



HAL
open science

Is floral-trait variation related to pollinisation in deceptive orchids ?

Joao Marcelo Aguiar

► **To cite this version:**

Joao Marcelo Aguiar. Is floral-trait variation related to pollinisation in deceptive orchids?. Neuroscience. Université Paul Sabatier - Toulouse III; Universidade estadual de Campinas (Brésil), 2019. Portuguese. NNT: 2019TOU30130 . tel-02930797

HAL Id: tel-02930797

<https://theses.hal.science/tel-02930797v1>

Submitted on 4 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier
Cotutelle internationale : Université d'État de Campinas

Présentée et soutenue par
Joao Marcelo AGUIAR

Le 26 août 2019

**La variation des attributs floraux est-elle liée à la pollinisation
des orchidées trompeuses?**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **NEUROSCIENCES**

Unité de recherche :

CRCA - Centre de Recherches sur la Cognition Animale

Thèse dirigée par

Martin GIURFA et Marlies Sazima

Jury

M. Thibaud Monnin, Rapporteur

M. Michael Hrcir, Rapporteur

Mme Isabel Alves dos Santos, Rapporteur

M. Fábio Pinheiro, Examineur

M. Martin GIURFA, Directeur de thèse

Mme Marlies Sazima, Co-directrice de thèse

Às minhas avós, Lucia e Luiza

Agradecimentos

Essa tese de doutorado tem como base uma interação ecológica que permite a formação de frutos, focando no processo de aprendizado envolvido. Da mesma maneira, durante esse período de quatro anos e meio como doutorando passei por um processo de grande aprendizado profissional e pessoal e, agora, apresento o fruto dessa trajetória. Gostaria de agradecer a todos que fizeram parte das interações que me trouxeram até aqui.

Primeiramente, gostaria de agradecer meus orientadores, Profa. Marlies Sazima, Dra. Ana Carolina Roselino e Prof. Martin Giurfa, que me permitiram trabalhar e estudar sobre o tema proposto. Agradeço por todos os ensinamentos, discussões, conselhos e por aceitarem compartilhar comigo todo o conhecimento que possuem. Obrigado por serem ótimos exemplos de pesquisadores, professores e pessoas.

Gostaria de agradecer também as instituições de fomento que financiaram essa pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos 2015/05919-8 e 2016/17128-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ; processo 140781/2015-3), e Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Esse trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço as instituições de pesquisa que abriram as portas para que os meus experimentos pudessem ser realizados, assim como a todos os seus funcionários que lidaram com as questões burocráticas necessárias para a realização dessa tese, assim como para firmar o acordo de cotutela. Obrigado Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Universidade de São Paulo (USP), campi Ribeirão Preto e Piracicaba, e Université Paul Sabatier – Toulouse III.

Agradeço também todos os outros pesquisadores que trabalharam comigo nos capítulos da tese, participando ativamente nos experimentos, análises e discussões dos resultados, assim como na escrita dos artigos, dos quais farão parte como autores. Obrigado MSc. Patricia Alessandra Sanches, Dr. José Maurício Simões Bento, Dr. Jean-Christophe Sandoz, Dr. Thierry Louis, Dr. Vinícius Lourenço Garcia de Brito, Dra. Francismeire Jane Telles e MSc. Pedro Joaquim Bergamo.

Gostaria de agradecer os membros do meu Comitê de Acompanhamento, Dr. Martin Pareja, Dr. Fábio Pinheiro e Dr. Paulo Oliveira, que ao longo dos anos sempre trouxeram grandes contribuições ao meu trabalho. Também agradeço aos membros da análise prévia da

tese, Dr. Vinicius Brito, Dra. Francismeire Telles e Dr. Sidnei Mateus, pela disponibilidade e sugestões tão valiosas.

Durante esse período, conheci e trabalhei ao lado de grandes pesquisadores, que hoje considero como amigos. Muito obrigado aos colegas do laboratório da Unicamp, em especial Pedro e Nath de quem fiquei mais próximo, mas também obrigado a todos que são fruto desse maravilhoso grupo de pesquisa e que sempre promoveram ótimas discussões científicas e, dessa maneira, impulsionaram o meu crescimento acadêmico e pessoal. Um muito obrigado também ao Luiz, colega de ingresso na Unicamp que se tornou um grande amigo e conselheiro!

Obrigado aos colegas de Toulouse, em especial Maru, Paul, Alexis, Natacha, Beli, Rémi e Tamara. Vocês me receberam de uma forma muito especial em um país novo para mim. Guardo com muito carinho todas as nossas vivências juntos. Gostaria de agradecer também o Guillaume, com quem me identifiquei desde o primeiro momento, mesmo num ambiente tão incomum. Quem diria que o cara que abriu minha conta no banco, seria hoje um dos meus melhores amigos.

Obrigado aos colegas da Casa 39, Profs. Marcelo e Adriano, Marcela, Saga, e em especial o Mixirica, meu grande amigo há mais de dez anos. Agradeço também meu amigo Sidinei, um cara sempre a disposição para te ajudar, sempre com um sorriso contagiante no rosto.

Outros amigos, de longa data, também fizeram parte desse processo. Muito obrigado Bibão, Dodo, Fefaum, Aninha, Mário, Lu e em especial o Bruno, meu irmão bem mais velho, que sempre esteve ao meu lado. Amo todos vocês. Também agradeço aos meus amigos da Bio Ribeirão, que surpreendentemente, depois de tudo que já viram, ainda me querem por perto. Obrigado aos queridos da XXT e aos meus BFFS, Pamonha, Mulan, Mestre, Dio, Cupu (você também é da bio), Gugu e Moema. Também amo todos vocês!

Esse agradecimento é para uma pessoa que tem cuidado de mim, e me ajudado a cuidar de mim mesmo, desde quando esse doutorado era uma ideia. Ele me incentivou e me mostrou que eu tinha força para encarar os momentos e decisões mais difíceis pelas quais já passei. Muito obrigado, Daniel.

Não posso deixar de agradecer a minha família, que sempre me deu suporte na minha vida acadêmica. Mãe, sem você nada disso teria acontecido. Obrigado por sempre me apoiar e incentivar a seguir meus sonhos. Ju, é incrivelmente feliz para mim como a distância nunca nos distanciou. Obrigado por serem exemplos de mulheres fortes na minha vida. Amo muito vocês. Obrigado também ao Curtis pelo cuidado e parceria com a minha irmã. Agradeço

também a minha segunda família, que me acolheu de braços abertos. Obrigado Paula, Luiz Henrique, Marcelo e todos os Vieiras e Madeiras. Em especial, agradeço as minhas avós, Lúcia e Luiza, a quem dedico essa tese. Parafrazeando a canção, de todo o amor que eu tenho, metade foram vocês que me deram.

