G., et al. (2015). The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organization. *Genome Biol*, 16, 1-32.

Sagona S., Pozzo L., Peiretti P.G., et al. (2017). Palynological origin, chemical composition, lipid peroxidation and fatty acid profile of organic Tuscanian bee-pollen. *J Apic Res*, 56, 136-143.

Salama R.H., Ramadan A.E.R.G., Alsanory T.A., et al. (2019). Experimental and therapeutic trials of amygdalin. *Int J Biochem Pharmacol*, 1, 21-26.

Saleh N., Scott A.G., Bryning G.P., Chittka L. (2007). Distinguishing signals and cues: bumblebees use general footprints to generate adaptive behaviour at flowers and nest. *Arthropod-Plant Inte*, 1, 119-127.

Santos R.P., Mariath J.E. A., Hesse M. (2003). Pollenkitt formation in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.(Aquifoliaceae). *Plant Syst Evol*, 237, 185-198.

Santos E., Invernizzi C., García E., et al. (2009). Contenido de proteína cruda del polen de las principales especies botánicas utilizadas por las abejas melíferas en Uruguay. *Agrociencia-Uruguay*, 13, 9-13.

Scheiner R., Erber J., Page R.E. (1999). Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A*, 185, 1e10.

Scheiner R., Page R.E. Erber J. (2001). The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiol Learn Mem*, 76, 138-150.

- Schmidt J.O. (1982). Pollen foraging preferences of honey bees. *Southwestern Entomologist*, 7, 255-259.
- Schmidt J.O. (1984). Feeding preferences of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): individual versus mixed pollen species. *J Kans Entomol Soc*, 57, 323-327.
- Schmidt J. (1985). Phagostimulants in pollen. *J Apic Res*, 24, 107-114.
- Schmidt J.O., Johnson B.E. (1984). Pollen feeding preference of *Apis mellifera*, a polylectic bee, *Southwest Entomol*, 9, 41-47.
- Schmidt J.O., Thoenes S.C., Levin M.D. (1987). Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. *J Econ Entomol*, 80, 176-183.
- Schmidt J.O., Buchmann S.L., Glaum M. (1989). The nutritional value of *Typha latifolia* pollen for bees. *J Apic Res*, 28, 155-165.
- Schmidt L.S., Schmidt J.O., Rao H., et al. (1995). Feeding preference and survival of young worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) fed rape, sesame, and sunflower pollen. *J Econ Entomol*, 88, 1591-1595.
- Schmidt J.O., Hanna A. (2006). Chemical nature of phagostimulants in pollen attractive to honeybees. *J Insect Behav*, 19, 521-532.
- Schmid-Hempel P., Kacelnik A., Houston A.I. (1985). Honeybees maximize efficiency by not filling their crop. *Behav Ecol Sociobiol*, 17, 61-66.
- Schmid-Hempel P. (1987). Efficient nectar-collecting by honeybees I. Economic models. *J Anim Ecol*, 56, 209-218.
- Scofield H.N., Mattila H.R. (2015). Honey bee workers that are pollen stressed as larvae become poor foragers and waggle dancers as adults. *PLos One*, 10, e0121731.
- Seeley T.D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav Ecol Sociobiol*, 11, 287-293.
- Seeley T.D. (1985). *Honeybee ecology*. Princeton University Press.
- Seeley T.D. (1989). The honey bee colony as a superorganism. *Am Sci*, 77, 546-553.
- Seeley T.D. (2009). *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Seeley T.D., Towne W.F. (1992). Tactics of dance choice in honey bees: do foragers compare dances? *Behav Ecol Sociobiol*, 30, 59-69.

Seeley T.D., Mikheyev A.S., Pagano G.J. (2000). Dancing bees tune both duration and rate of waggle-run production in relation to nectar-source profitability. *J Comp Physiol A*, 186, 813-819.

Singaravelan N., Nee'man G., Inbar M., Izhaki I. (2005). Feeding responses of free-flying honeybees to secondary compounds mimicking floral nectars. *J Chem Ecol*, 31, 2791-2804.

Singh R.P., Singh P.N. (1996). Amino acid and lipid spectra of larvae of honey bee (*Apis cerana* Fabr) feeding on mustard pollen. *Apidologie*, 27, 21-28.

Singh S., Saini K., Jain K.L. (1999). Quantitative comparison of lipids in some pollens and their phagostimulatory effects in honey bees. *J Apic Res*, 38, 87-92.

Solberg Y., Remedios G. (1980). Chemical composition of pure and beecollected pollen. *Sci Rep Agric Univ Norw*, 59, 1-12.

Somerville D.C. (2001). *Nutritional Value of Bee Collected Pollens: A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation; RIRDC Project No DAN-134A*. RIRDC.

Somerville D.C. (2005). Lipid content of honey bee-collected pollen from south-east Australia. *Aust J Exp Agric*, 45, 1659.

Somerville D.C., 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. *Aust J Exp Agric*, 46, 141-149.

Sponsler D., Iverson A., Steffan-Dewenter I. (2023). Pollinator competition and the structure of floral resources. *Ecography*, 2023, e06651.

Stanciu O., Mărghitaş L.A., Dezmirean D., Campos M. (2011). A comparison between the mineral content of flower and honeybee collected pollen of selected plant origin (*Helianthus annuus* L. and *Salix* sp.). *Rom Biotechnol Lett*, 16, 6291-6296.

Standifer L.N. (1967). A comparison of the protein quality of pollens for growth-stimulation of the hypopharyngeal glands and longevity of honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Insectes Soc*, 14, 415-425.

Steinhauer N., Kulhanek K., Antúnez K., et al. (2018). Drivers of colony losses. *Curr Opin Insect Sci*, 26, 142-148.