Por fim, gostaria de fazer um agradecimento muito especial, talvez um dos mais importantes. Muito obrigado à minha esposa, Marina. Desde que começamos nossa caminhada juntos, você sempre participou na minha vida com muito carinho e amor. Obrigado pela parceria, pela confiança, pelo apoio, pelo cuidado, pelas discussões sobre biologia e psicologia, pelo amor. Obrigado por me ensinar a ser um homem melhor, um marido melhor, um pai de gata melhor, uma pessoa melhor. Você é meu exemplo de força e luta pelo que pode mudar o mundo. Obrigado por viver comigo os momentos mais importantes da minha vida, os bons e os ruins. Espero que a nossa interação seja para sempre assim! Quiabo.

“Se a frustração pode ser tolerada, a associação de concepção e realizações, sejam elas negativas ou positivas, dá início a procedimentos necessários para aprender com a experiência.”

“O ponto crucial está na decisão entre modificação e fuga da frustração.”

W. R. Bion – Uma teoria do pensar, 1962

Sumário

Introdução Geral	7
Capítulo 1 - O papel do polimorfismo de cor floral na polinização por engano em orquídeas	12
Capítulo 2 - As abelhas conseguem discriminar entre isômeros da fragrância floral?	37
Capítulo 3 - O perfume da memória: a dominância olfativa na fragrância floral de orquídeas polinizadas por engano e o aprendizado dos polinizadores	63
Capítulo 4 - Como treinar sua abelha: métodos aplicados à biologia cognitiva da polinização	96
Considerações Finais	121
Referências	124
Resumo	127
Abstract	129
Résumé	131

Introdução Geral

A polinização por engano ocorre quando os polinizadores são atraídos pelos atributos florais (e.g. cor e fragrância) e realizam a polinização, porém as flores não oferecem recursos (e.g. néctar e pólen) (Jersáková *et al.* 2006, Johnson & Schiestl 2016). Esse tipo de interação é bastante expressivo na família das orquídeas, em que cerca de um terço das espécies é polinizada por engano (Ackerman 1986). O conceito de polinização por engano foi elaborado por Sprengel em 1793, que utilizou o termo *schainsaftblumen* (flores de falso néctar), ao constatar, pela primeira vez, as flores sem néctar de orquídeas do gênero *Orchis* (Scopece *et al.* 2014). Darwin, por sua vez, não acreditava na possibilidade dos insetos polinizadores caírem nessa armadilha, e descreditava as observações de Sprengel ao afirmar que as pessoas que seguissem a doutrina desse pesquisador deveriam levar em conta o conhecimento instintivo dos polinizadores (Darwin 1877). Para explicar a ausência de néctar evidente, ele então propôs que o recurso estaria entre as membranas das paredes do nectário, e que os insetos seriam capazes de obter alimento ao quebra-las (Scopece *et al.* 2014).

Atualmente, sabemos que várias espécies são polinizadas por engano, e ele pode ocorrer por diversos mecanismos (Jersáková *et al.* 2006), como engano sexual, quando a flor imita feromônio da fêmea de um inseto e é polinizada por machos dessa espécie (Gaskett 2011), ou o engano de alimento Batesiano, em que as flores da orquídea imitam outra espécie de planta com recursos de alimentação, da comunidade na qual está inserida (Papadopulos *et al.* 2013). Nesses casos, as flores enganosas produzem atributos florais que mimetizam a fragrância e/ou a cor de seus modelos (Johnson & Schiestl 2016). No entanto, o mecanismo mais comum de polinização por engano em orquídeas é o engano generalizado de alimento (Jersáková *et al.* 2006). Nesse mecanismo, as flores sem recurso possuem atributos florais conspicuos e atrativos aos polinizadores, porém sem imitar algum modelo em específico, dessa forma atraindo o maior número possível de polinizadores diferentes (Jersáková *et al.* 2006, Johnson & Schiestl 2016).

As orquídeas polinizadas por engano generalizado de alimento comumente apresentam variação intraespecífica nos seus atributos florais (Jersáková *et al.* 2006, Juillet & Scopece 2010). Em outras palavras, os sinais florais atrativos aos polinizadores variam de um indivíduo para o outro em uma população da mesma espécie de orquídea. Existem vários trabalhos que descrevem nessas orquídeas o polimorfismo na cor floral (Gigord *et al.* 2002, Salzmann & Schiestl 2007, Smithson *et al.* 2007, Ackerman *et al.* 2011, Aguiar & Pansarin

2019) assim como na fragrância (Salzmann & Schiestl 2007, Salzmann *et al.* 2007, Salzmann *et al.* 2007, Ackerman *et al.* 2011).

Ao observar no campo uma população de *Calopogon pulchellus*, Heinrich (1975) notou que essa orquídea polinizada por engano possuía uma variação conspícua em sua cor floral. No seu trabalho, Heirich sugere que a habilidade em enganar dessas orquídeas seria aprimorada ao apresentar variação na cor. Levando em consideração o aprendizado dos polinizadores em evitar as espécies enganosas, quanto mais diferentes as flores sem recurso de uma mesma espécie, mais tempo levaria para os polinizadores aprenderem a associar todos esses sinais com a ausência de recursos. Isso levaria a um maior número de flores visitadas e a manutenção da polinização nessas espécies. Alguns estudos já buscaram testar experimentalmente as sugestões propostas por esse pesquisador, que atualmente são reunidas na chamada hipótese de Heinrich. Juillet & Scopece (2010) fizeram uma revisão dos trabalhos investigando essa questão, e mostram que nenhum deles traz evidências robustas que suportem a hipótese de Heinrich. No entanto, esses estudos investigam essa hipótese a partir de uma perspectiva do sucesso reprodutivo das plantas, sendo as respostas a quantidade de frutos produzidos ou remoção de pólen, por exemplo. Dessa forma, a capacidade cognitiva dos polinizadores foi pouco explorada para testar a hipótese de Heinrich até o momento. Se levarmos em consideração que o processo de engano se dá no momento da escolha da flor pelo polinizador, e não no momento da formação de frutos, por exemplo, fica claro o quão importante seriam os estudos que investigam essa questão a partir de uma perspectiva do polinizador.

De fato, os polinizadores são capazes de aprender a visitar as flores e associar seus atributos florais com a presença ou ausência de recursos. As abelhas, em especial, possuem habilidades cognitivas comparáveis a dos vertebrados, mesmo com um cérebro de tamanho reduzido (Giurfa 2007). Desde 1914, com os experimentos de Karl von Frisch, sabemos que as abelhas são capazes de ver em cores (Frisch 1914) e diversos trabalhos de treinamento e comportamento já demonstraram capacidades cognitivas relevantes desses insetos para o contexto da polinização, como a generalização e a discriminação entre estímulos visuais e olfativos (Giurfa 2007). As abelhas são interessantes modelos de aprendizado e memória, uma vez que essas capacidades estão intrinsecamente relacionadas ao seu modo de vida. Esses insetos identificam as fontes de alimento utilizando os sinais emitidos pelas flores, chamados de atrativos florais, como cores e fragrâncias, e devem aprender a associar tais sinais com a presença ou ausência de recurso (Giurfa 2007, Brito *et al.* 2014).

Estudos de aprendizado animal são realizados há décadas. Um dos protocolos mais conhecidos de condicionamento foi o proposto por Pavlov (1927). Nesse tipo de treinamento, chamado condicionamento clássico, o objetivo é testar o aprendizado associativo, onde o animal aprende a associar um determinado sinal (estímulo condicionado) com uma recompensa (estímulo não condicionado), a partir de uma resposta inata. Nos experimentos clássicos de Pavlov, ele observou que ao apresentar alimento a um cachorro, ele começava imediatamente a salivar. Ele testou a associação entre um toque de um sino (estímulo condicionado) e a apresentação de alimento (estímulo não condicionado), enquanto que a resposta era a salivação do animal (resposta inata). Após algumas apresentações do conjunto sino-alimento, o animal aprende a associação que o estímulo condicionado precede a apresentação do estímulo não condicionado. Dessa maneira, após o treinamento apenas o toque do sino, sem a apresentação do alimento, já desencadeava a salivação do animal. Outro exemplo de treinamento para avaliar o aprendizado associativo, também muito conhecido, é o condicionamento operante (Skinner 1938), em que a recompensa só é disponibilizada ao animal após uma mudança em seu comportamento. Nos experimentos de Skinner, um rato deveria aprender que pressionar uma alavanca (comportamento) levaria a um reforço positivo (alimento) ou negativo (choque elétrico). No caso do reforço positivo, o animal aumentaria a frequência do comportamento, enquanto que no reforço negativo, a frequência era diminuída, evidenciando uma mudança no comportamento do animal, de acordo com o tipo de condicionamento empregado (apetitivo ou aversivo).

Ambas as formas de condicionamento podem ser utilizadas com abelhas como modelo animal. Para o condicionamento clássico, por exemplo, foi desenvolvido o protocolo de resposta de extensão de probóscide (PER, *proboscis extension response*), em que a abelha aprende a associar um estímulo condicionado, geralmente olfativo, à solução de sacarose (estímulo não condicionado) que desencadeia a resposta inata de extensão da probóscide (Matsumoto *et al.* 2012). No caso do condicionamento operante, abelhas em livre voo podem ser treinadas com estímulos visuais, por exemplo, a escolher mais, ou menos, vezes um dos lados de um labirinto em Y, alterando seu comportamento para obter a recompensa (Giurfa *et al.* 2007). Como tanto os estímulos quanto os recursos se encontram no mesmo alvo que as abelhas buscam (as flores) podemos utiliza-los para avaliar a capacidade associativa desses insetos, em diversos protocolos de condicionamento (veja Giurfa 2007 para uma revisão). Além disso, análises neurofisiológicas permitiram a elaboração de modelos visuais desses animais (Gawryszewski 2017), que possibilitam avaliar como eles percebem e discriminam entre cores. Com a mesma abordagem de neurofisiologia, foram desenvolvidas técnicas que

permitem entender como a fragrância floral é percebida por esses animais, como a eletroantenografia (e.g. Salzman *et al.* 2007) e o imageamento de cálcio (Joerges *et al.* 1997, Galizia *et al.* 2017). No entanto, a maior parte desses estudos utiliza poucas espécies como modelo, principalmente abelhas sociais dos gêneros *Apis* e *Bombus*, e poucos são os trabalhos que testam as habilidades cognitivas de outros grupos de abelhas, como Meliponini.

Nessa tese, então, testamos a hipótese de Heinrich a partir de uma perspectiva dos polinizadores, utilizando uma abordagem cognitiva para entender o papel do polimorfismo floral na polinização por engano. Escolhemos como modelo a interação entre *Ionopsis utricularioides*, uma orquídea polinizada por engano generalizado de alimento que possui variação intraespecífica nos seus atributos florais (Aguiar 2014, Aguiar & Pansarin 2019), e duas das várias espécies de abelhas que atuam como seus visitantes florais: *Scaptotrigona aff. depilis* (Meliponini) e *Apis mellifera* (Fig. 1) (Aguiar & Pansarin 2019).



Fig. 1. Visitantes florais de *Ionopsis utricularioides* nas flores da orquídea. (A) *Scaptotrigona aff. depilis* (Meliponini), modelo animal para os experimentos de condicionamento visual. (B) *Apis mellifera*, modelo animal para os experimentos de condicionamento olfativo.

No Capítulo 1, investigamos a variação intraespecífica na cor das flores de *I. utricularioides*. Mostramos que o polimorfismo de cor floral atrapalha o aprendizado associativo das abelhas, de forma que elas aprendem a evitar o estímulo sem recompensa e durante os testes escolhem um novo estímulo também sem recompensa, e demoram mais tempo e visitam mais flores na presença do polimorfismo. No Capítulo 2, começamos a investigar o papel da variação intraespecífica da fragrância na polinização por engano. Nesse capítulo, perguntamos se isômeros de uma mesma molécula podem ser diferenciados pelas abelhas. Encontramos que as abelhas conseguem discriminar entre isômeros apenas em condições muito específicas e, dessa forma, eles não seriam utilizados na discriminação entre

flores num contexto natural de polinização. Assim, apesar dos isômeros de uma mesma molécula fazerem parte da diversidade de compostos das fragrâncias, eles não necessariamente contribuem na diversidade desse atributo quando levamos em consideração a cognição dos polinizadores. No Capítulo 3, continuamos a investigar o papel da variação da fragrância na polinização por engano, estudando o fenômeno de dominância olfativa por meio de experimentos comportamentais e análises neuronais. Se o composto majoritário da fragrância fosse melhor aprendido pelas abelhas em comparação aos compostos minoritários, a variação nesse atributo seria padronizada ao nível cognitivo e não teria um papel na polinização por engano. Encontramos que, na verdade, compostos minoritários e mais variáveis entre indivíduos dominam a fragrância. Dessa forma, a variação na fragrância floral é mantida ao nível cognitivo e pode estar relacionada à polinização por engano. No Capítulo 4 trazemos uma revisão sobre métodos de treinamento de abelhas para responder questões de polinização. A ideia para esse capítulo é que ele sirva de literatura de consulta na língua portuguesa, para a qual ainda não existiam trabalhos que integrassem e explicassem tais métodos que podem ser importantes para explicar interações ecológicas complexas, como a polinização.