- Stevenson P.C., Nicolson S.W., Wright G.A. (2017). Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions. *Funct Ecol*, 31, 65-75.
- Stevenson P.C. (2020). For antagonists and mutualists: the paradox of insect toxic secondary metabolites in nectar and pollen. *Phytochem Rev*, 19, 603-614.
- Szolderits M.J., Crailsheim K. (1993). A comparison of pollen consumption and digestion in honeybee (*Apis mellifera carnica*) drones and workers. *J Insect Physiol*, 39, 877-881.
- Takeda K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *J Insect Physiol*, 6, 168-179.
- Tauber J.P., Tozkar C.Ö., Schwarz R.S., et al. (2020). Colony-level effects of amygdalin on honeybees and their microbes. *Insects*, 11, 783.
- Tigreros N. (2013). Linking nutrition and sexual selection across life stages in a model butterfly system. *Funct Ecol*, 27, 145-154.
- Todd F.E., Bretherick O. (1942). The composition of pollens. *J Econ Entomol*, 35, 312-318.
- Tourn E. (2013). Recompensas florales de *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. Tesis doctoral Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur.
- Truchado P., Tourn E., Gallez L.M., et al. (2010). Identification of botanical biomarkers in Argentinean *Diplotaxis* honeys: flavonoids and glucosinolates. *J Agr Food Chem*, 58, 12678-12685.
- van de Rest O., van der Zwaluw N.L., de Groot L.C. (2013). Literature review on the role of dietary protein and amino acids in cognitive functioning and cognitive decline. *Amino acids*, 45, 1035-1045.
- Van Der Moezel P.G., Delfs J.C., Pate J.S., et al. (1987). Pollen selection by honeybees in shrublands of the Northern Sandplains of Western Australia. *J Apic Res*, 26, 224-232.
- vanEngelsdorp D., Evans J.D., Donovall L., et al. (2009). “Entombed Pollen”: a new condition in honey bee colonies associated with increased risk of colony mortality. *J Invertebr Pathol*, 101, 147-149.
- vanEngelsdorp D., Meixner M.D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol*, 103, S80-S95.

- Vanderplanck M., Zerck P.L., Lognay G., Michez D. (2020). Sterol addition during pollen collection by bees: another possible strategy to balance nutrient deficiencies? *Apidologie*, 51, 826-843.
- Vásquez A., Olofsson T.C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J Apic Res*, 48, 189-195.
- Vaudo A.D., Patch H.M., Mortensen D.A., et al. (2016). Macronutrient ratios in pollen shape bumble bee (*Bombus impatiens*) foraging strategies and floral preferences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113, E4035-E4042.
- Vaughan D.M., Calderone N.W. (2002). Assessment of pollen stores by foragers in colonies of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Insectes Soc*, 49, 23-27.
- Von Frisch K. (1923). Über die “Sprache” der Bienen, eine tierpsychologische Untersuchung. *Zool Jahrb, Abt Allg Zool Physiol Tiere*, 40, 1-186.
- von Frisch K. (1967). *Dance Language and Orientation of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge.
- Vogel S. (1983). Ecophysiology of zoophilic pollination. En: *Physiological plant ecology III, (encyclopedia of plant physiology)* (pp 559–624). Ed. Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Weber M. (1996). The existence of a special exine coating in *Geranium robertianum* pollen. *Int J Plant Sci*, 157, 195-202.
- Weiner C.N., Hilpert A., Werner M., et al. (2010). Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees. *Apidologie*, 41, 476-487.
- Wenner A.M., Wells P.H., Johnson D.L. (1969). Honey bee recruitment to food sources: olfaction or language? *Science*, 164, 84-86.
- Wiermann R., Gubatz S. (1992). Pollen wall and sporopollenin. En: *International Review of Cytology* (pp. 35-72). Academic Press.
- Wille H., Wille M., Kilchenmann V., et al. (1985). Pollenernete und Massenwechsel von drei *Apis mellifera*-Völkern auf demselben Bienenstand in zwei aufeinanderfolgenden Jahren. *Rev Suisse Zool*, 92, 897-914.
- Williams C.S. (1998). The identity of the previous visitor influences flower rejection by nectar-collecting bees. *Anim Behav*, 56, 673-681.
- Wilson E.O. (1971). *The insect societies*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Winfree R., Aguilar R., Vázquez D.P., et al. (2009). A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, 90, 2068-2076.

Winston M.L. (1987). *The biology of the honey bee*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Wright G.A., Mustard J.A., Simcock N.K., et al. (2010). Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. *Curr Biol*, 20, 2234-2240.

Wright G.A., Nicolson S.W., Shafir S. (2018). Nutritional physiology and ecology of honey bees. *Ann Rev Entomol*, 63, 327-344.

Zarchin S., Dag A., Salomon M., et al. (2017). Honey bees dance faster for pollen that complements colony essential fatty acid deficiency. *Behav Ecol Sociobiol*, 71, 1-11.

zu Oettingen-Spielberg T. (1949). Über das Wesen der Suchbiene. *Z verg Physiol*, 31, 454-489.

ANEXO

8.1. Capítulo 2

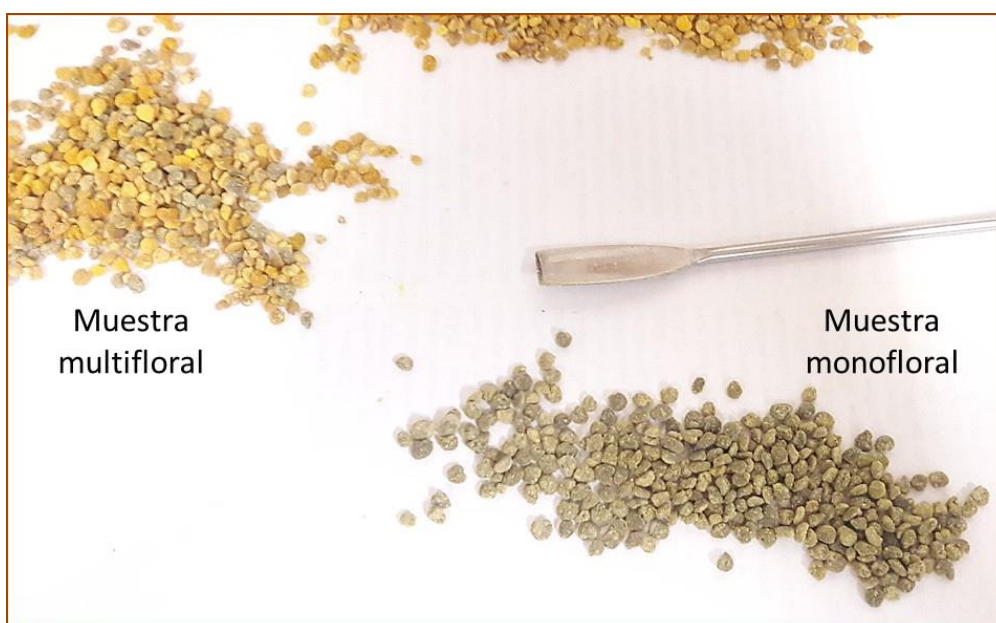


Figura A2.1. Proceso de obtención de muestras de polen monofloral a partir de muestras multiflorales. Los pólenes de zarzamora (en la foto) y sauce se separaron de muestras de polen multifloral de abeja proveniente de la Isla del Delta (Buenos Aires), según su color, brillo, textura y grado de aglutinación.