Os resultados dessa tese trazem evidências robustas que suportam a Hipótese de Heinrich, mostrando que a variação nos atributos florais tem um papel importante na polinização por engano de alimento, podendo atrapalhar o processo de aprendizagem associativa dos polinizadores. Ao trazer uma abordagem cognitiva, mostramos o efeito do polimorfismo floral no momento da escolha de um polinizador, e não no sucesso reprodutivo das plantas, como investigado em outros trabalhos. Apesar da importância desses estudos para entender se a variação nos atributos florais favorece a reprodução de orquídeas polinizadas por engano, devemos lembrar que outros fatores, como limitações abióticas e herbivoria podem interferir no sucesso reprodutivo. Portanto, nessa tese, mostramos a importância de investigar o polimorfismo floral a partir de uma perspectiva do polinizador, e como trabalhos de cognição animal podem ajudar a responder questões ecológicas complexas.

Capítulo 1

O papel do polimorfismo de cor floral na polinização por engano em orquídeas

Resumo

A presença de polimorfismo de cor floral intraespecífico é comum em orquídeas polinizadas por engano de alimento, que atraem seus polinizadores por meio dos seus sinais florais, porém não possuem recurso como pólen ou néctar. A hipótese de Heinrich sugere que o polimorfismo floral está relacionado à polinização por engano, uma vez que ao se deparar com múltiplos sinais florais, os polinizadores demorariam mais tempo a aprender em evitar as plantas enganosas, resultando em mais flores visitadas. Alguns estudos buscaram testar a hipótese de Heinrich, mas a maioria deles tem foco no sucesso reprodutivo das plantas, e a capacidade cognitiva dos polinizadores é pouco explorada. Nesse trabalho, testamos essa hipótese a partir de uma perspectiva do polinizador. Nós treinamos abelhas *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Meliponini) em livre voo a visitarem flores artificiais com estímulos que simulavam as cores de *Ionopsis utricularioides*, uma orquídea polinizada por engano de alimento que apresenta polimorfismo contínuo na cor floral. Encontramos que as abelhas aprendem a evitar a cor treinada como sem recurso e, durante os testes, escolhem visitar uma nova cor ao invés da treinada. No entanto, quando simulamos o polimorfismo contínuo, apresentando cores muito similares para as abelhas durante os testes, elas visitaram igualmente estímulos mais similares, indicando generalização nesses casos. Além disso, mostramos que as abelhas visitam mais flores e por mais tempo num cenário de engano polimórfico (flores sem recurso que possuíam cores diferentes) que num cenário monomórfico (todas as flores com a mesma cor). Concluímos que a presença da variação na cor floral tem papel no engano de alimento em orquídeas, por meio da perturbação do aprendizado associativo dos visitantes florais. Nossos resultados suportam, dessa maneira, a hipótese de Heinrich.

Palavras-chave: visão, aprendizado, generalização, abelhas, Meliponini, *Scaptotrigona*, *Ionopsis*

Abstract

Intraspecific floral colour polymorphism is common in food deceptive orchids, which attract pollinators by their floral signals, but do not present resources, such as pollen or nectar. Heinrich's hypothesis suggests that floral polymorphism is related to deceptive pollination. By presenting multiple floral signals, the pollinators would take more time to learn to avoid deceptive species, resulting in more visits to the flowers. Some studies aimed to test

Heinrich's hypothesis, but most of them focus on the plants' reproductive success. In this study, we tested this hypothesis from a pollinators' perspective. We trained *Scaptotrigona* aff. *depilis* bees (Meliponini) in free flight to visit artificial flowers with colour stimulus that simulated those from *Ionopsis utricularioides*, a food deceptive orchid that presents continuous floral colour polymorphism. We found that bees learn to avoid the colour trained as unrewarding and, during the tests, they choose to visit a new colour instead the trained one. Yet, when we simulated continuous polymorphism, by presenting very similar colours to the bees during the tests, they visited equally the more similar stimuli, indicating generalization in these cases. We also show that bees visit more flowers, and for a longer period of time, in a deceptive polymorphic scenario (unrewarding flowers that presented different colours), than in a monomorphic scenario (all of the flowers with the same colour). We conclude that floral colour variation has a role in food deceptive pollination in orchids, by disrupting the avoidance learning of the floral visitors. Thus, our results support Heinrich's hypothesis.

Keywords: vision, learning, generalization, bees, Meliponini, *Scaptotrigona*, *Ionopsis*

Introdução

A polinização por engano ocorre quando as flores atraem os visitantes por meio de seus sinais florais como cor e fragrância, mas não oferecem recurso aos polinizadores (Ackerman *et al.* 2011, Johnson & Schiestl 2016). Esse fenômeno é muito comum na família das orquídeas, na qual um terço das espécies engana seus polinizadores (Ackerman 1986) pelos mais diversos mecanismos (Jersáková *et al.* 2006). O mecanismo mais comum é o engano generalizado de alimento (Jersáková *et al.* 2006). Nesses casos as flores possuem sinais florais gerais, em diferentes domínios sensoriais (e.g. visual, olfativo), atraindo o maior número possível de visitantes florais (Johnson & Schiestl 2016).

Nas plantas polinizadas por esse mecanismo generalizado é comum encontrar variação intraespecífica nos sinais florais (Johnson & Schiestl 2016). Vários estudos já relataram a presença de polimorfismo na cor das flores de populações dessas orquídeas (Juillet & Scopece 2010, Ackerman *et al.* 2011). Quando presente, a variação na cor floral pode ser classificada de duas maneiras: polimorfismo discreto, com duas ou mais formas claramente distinguíveis, ou polimorfismo contínuo, quando existe alta variação intraespecífica, porém as formas estão em um contínuo de variação sem distinção marcante (Johnson & Schiestl 2016). A variação na cor floral é tradicionalmente atribuída a seleção mediada por polinizadores, uma vez que uma mesma espécie pode apresentar diferentes grupos de polinizadores, que possuem diferentes preferências em relação à cor floral (Kellenberger *et al.* 2019). No entanto, ela

também pode estar relacionada a fatores abióticos, já que diferenças no sucesso reprodutivo de diferentes morfotipos florais depende de condições abióticas, como a presença de mais ou menos água no solo e luminosidade, além de alguns morfotipos serem mais frequentes em diferentes latitudes geográficas (Talavera *et al.* 2013).