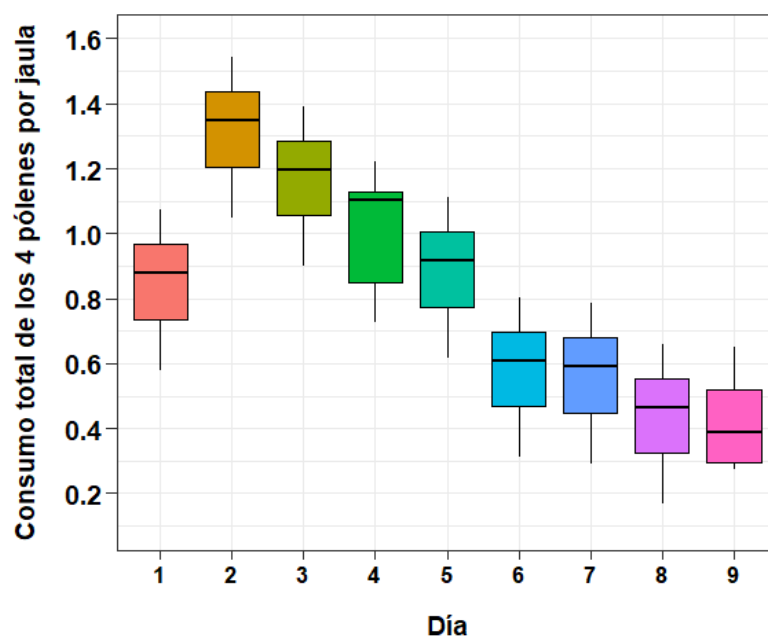


Figura A2.2. Volumen total (ml) de consumo de los cuatro pólenes ofrecidos en las cajas de abejas jóvenes durante los 9 días de experimentación (N cajas = 8). Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja y los bigotes que simbolizan la mediana, el rango intercuartil y el rango de datos, respectivamente.

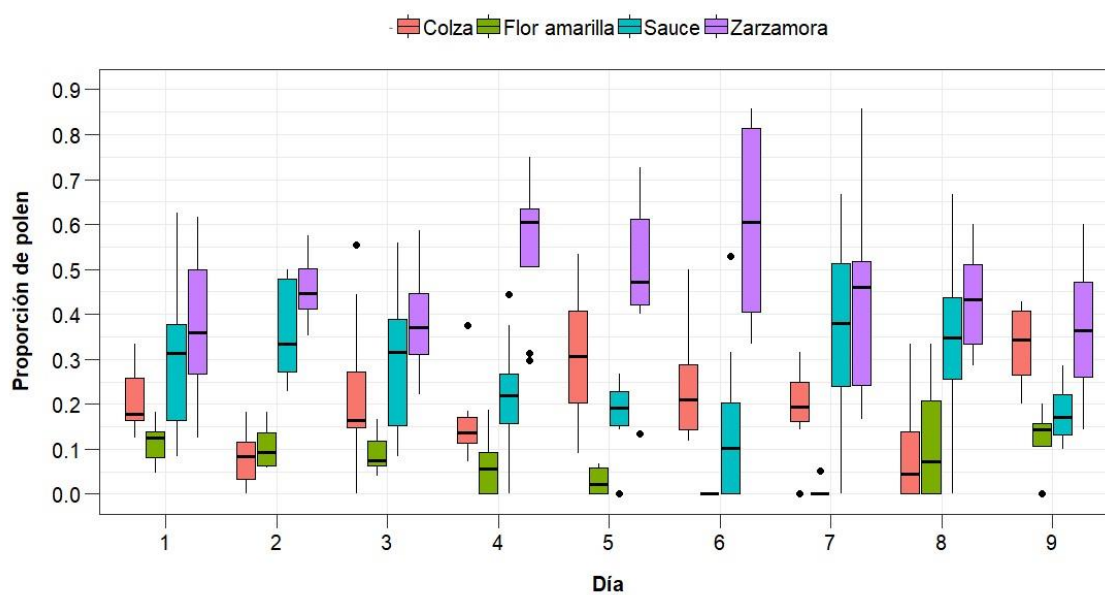


Figura A2.3. Proporción de cada polen seleccionado por las abejas jóvenes durante los 9 días de alimentación. Las proporciones de consumo del día 1 y 2 fueron consideradas respuestas de abejas naive y experimentadas, respectivamente. La proporción se calculó como el consumo relativo de cada polen: *mililitros del alimentador X_i /mililitros totales de todos los alimentadores en la caja* (N cajas = 8). Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente.

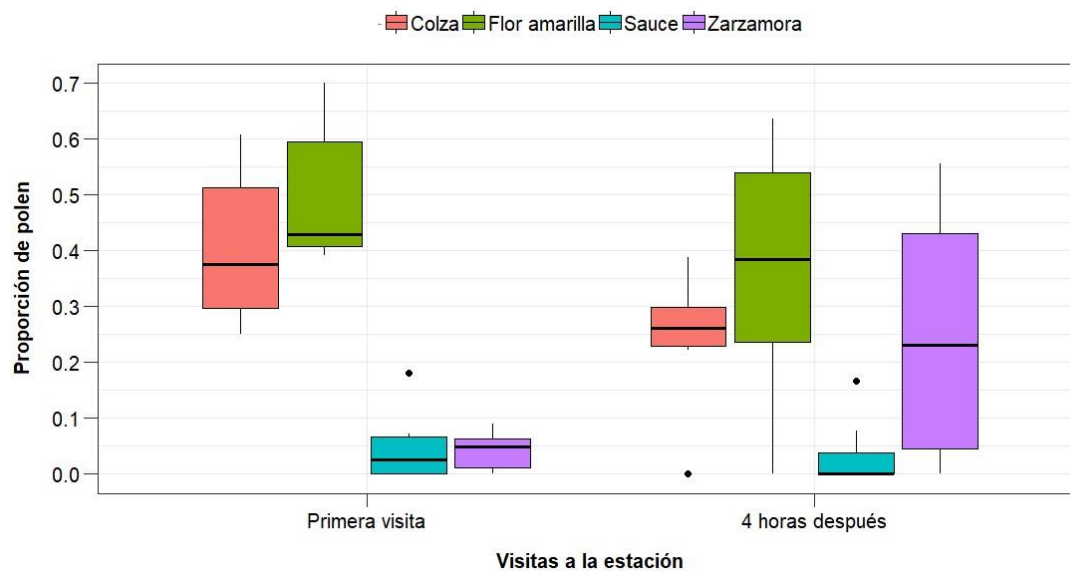


Figura A2.4. Proporción de cada polen seleccionado por las recolectoras que visitaron la estación por primera vez y las que visitaron la estación después de cuatro horas. Para el cálculo de la proporción se consideró la duración de visita: *segundos en el alimentador X_i / segundos totales en la estación* (N estaciones = 13). Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente.