No caso específico da polinização por engano, uma hipótese sugere que a variação na cor floral seria vantajosa para as plantas. A chamada hipótese de Heinrich (1975) leva em consideração o aprendizado dos polinizadores e sugere que a alta variação intraespecífica nas flores atrasaria o processo de generalização pelos animais, levando a mais visitas às flores. Em outras palavras, quanto mais variáveis as flores polinizadas por engano, mais tempo os polinizadores levariam para aprender a evitá-las. De fato, os polinizadores, especialmente as abelhas, são capazes de aprender a associar a presença ou ausência de recompensa com estímulos em diferentes canais sensoriais, como visual e olfativo, e generalizar entre estímulos (Giurfa 2007). A generalização pode ser vista como um fenômeno que promove economia cognitiva, uma vez que permite uma resposta adaptativa a outros estímulos diferentes, porém similares ao visitado no ambiente (Stach & Giurfa 2005). A presença de sinais variáveis, então, perturbaria esse processo no caso da polinização por engano. Ainda, é importante lembrar que o sistema visual dos polinizadores é diferente dos humanos. Abelhas, por exemplo, possuem três fotorreceptores, com picos de excitação no ultravioleta, azul e verde, enquanto que os humanos, apesar de também apresentarem visão tricromática, não são capazes de enxergar na faixa do ultravioleta, mas enxergam o vermelho (Chittka 1992, Brito *et al.* 2014).

Alguns estudos já buscaram testar a hipótese de Heinrich, focando geralmente em respostas reprodutivas das plantas, como remoção de pólen ou frutificação. Smithson *et al.* (2007) manipularam populações da orquídea europeia *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó, que possui flores com polimorfismo discreto de cor nas formas amarela e vermelha. Eles mantiveram no campo grupos de populações monomórficas (plantas com flores de apenas uma cor) e polimórficas (metade das plantas com flores de uma cor e metade com flores da outra cor). Os autores esperavam corroborar a hipótese de Heinrich ao encontrar nas populações polimórficas um maior sucesso reprodutivo, medido como remoção e deposição de pólen e frutificação. No entanto, eles não encontraram o esperado, indicando que a variação nesse atributo floral não estaria relacionada à polinização por engano. Porém, o sucesso reprodutivo em orquídeas não está relacionado apenas à polinização, podendo ser dependente também de fatores abióticos (Montalvo & Ackerman 1987). Além disso, como os autores não avaliaram o comportamento do polinizador no momento da escolha da flor

visitada, é difícil determinar por esse estudo se a presença de variação na cor floral não está, de fato, relacionada ao processo de engano dos visitantes florais, uma vez que o aprendizado acontece ao nível individual dos animais (Giurfa 2007).

A revisão de Juillet & Scopece (2010) mostra os oito trabalhos existentes sobre essa questão em orquídeas, porém chega a conclusão que não existem evidências robustas que suportem a hipótese de Heinrich e que, aparentemente, a variação nos atributos florais em orquídeas polinizadas por engano é resultado de evolução não adaptativa. Na ausência de recurso, ocorreria um relaxamento na seleção estabilizadora dos sinais florais, pois os polinizadores não estabeleceriam a constância floral. Esse fenômeno é conhecido por impor seleção estabilizadora, uma vez que uma flor diferente daquela conhecida pelo polinizador como recompensante seria menos visitada e eventualmente desapareceria da população (Juillet & Scopece 2010, Johnson & Schiestl 2016). No entanto, um trabalho mais recente usou um modelo matemático mostrando como a discriminação visual imprecisa dos polinizadores levaria à seleção disruptiva, promovendo o polimorfismo discreto na cor floral de orquídeas polinizadas por engano (Kagawa & Takimoto 2016). Uma das premissas desse modelo seria que, numa situação de polimorfismo contínuo, os polinizadores visitariam menos as cores intermediárias, uma vez que, por serem indiscrimináveis entre as outras, os polinizadores aprenderiam mais rápido a evitá-las. Em contrapartida, as flores com cores mais discrimináveis (nos limites de distribuição da variação) seriam mais visitadas pois promoveriam o engano mais vezes ao impedir a generalização entre estímulos. Isso levaria, numa escala de tempo evolutiva, ao polimorfismo discreto, apenas com plantas de flores com cores mais discrimináveis, uma vez que elas teriam maior sucesso reprodutivo (Kagawa & Takimoto 2016).

No nosso trabalho, escolhemos testar a hipótese de Heinrich considerando a interação entre *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl., uma orquídea neotropical polinizada por engano de alimento que apresenta variação intraespecífica na cor floral (Aguiar & Pansarin 2019), e *Scaptotrigona* aff. *depilis* Moure 1942 (Meliponini) que é um dos visitantes florais dessa orquídea (Aguiar & Pansarin 2019). É importante ressaltar que o pólen dessa orquídea é organizado em polínias, massas cerosas e rígidas de pólen que não podem ser utilizados como alimento pelos polinizadores. Além disso, essa espécie é autoincompatível, i.e. frutos não são formados a partir da fecundação de um óvulo de um indivíduo pelo seu próprio pólen. Dessa forma, para ocorrer polinização deve haver transferência de pólen entre indivíduos (Aguiar & Pansarin 2019). Pouco se sabe sobre as capacidades cognitivas da espécie de abelha escolhida para esse estudo, porém seus indivíduos podem ser treinados a visitar alimentadores artificiais

(Schmidt *et al.* 2003, 2006) e, recentemente, trabalhos tem revelado que as abelhas sem ferrão são ótimos modelos para estudos de discriminação visual (Dyer *et al.* 2016, Koethe *et al.* 2016)

Nós mostramos que as abelhas treinadas aprendem a evitar os estímulos visuais que não apresentam recompensa, simulando flores sem recurso, e que preferem visitar um novo estímulo, desconhecido, ao invés daquele já treinado como sem recompensa, simulando uma situação de polinização por engano. Nós também mostramos que as abelhas visitam mais flores e por mais tempo em cenários de engano com polimorfismo de cor floral do que no cenário de engano monomórfico, o que suporta a hipótese de Heinrich. Nossos resultados revelam que a variação de cor floral pode favorecer a polinização por engano de alimento, ao prejudicar o aprendizado de associação entre estímulos visuais e ausência de recompensa pelos polinizadores.