Tabla A2.1. Tabla resumen del ACP para la matriz básica de datos de elección de polen. Se muestran los cuatro componentes principales (CP), sus eigenvalores, el porcentaje de variación explicada por cada componente (% VE) y el porcentaje acumulado.

CP	Autovalor	% VE	% acumulado
Comp. 1	2,423	60,569	60,569
Comp. 2	0,872	21,789	82,358
Comp. 3	0,705	17,629	99,999
Comp. 4	0,000	0,000	100

Tabla A2.2. *Loadings* (o cargas) de los dos primeros componentes principales para cada una de las variables de la base de datos, es decir los pólenes.

Variable	Comp. 1	Comp. 2
<i>Flor amarilla</i>	0,490	0,652
<i>Colza</i>	0,484	-0,669
<i>Sauce</i>	-0,502	-0,262
<i>Zarzamora</i>	-0,523	0,243

8.2. Capítulo 3

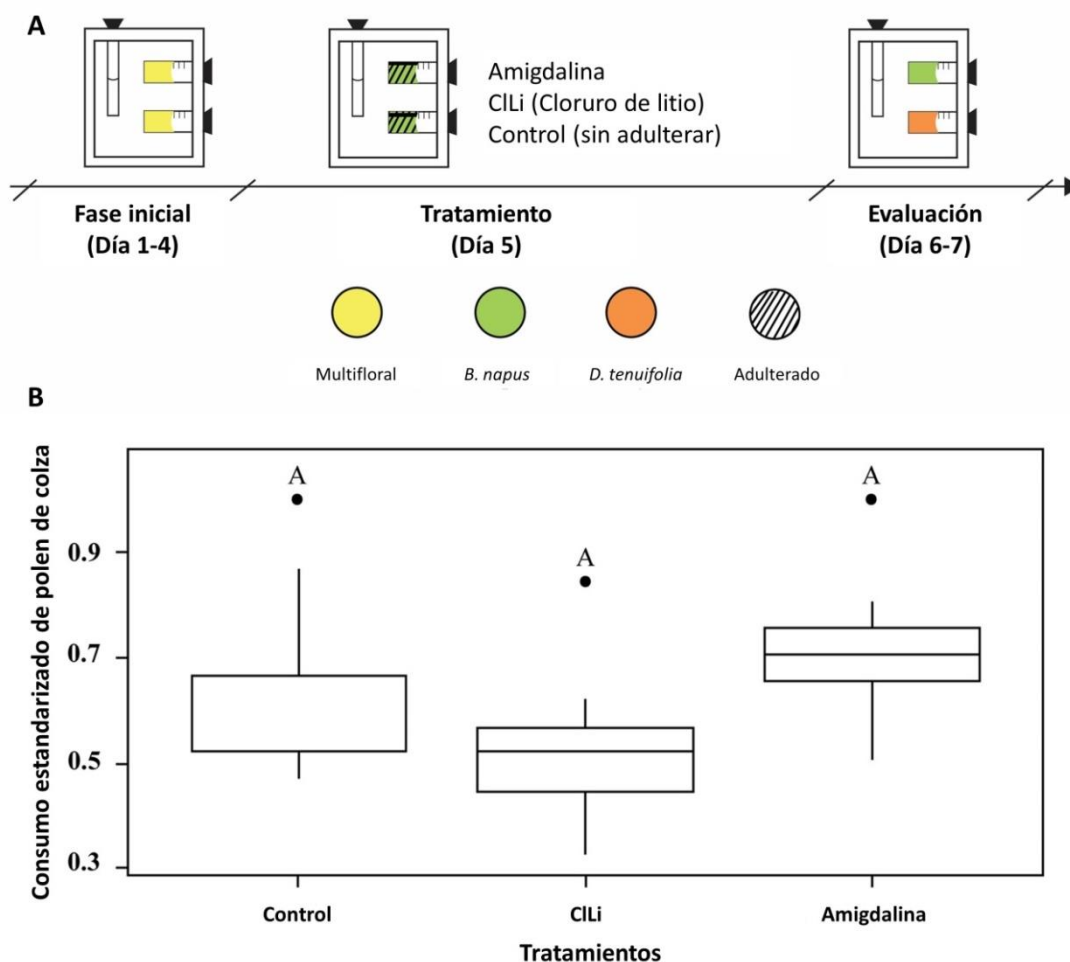


Figura A3.1. Efectos de un único polen adulterado sobre las preferencias de consumo de las abejas jóvenes confinadas en cajas **A)** Esquema del procedimiento seguido en el experimento que muestra las fases experimentales (y los días en que tuvieron lugar) y los pólenes utilizados. Durante los primeros cuatro días de vida adulta, las abejas confinadas en cajas recibieron polen multifloral *ad libitum* (fase inicial). Siempre se ofreció solución azucarada *ad libitum* a través de tubos de plástico de 10 ml. Al quinto día y durante 24 horas, se sustituyó el polen multifloral por 4 ml de polen de colza adulterado con amigdalina o cloruro de litio (tratamiento). Las cajas control recibieron polen de colza sin adulterar. Durante las 48 horas siguientes, las abejas recibieron polen de colza y de flor amarilla (polen novedoso), ambos sin adulterar

(evaluación). Se registró el volumen (ml) consumido de cada polen durante las últimas 24 horas de la fase de evaluación y se calculó el consumo estandarizado (CE) de polen de colza (consumo de colza relativo al consumo total de polen de colza más flor amarilla). **B)** Consumo estandarizado de polen de colza después de que las jaulas experimentaran el polen sin adulterar (Control, N = 8) o adulterado con una sustancia nociva (CILI, N = 7; o amigdalina, N = 7). Se utilizó un modelo de regresión lineal en R para la variable CE con distribución normal, en el que se exploró el impacto del tratamiento (Control, Amigdalina y CILI) como efecto fijo, y se incluyó el consumo total de polen como offset. Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Tratamientos: $F_{2;20} = 0,5267$, $P = 0,5985$).

Tabla A3.1. Consumo de polen en abejas confinadas en cajas que experimentaron un único polen adulterado. Volumen (ml) de polen consumido durante el tratamiento, cuando las abejas recibieron polen de colza (*B. napus*) adulterado con una sustancia nociva (CILI o amigdalina) o sin adulterar (control), y durante la evaluación, cuando las abejas recibieron polen de colza y de flor amarilla (*D. tenuifolia*), ambos sin adulterar.

Tratamiento	n	Consumo (ml)		
		Tratamiento	Evaluación	
		Colza	Flor amarilla	Colza
Control	8	0,39±0,07	0,11±0,04	0,21±0,05
CILI	7	0,30±0,09	0,14±0,04	0,17±0,05
Amigdalina	7	0,13±0,03	0,06±0,02	0,25±0,06

La tabla muestra el consumo medio de polen obtenido en cajas de abejas compuestas por 80 individuos de edad conocida.

Tabla A3.2. Consumo y preferencias de polen en abejas enjauladas que experimentaron cambios en la calidad de los pólenes ofrecidos. Volumen (ml) consumido de polen de colza (*B. napus*) y de flor amarilla (*D. tenuifolia*) antes (preferencia inicial), durante (tratamiento) y después (evaluación) de ofrecerles polen de colza (A) o de flor amarilla (B) adulterado (con ácido linoleico, amigdalina o quinina) o sin adulterar (control).

A.

Serie Colza	n	Preferencia inicial			Tratamiento			Evaluación		
		Consumo (ml)		CE	Consumo (ml)		CE	Consumo (ml)		CE
		Flor amarilla	Colza		Flor amarilla	Colza		Flor amarilla	Colza	
Control	6	0,13±0,03	0,30± 0,06	0,66± 0,11	0,08±0,03	0,50± 0,04	0,88± 0,05	0,08±0,02	0,40± 0,05	0,82± 0,06
Ácido linoleico	5	0,33±0,05	0,18± 0,10	0,30± 0,14	0,27±0,05	0,24± 0,09	0,44± 0,11	0,12±0,03	0,16± 0,03	0,58± 0,05
Amigdalina	4	0,19±0,09	0,41± 0,06	0,71± 0,12	0,46±0,05	0,01± 0,01	0,02± 0,02	0,33±0,06	0,11± 0,07	0,20± 0,08
Quinina	5	0,37±0,08	0,31± 0,07	0,46± 0,08	0,35±0,06	0,04± 0,02	0,10± 0,04	0,25±0,04	0,08± 0,01	0,24± 0,03

B.

Serie flor amarilla	n	Preferencia inicial			Tratamiento			Evaluación		
		Consumo (ml)		CE	Consumo (ml)		CE	Consumo (ml)		CE
		D. <i>tenuifolia</i>	B. <i>napus</i>		D. <i>tenuifolia</i>	B. <i>napus</i>		D. <i>tenuifolia</i>	B. <i>napus</i>	
Control	5	0,17±0,06	0,37± 0,04	0,30± 0,09	0,12±0,03	0,62± 0,07	0,16± 0,03	0,11±0,02	0,38± 0,04	0,22± 0,03
Ácido linoleico	6	0,22±0,05	0,13± 0,07	0,74± 0,13	0,18±0,03	0,41± 0,06	0,31± 0,05	0,13±0,04	0,18± 0,04	0,39± 0,10
Amigdalina	4	0,28±0,09	0,25± 0,10	0,54± 0,21	0,06±0,02	0,40± 0,09	0,16± 0,07	0,13±0,06	0,23± 0,01	0,30± 0,12
Quinina	5	0,21±0,10	0,31± 0,08	0,33± 0,13	0,04±0,02	0,58± 0,09	0,07± 0,03	0,01±0,01	0,29± 0,05	0,04± 0,04

Las tablas muestran el consumo medio de polen obtenido en cajas de abejas compuestas por 80 individuos de edad conocida.

Tabla A3.3. Consumo y preferencias por los pólenes en las colonias. Volumen (ml) consumido de dos pólenes monoflorales diferentes (Polen A y B), antes (preferencia inicial) y después (evaluación) de que se ofreciera el Polen A adulterado (ácido linoleico, amigdalina o quinina) o sin adulterar (control) durante el tratamiento. También se cuantificó el consumo de Polen A en el tratamiento.

Tratamiento	n	Preferencia inicial			Tratamiento	Evaluación		
		Consumo (ml)		CE	Consumo(ml)	Consumo (ml)		CE
		Polen A	Polen B		Polen A	Polen A	Polen B	
Control	6	3,53± 0,47	3,50± 0,45	0,50± 0,04	6,53±0,70	3,03± 0,42	2,97± 0,28	0,50± 0,03
Ácido linoleico	5	1,98± 0,58	2,00± 0,56	0,50± 0,03	6,42±0,62	2,74± 0,71	2,44± 0,48	0,52± 0,05
Amigdalina	6	3,27± 0,75	2,83± 0,54	0,52± 0,03	5,27±0,98	2,62± 0,76	3,70± 0,41	0,38± 0,09
Quinina	7	4,40± 0,39	2,89± 0,23	0,6± 0,02	7,08±0,68	2,40± 0,55	3,51± 0,43	0,38± 0,05

La tabla muestra el consumo medio de polen obtenido en varias colmenas Langstroth de diez cuadros que permanecieron abiertas durante el experimento.