Material e métodos

Análise da cor floral

Indivíduos de *Ionopsis utricularioides* (N = 40) foram coletados de uma população na cidade de Serra Azul, São Paulo, Brasil. Eles foram mantidos individualmente em vasos de cerâmica, sob tela de sombreamento 50% e regados todos os dias. A refletância espectral das flores de *I. utricularioides* (N=40 indivíduos, uma inflorescência por indivíduo, três flores por inflorescência) foi obtida usando um espectrofotômetro USB4000 (OceanOptics, Dunedin, FL, EUA) calibrado entre 300 e 700 nm, acoplado a uma fonte de luz de deutério-halogênio (DH 2000; OceanOptics, Ostfildern, Alemanha). Nós realizamos três medidas por flor na região do labelo, pétala modificada relacionada à atração dos visitantes florais. Todas as medidas foram feitas a um ângulo de 45° e na mesma posição da estrutura floral: lobo lateral direito. Usamos sulfato de bário como padrão de branco e uma câmara escura preta como padrão de preto. Para determinar como os insetos percebem as cores florais, os perfis de refletância foram analisados no modelo do hexágono de cor (Chittka 1992), usando a sensibilidade espectral de *Melipona quadrifasciata* Lepageletier 1836 (Menzel *et al.* 1989). O modelo é baseado no processamento oponente dos sinais dos fotorreceptores, simulando o processamento dos estímulos visuais que ocorre no sistema nervoso central, em que os neurônios foram descritos para *Apis mellifera* (Backhaus 1991). Ele usa as sensibilidades dos fotorreceptores da espécie considerada e um processamento oponente generalizado entre espécies (Chittka 1992). Escolhemos *M. quadrifasciata* como modelo, pois é a única espécie de Meliponini com sensibilidade espectral conhecida, sendo então a mais próxima

filogeneticamente de *S. aff. depilis* nesse sentido. Dentro desse modelo, as distâncias entre pontos indicam o contraste cromático entre os estímulos ou, em outras palavras, a similaridade perceptual entre cores e, assim, a habilidade de um inseto em discriminar entre elas. Em condições naturais, as abelhas conseguem distinguir diferenças entre cores com distâncias maiores que 0.1 unidades do hexágono (UH) (Chittka *et al.* 1994, Papadopulos *et al.* 2013). Nós calculamos um valor médio para cada indivíduo da orquídea e comparamos as distâncias entre indivíduos para avaliar o polimorfismo de cor floral. O modelo do hexágono e as distâncias entre cores foram calculados com o software R 3.4.2 (<http://www.R-project.org/>) usando o pacote *pavo* (Maia *et al.* 2013).

Condicionamento visual

Indivíduos de *Scaptotrigona aff. depilis* foram treinados à partir de quatro colônias presentes no meliponário do Departamento de Biologia, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. As abelhas foram treinadas em livre voo a visitar um alimentador contendo solução de sacarose P.A. 50% (m/m) que foi gradualmente afastado da entrada da colônia até o local do experimento (a 30 m da colônia). A instalação experimental consistiu em uma superfície verde onde foram posicionadas horizontalmente flores artificiais de acrílico transparente. As flores (3 cm x 3 cm x 0.5 cm) possuíam uma base com cavidade central que era preenchida com 300 µl de recompensa (solução de sacarose P.A. 50% (m/m)) ou água, de acordo com o desenho experimental. Esse volume permitia que a abelha se saciasse, de forma que visitava apenas uma flor artificial com recompensa por viagem de forrageamento. É importante ressaltar que dependendo se a abelha visitava uma flor com ou sem recurso, ela poderia realizar uma ou mais visitas por viagem de forrageamento. Ao visitar uma flor com recurso, a abelha permanecia na flor até obter todo o alimento necessário e voltava para a colônia. Ao visitar uma flor sem recurso, a abelha voava e escolhia uma nova flor, fazendo uma nova visita numa mesma viagem. Inicialmente as abelhas foram treinadas a visitar as flores com recompensa, porém sem estímulo de cor (apenas a superfície de acrílico transparente) para que aprendessem a utilizá-las. Nesse momento, as abelhas foram identificadas individualmente por marcações realizadas no tórax com tinta acrílica atóxica. Durante os experimentos, sobre cada base foi posicionado um estímulo e sobre o estímulo uma lâmina de acrílico, ambos perfurados no centro, permitindo o acesso à cavidade da base. Durante todos os testes, eram apresentadas flores artificiais sem recompensa, apenas com água. A lâmina de acrílico era trocada a cada visita de uma abelha para evitar o acúmulo de feromônios que

pudessem indicar a presença ou ausência de recompensa (Roselino *et al.* 2016). A cada visita, as flores artificiais eram reposicionadas aleatoriamente para evitar o aprendizado espacial pelas abelhas. Consideramos como visita quando a abelha pousava na flor e inseria a cabeça na cavidade.

Estímulos

Como estímulos, nós imprimimos cores semelhantes às das flores das orquídeas, obtidas a partir da função *spec2rgb* do pacote *pavo* (Maia *et al.* 2013) em papel fotográfico (Smooth Pearl Paper; Ilford, Knutsford, Reino Unido). Após impressos, todos os estímulos, assim como a flor artificial sem estímulo, tiveram suas refletâncias espectrais medidas e calculamos as distâncias hexagonais entre eles e também os seus respectivos contrastes acromáticos, sempre em relação ao fundo verde usado nos experimentos. As medidas foram realizadas com os estímulos nas mesmas condições em que eram apresentados para as abelhas, ou seja, montados na flor artificial. A lamina de acrílico utilizada sobre o estímulo bloqueou a reflexão na faixa do ultravioleta para todos os estímulos, o que é importante pois as flores de *I. utricularioides* também não refletem nessa faixa (veja detalhes na sessão Resultados). Como estímulo neutro, utilizamos a cor cinza, que possuía refletância relativamente uniforme nos comprimentos de onda amostrados, exceto na faixa do ultravioleta, e era discriminável entre os outros de acordo com o modelo do hexágono (distâncias >0.1 UH). Os outros estímulos foram denominados branco, lilás e roxo, de acordo com a visão humana. Branco e roxo eram discrimináveis entre si, de acordo com o modelo do hexágono (distâncias >0.1 UH) e lilás era intermediário, não sendo discriminável de branco e roxo (distâncias de aproximadamente 0.05 UH). Escolhemos esses estímulos para avaliar o papel do polimorfismo de cor discreto (branco *versus* roxo) e do polimorfismo de cor contínuo (branco *versus* roxo *versus* lilás). Todos os estímulos são facilmente discrimináveis do fundo verde utilizado nos experimentos (contraste acromático; distâncias >0.1 UH). A Tabela 1 traz detalhes sobre as propriedades de contraste cromático e acromático para cada estímulo.

Tabela 1. Distâncias (em unidades do hexágono) entre os estímulos utilizados.