8.3. Capítulo 4

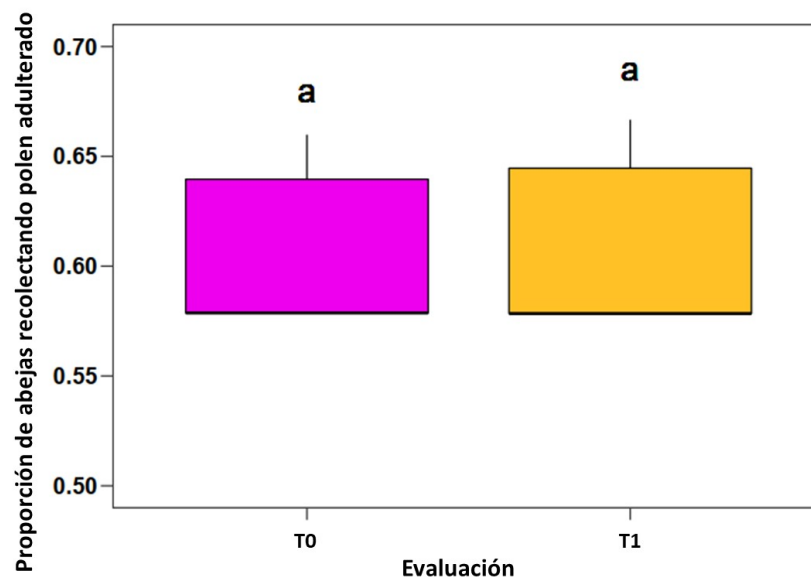


Figura A4.1. Preferencias de recolección entre 2 pólenes que se presentaron en el sitio de recolección en forma de pasta (hidratados), antes (T0) y después (T1) de adulterar uno de ellos con amigdalina. Las preferencias se establecieron utilizando 2 combinaciones de 2 pólenes cada una. Se utilizó la combinación flor amarilla frente a colza en una combinación (tamaño de la muestra: 4 colonias) y quebracho frente a girasol en la otra (tamaño de la muestra: 2 colonias). Los pólenes se ofrecieron hidratados y adheridos a los limpiapipas. En T0 los pólenes se ofrecieron sin adulterar. En T1, la flor amarilla y el quebracho se ofrecieron adulterados. Las preferencias de recolección se establecieron como el número de las recolectoras que eligieron el polen adulterado, sobre el número total de elecciones (ver materiales y métodos del experimento I en 4.2.3) para cada combinación. Las diferencias en las preferencias de recolección antes (T0) y después (T1) se abordaron mediante GLMM, con distribuciones binomiales. Se exploró el impacto del tiempo (T0 vs. T1) y la combinación de polen (Flor amarilla - Colza vs. Quebracho - Girasol) como efectos fijos. Las preferencias de recolección difirieron entre combinaciones (combinación de polen $\text{Chisq} = 5,937$, $\text{df} = 1$, $P = 0,014$), pero no difirieron antes y después del tratamiento (Tiempo $\text{Chisq} = 0,007$, $\text{df} = 1$, $P = 0,932$). La interacción no fue significativa (Tiempo*polen $\text{Chisq} = 0,011$, $\text{df} = 1$, $P = 0,916$; $N = 6$). Como en el experimento I (4.3.1), los resultados indican que las abejas no evitaron el polen adulterado. Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. La misma letra indica que no hay diferencias significativas.

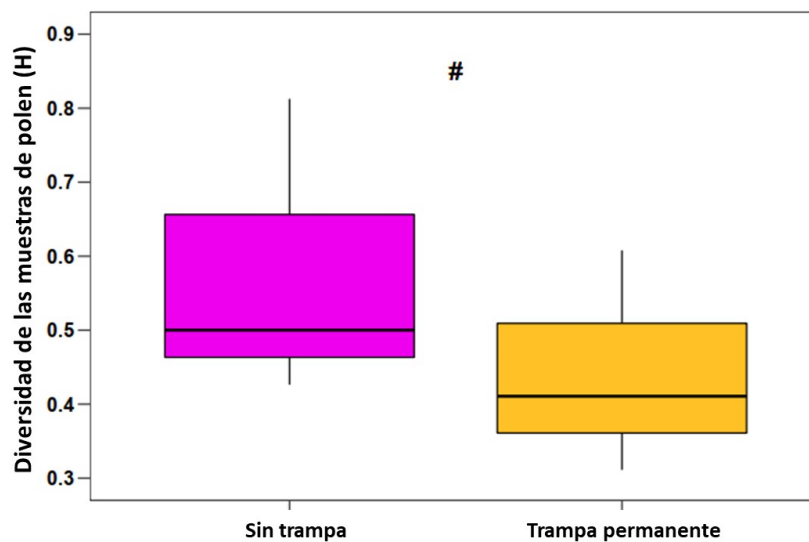
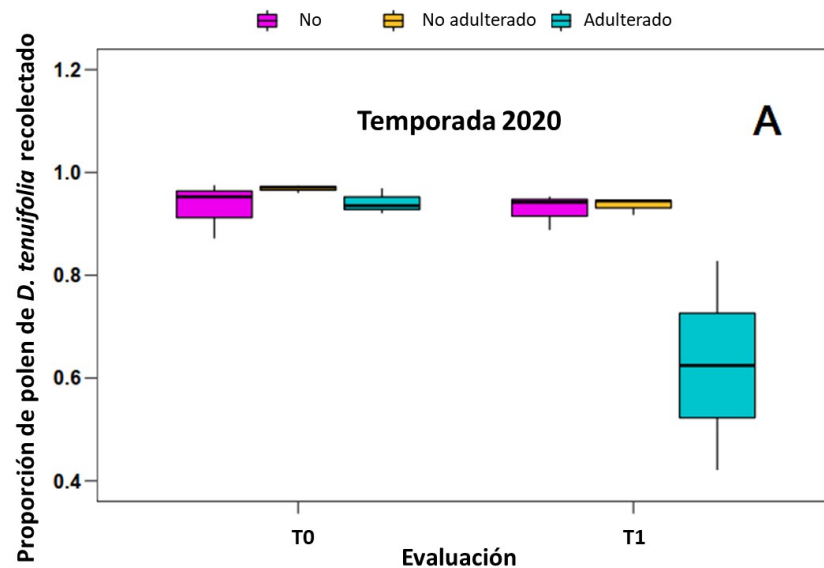


Figura A4.2. Diversidad de pólenes recolectados de colonias a las que se les impidió (o no) el ingreso de polen durante 3 días consecutivos. El índice de diversidad de Shannon (H) se calculó a partir de muestras de polen recogidas de colonias que: i) introdujeron libremente el polen en sus nidos (Sin trampa: 3) o ii) de colonias en las que se restringió el ingreso de polen mediante el uso permanente de trampas (Trampa permanente: 3). Se evaluaron las diferencias en el índice H mediante GLM con distribución normal y se exploró el efecto de la privación de polen (Tratamiento: Sin trampas vs. Trampas permanentes) como factor fijo. Los valores iniciales de H se utilizaron como covariable (ver material y métodos del experimento III en 4.2.5). Los resultados indican una diferencia moderadamente significativa debida a la privación del consumo de polen (Tratamientos $F = 7,452$, $df = 1$, $P = 0,071$). Los resultados muestran que el uso de trampas redujo la diversidad del polen recolectado. El diagrama de caja muestra el rango intercuartil y la mediana. # indica una diferencia moderadamente significativa entre tratamientos ($P < 0,1$) que podría ser biológicamente relevante.



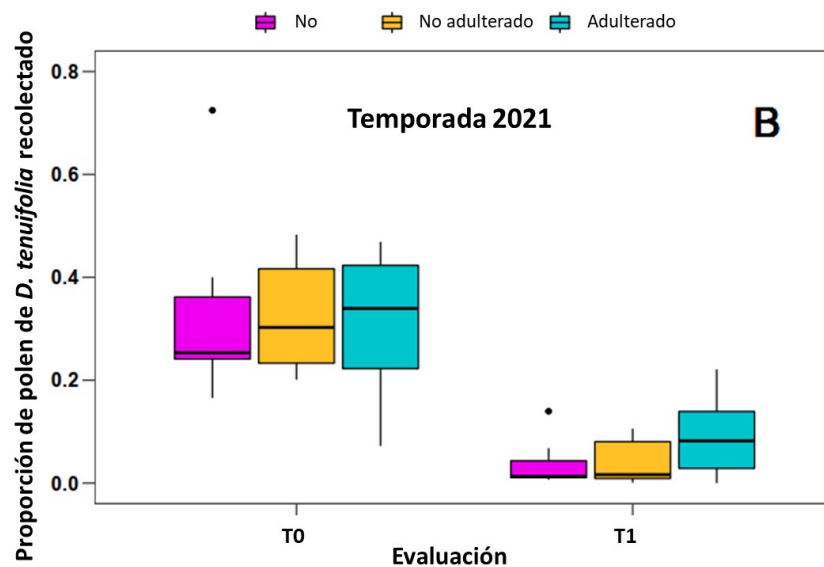


Figura A4.3. Proporción de polen de *D. tenuifolia* recolectado en colonias tratadas sin polen, con polen de *D. tenuifolia* adulterado o sin adulterar. La proporción de polen de *D. tenuifolia* se calculó como la cantidad de polen de *D. tenuifolia* en relación con el peso total de la muestra de polen obtenida 1 día antes (T0) y 2 días después (T1) de los tratamientos para la temporada 2020 (A) y 2021 (B). Debido al bajo número de colonias analizadas en la temporada 2020 (3 colonias para el tratamiento sin polen, 3 para el tratamiento sin adulterar y 2 para el tratamiento adulterado), no se realizó un análisis estadístico. Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente.

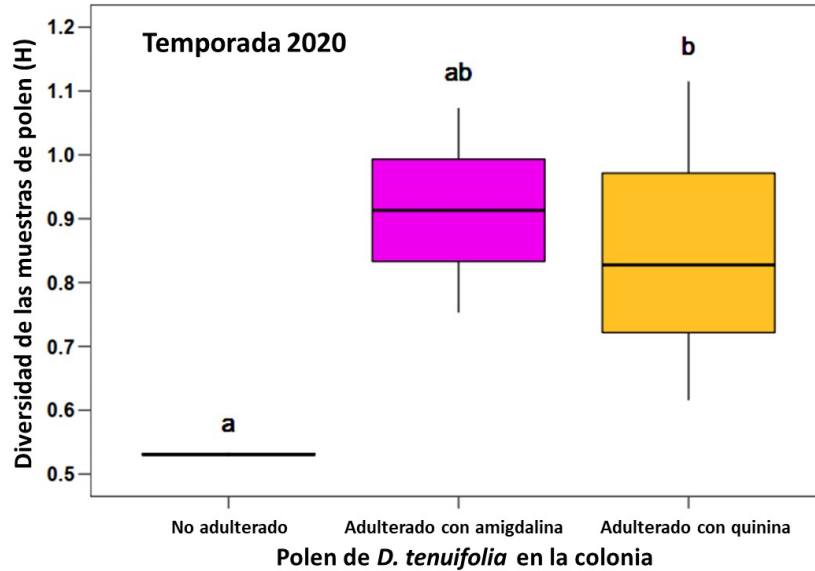


Figura A4.4. Diversidad de pólenes recogidos en colonias que reciben polen adulterado de *D. tenuifolia* dentro del nido durante la temporada 2020. El índice de diversidad de Shannon (H) se calculó a partir de muestras de polen recogidas en colonias a las que se suministró: i) polen de *D. tenuifolia* no adulterado (No adulterado: 3), ii) polen de *D. tenuifolia* adulterado con amigdalina (Adulterado con amigdalina: 3) o iii) polen de *D. tenuifolia* adulterado con quinina (Adulterado con quinina: 3). Se evaluaron las diferencias en el índice H mediante GLM con distribución normal y se exploró el efecto del polen ofrecido dentro del nido (Tratamiento: No adulterado, adulterado con amigdalina y adulterado con quinina) como factor fijo. Los valores iniciales de H se utilizaron como covariable (ver material y métodos del experimento III en 4.2.5). Los resultados muestran que la adulteración del polen aumentó la diversidad del polen recolectado (Tratamientos: $F = 10,163$, $df = 2$, $P = 0,02704$). El análisis estadístico detectó diferencias significativas en el índice H entre las colonias tratadas con polen adulterado con quinina y las colonias con polen no adulterado (No adulterado - adulterado con quinina: $t\text{-ratio} = -3,896$, $df = 4$, $P = 0.037$), pero no entre las colonias con polen no adulterado y las colonias abastecidas con polen adulterado con amigdalina (No adulterado - Adulterado con amigdalina: $t\text{-ratio} = -2.411$, $df = 4$, $P = 0,1489$) o entre colonias suministradas con polen adulterado con amigdalina y polen adulterado con quinina (adulterado con amigdalina - adulterado con quinina: $t\text{-ratio} = -0,869$ $df = 4$, $P = 0,6857$). Los diagramas de caja muestran la línea central, la caja, los bigotes y los puntos que simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