Estímulo	Cinza	Branco	Lilás	Roxo	Flor sem estímulo	Contraste acromático
Cinza	0	0.1032	0.1594	0.1921	0.1627	0.2745

Branco	0.1032	0	0.0508	0.1563	0.4097	0.6105
Lilás	0.1594	0.0508	0	0.0597	0.2668	0.5149
Roxo	0.1921	0.1563	0.0597	0	0.3275	0.3413
Flor sem estímulo	0.1627	0.4097	0.2668	0.3275	0	0.3413

Experimento 1: O efeito do polimorfismo de cor floral nas escolhas das abelhas

Polimorfismo de cor discreto

Nesse experimento, buscamos avaliar se as abelhas aprendem a evitar as flores sem recurso e quando dada uma nova alternativa ao estímulo condicionado (EC), se elas escolhem o estímulo novo mesmo sem a informação de se ele possui ou não recompensa, simulando o engano. Inicialmente, um grupo de abelhas passou por um teste de escolha espontânea entre os estímulos. Para esse grupo foram apresentadas apenas a duas flores sem recurso (apenas água), cada uma com uma das cores que seriam utilizadas como EC- nos próximos testes (branco e roxo), sem a fase de condicionamento, para avaliar se existe alguma preferência prévia ao condicionamento por alguma das cores utilizadas. Outros dois grupos de abelhas passaram por condicionamento diferencial com duas cores como estímulos condicionados (EC), um associado à recompensa de sacarose (EC+) e outro não associado à recompensa (EC-), em que era apresentado apenas água. Os dois grupos de abelhas diferiram no EC- durante o condicionamento. Em ambos os grupos o EC+ era o cinza, uma cor que consideramos neutra por refletir uniformemente em todo o espectro, e que teve como função, além do aprendizado de discriminação, manter as abelhas visitando a instalação experimental pela presença de recompensa. Uma cor considerada neutra foi escolhida como EC+ para que, na fase teste, pudéssemos usar todas as combinações possíveis de estímulos que de fato são apresentados pela orquídea, que na natureza nunca possuem recurso (EC-). Em um grupo, o EC- era o branco, enquanto que no outro o EC- era o roxo. É importante notar que o contraste cromático entre EC+ e EC- não é o mesmo entre os grupos (veja Tabela 1). Assim, era esperado que as abelhas fossem melhores em discriminar entre cinza e roxo que entre cinza e branco. Para ambos os grupos foram apresentadas seis flores artificiais durante o condicionamento, sendo três EC+ e três EC-. Cada abelha pôde realizar individualmente (outras abelhas que se aproximavam do experimento eram removidas) 10 visitas (repetições) na fase de condicionamento. Imediatamente após a décima visita, todas as flores eram retiradas e eram apresentadas apenas duas flores, uma com o EC- e a outra com um novo estímulo: o EC- do grupo alternativo. Esse teste permite determinar se os animais aprendem

as propriedades inibitórias do EC- e preferem, assim, visitar o novo estímulo. Permitimos que as abelhas visitassem apenas uma flor nessa fase (fase de teste) e, em seguida, começamos o condicionamento de uma nova abelha. Também realizamos outros dois grupos experimentais em que era realizado o condicionamento diferencial, como explicado anteriormente, mas na fase de teste era apresentado o EC+ (cinza) junto ao novo estímulo, sem a presença do EC-. Nesse teste, investigamos se as abelhas aprendiam as propriedades excitatórias do EC+ e o escolhiam ao invés do estímulo novo, para avaliar se em nossos experimentos as abelhas eram capazes de aprender não só o valor negativo da flor sem recurso, mas também o valor positivo do EC+.

Polimorfismo de cor contínuo

Assim como no experimento anterior, buscamos entender como o polimorfismo de cor floral atua no processo de escolha das abelhas. Porém, nesse experimento avaliamos o que acontece quando o EC- não é discriminável de uma das cores da fase teste (EC- = branco ou roxo; não discrimináveis de lilás) ou de duas das cores (EC- = lilás; não discriminável de branco e roxo), simulando o polimorfismo de cor contínuo em flores polinizadas por engano, como no caso de *I. utricularioides* (Aguiar & Pansarin 2019). Seguimos, portanto, o mesmo procedimento do experimento anterior. No primeiro teste foi analisada a escolha espontânea entre os estímulos que seriam utilizados como EC- (branco, lilás e roxo). Posteriormente três grupos de abelhas foram treinados em condicionamento diferencial, variando no EC-, sendo o EC+ sempre cinza. No primeiro grupo o EC- foi o branco, no segundo o lilás e no terceiro o roxo. Na fase teste foram apresentadas a todos os grupos três flores artificiais sem recurso, cada uma com uma das cores EC- citadas acima. Devido às diferenças no contraste cromático entre estímulos, também eram esperadas discriminações diferentes de acordo com o EC- utilizado. Assim como no experimento anterior, também realizamos três grupos experimentais, treinados em condicionamento diferencial, mas que na fase de teste era apresentado o EC+ (cinza) junto ao novo estímulo, sem a presença do EC-, para avaliar o aprendizado das propriedades excitatórias do EC+.

Experimento 2: O efeito do polimorfismo de cor floral no número de flores visitadas e no tempo de visita

Polimorfismo de cor discreto

A hipótese de Heinrich (1975) postula que quanto mais variáveis as flores sem recurso, mais os polinizadores demorariam a evitá-las. Assim, existe um componente

temporal na hipótese que buscamos investigar nesse experimento. Para isso treinamos as abelhas individualmente a visitar oito flores artificiais, todas sem estímulo de cor e com recompensa de sacarose, para que aprendessem a visitar e utilizar as flores. Após a décima visita, todas as flores foram trocadas por flores com estímulos de cor, porém sem recompensa de sacarose (apenas com água). Foram testados três cenários, correspondentes a três grupos experimentais: oito flores brancas ou oito flores roxas (simulando o monomorfismo) ou quatro flores brancas e quatro roxas (simulando o polimorfismo discreto). Anotamos para cada grupo quantas flores foram visitadas e o tempo de visita (em segundos) à instalação experimental. O experimento para cada abelha terminou após o indivíduo não visitar nenhuma flor por um minuto. Escolhemos esse corte temporal pois, em média, as abelhas demoraram um minuto em cada viagem da colônia até a instalação experimental.

Polimorfismo de cor contínuo

Realizamos aqui um procedimento similar ao utilizado no experimento anterior, porém agora com nove flores artificiais, e quatro grupos experimentais: nove flores brancas, lilases ou roxas (simulando o monomorfismo), ou três flores brancas, três lilases e três roxas (simulando o polimorfismo contínuo). Tanto aqui quanto no experimento anterior, eram esperadas respostas diferentes entre os cenários monomórficos, devido às diferenças entre contrastes cromáticos entre as flores sem estímulos usadas no aprendizado e flores com estímulos usadas no teste (veja Tabela 1). Utilizamos nesse caso nove flores, para que números de estímulos apresentados na simulação do polimorfismo fossem iguais.