8.4. Capítulo 5

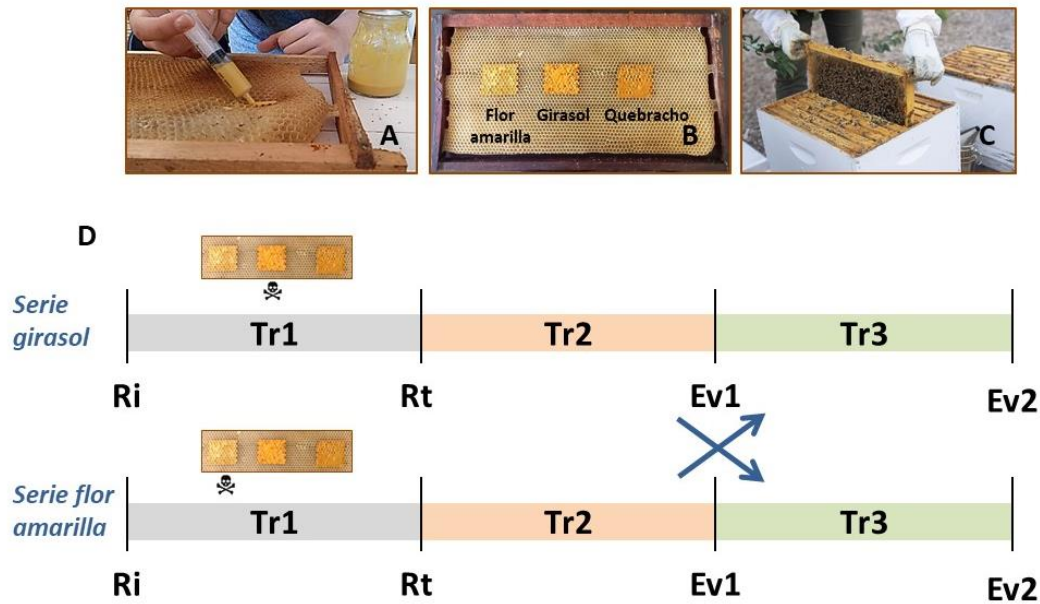


Figura A5.1. Imágenes de **A)** proceso de incorporación del polen previamente triturado e hidratado en las celdas de un panal; **B)** panal con polen de flor amarilla, girasol y quebracho; **C)** extracción del panal previamente colocado en una colmena para su reemplazo a otra colmena durante la fase de transferencia. **D)** Esquema del procedimiento seguido en el experimento: en una colmena de cada serie se colocó un panal con los pólenes (se utilizaron 6 pares de colmenas). Luego de 18-20 horas se retiraron y se registraron las respuestas de consumo iniciales (número de celdas consumidas de cada polen sobre el total de celdas ofrecidas; Ri). Para la fase Tr1, se generaron nuevos cuadros en donde uno de los pólenes (flor amarilla o girasol) se adulteró con quinina (0,1 M). Luego de 18 horas, se retiraron los cuadros y se midió la respuesta de consumo al tratamiento (Rt). En la fase Tr2, se ofrecieron nuevos cuadros con los tres pólenes sin adulterar, los cuales permanecieron por 18-20 horas en la colmena experimentada antes de retirarlos y medir el consumo (Ev1). En Tr3 (fase de transferencia) los cuadros que fueron retirados luego de Ev1 provenientes de colonias de la *serie flor amarilla*, fueron reintroducidos en colonias de la *serie girasol* y viceversa (indicado con flechas). Luego de 18 horas, se midió el consumo de los pólenes en los cuadros transferidos (Ev2).

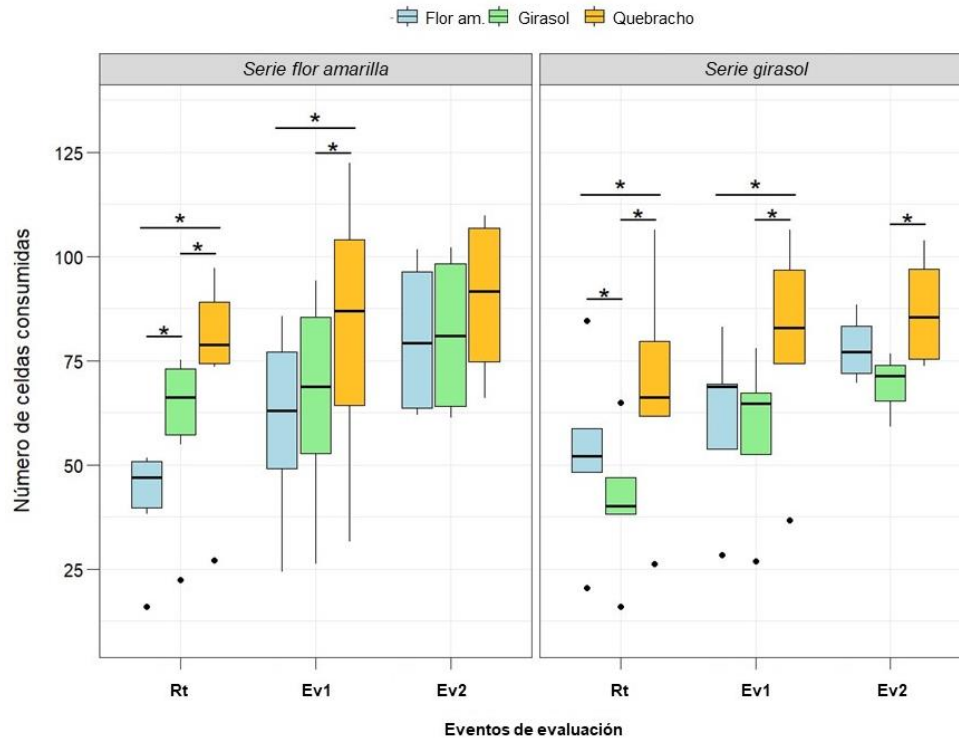


Figura A5.2. Número de celdas de polen consumidas en cada evento de evaluación y para cada tipo de polen ofrecido. Las diferencias en las elecciones de consumo se abordaron mediante un MLGM con distribución poisson en R. Se investigó el impacto del evento de evaluación (Rt, Ev1 y Ev2), la serie experimental (flor amarilla y girasol) y la identidad de polen (quebracho, flor amarilla y girasol) como efectos fijos y su interacción. La colmena fue incluida como factor aleatorio, las preferencias iniciales (Ri) como covariable y las celdas totales consumidas como offset. Los diagramas de caja muestran la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($P < 0,05$). El número de celdas de polen consumidas varió significativamente según la serie, la identidad del polen contenido en las celdas y el evento de evaluación (Serie*Evento*Polen: $\text{Chisq} = 10,073$, $\text{Df} = 4$, $P = 0,039$). La respuesta de consumo luego del tratamiento (Rt), coincide con una fuerte disminución del consumo del polen adulterado en cada serie en relación con los dos pólenes que se ofrecieron sin adulterar. En la evaluación del aprendizaje (Ev1), el consumo del polen de girasol y el de flor amarilla no se diferenciaron para ninguna de las series y a la vez, ambos pólenes se diferenciaron significativamente del polen de quebracho, el cual fue consumido en mayor proporción. Por último, luego de la transferencia (Ev2) las diferencias se perdieron, con excepción del consumo de polen de girasol en relación con el de quebracho en la *serie girasol*, posiblemente como manifestación de una memoria a largo plazo. Por lo tanto, no se encontró evidencia de alguna marca que modifique el consumo de un polen en particular por las abejas jóvenes.