Análise de dados e estatística

Durante os testes e condicionamento do Experimento 1, a visita a uma flor foi registrada como uma resposta binomial (0 para ausência de visita e 1 para a ocorrência de visita). Nós calculamos e representamos a proporção de abelhas que visitaram os estímulos condicionados (i.e. respostas condicionadas) em todos os condicionamentos e testes. Para a aquisição durante o condicionamento, a proporção de abelhas que visitou o EC+ ou o EC- foi analisada por um modelo linear generalizado misto (GLMM) para a família binomial, em que “Repetição” foi considerada um fator contínuo (efeito da repetição) e “Identidade Individual” (Abelha) e “Data” (réplica) como efeitos aleatórios (efeito individual). Para o Experimento 2 analisamos os dados de número de visitas e tempo de visita por um GLMM para a família poisson em que “Identidade Individual” (Abelha) e “Data” (réplica) eram efeitos aleatórios (efeito individual). Múltiplas comparações foram realizadas com método de Tukey (valores z

mostrados ao longo do manuscrito).

Toda a análise estatística foi realizada com o software R 3.4.2 (<http://www.R-project.org/>). Os pacotes *lme4* e *lsmeans* (Bretz & Westfall 2011, Bates *et al.* 2017) foram utilizados para o GLMM e o método de Tukey para comparações múltiplas, respectivamente.

Resultados

Análise de cor floral e dos estímulos experimentais

Para humanos, as flores de *Ionopsis utricularioides* variam do branco ao roxo (Fig. 1A), sendo que cada indivíduo apresenta flores de apenas uma cor predominante. No modelo do hexágono, as flores estão na região azul-esverdeado para as abelhas (Fig. 1B). Nossa análise revelou que as flores não refletem na faixa do ultravioleta (Fig. 1C). Também encontramos que *I. utricularioides* possui polimorfismo contínuo na cor de suas flores, sendo que as medidas no modelo do hexágono apresentaram distâncias >0.1 UH entre flores nos limites de distribuição, enquanto que as cores intermediárias não diferem das outras cores de acordo com o modelo (distâncias <0.1 UH). Os estímulos impressos para simular a cor das flores apresentaram boa semelhança com elas no modelo do hexágono e nas curvas de refletância (Fig. 1B,C).

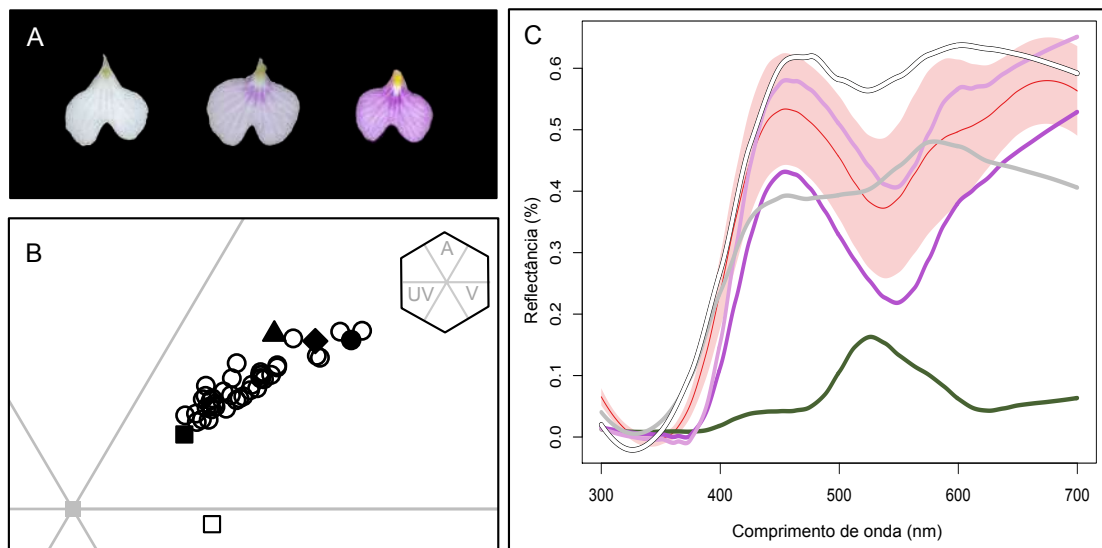


Fig. 1. Análise de cor. (A) Labels de *I. utricularioides* mostrando que as flores variam do branco ao roxo para humanos. (B) Hexágono de cor (Chittka 1992) usando *Melipona quadrifasciata* como modelo. Cada círculo aberto representa um indivíduo de orquídea amostrado ($N=40$). O quadrado aberto representa a flor transparente sem estímulo. O quadrado fechado representa o estímulo cinza, o triângulo fechado o roxo, o losango fechado o lilás, e o círculo fechado o branco. O detalhe mostra o hexágono de cor dividido em seções que representam os nomes das cores na visão da abelha (A, azul; V, verde; UV, ultravioleta). (C) Curvas de refletância das flores de *I. utricularioides* (área vermelha, sendo que a linha vermelha representa a média) e para os estímulos branco, lilás, cinza e roxo utilizados (linhas de cores de acordo com a visão humana). A linha verde representa a refletância da flor artificial sem estímulo, sobre o fundo verde.

Experimento 1: O efeito do polimorfismo de cor floral nas escolhas das abelhas

Nós investigamos qual o papel do polimorfismo de cor floral nas escolhas das abelhas, simulando uma situação de polinização por engano. Em todos os grupos de escolha espontânea, não encontramos diferença significativa entre os estímulos escolhidos (polimorfismo discreto: branco = 53.33%, roxo = 46.66%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=0.2633$, $P=0.605$; polimorfismo contínuo: branco = 30.00%, lilás = 36.66%, roxo = 33.33%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=0.2993$, $P=0.861$) (Fig. 2A,B; quadros à direita, compare as últimas três barras de cada quadro), indicando que não existe preferência por uma das cores em abelhas não treinadas.

Nós investigamos se sob condicionamento diferencial as abelhas aprendem as propriedades inibitórias ou excitatórias dos estímulos. Para cada estímulo, um grupo de abelhas foi treinado em condicionamento diferencial e depois todos os grupos foram testados com EC- e os outros estímulos alternativos (teste sobre o aprendizado inibitório) ou com o EC+ e os outros estímulos alternativos (teste sobre o aprendizado excitatório). No aprendizado inibitório, não encontramos diferenças significativas entre EC- ao longo do condicionamento (polimorfismo discreto: $gl=9$, $\chi^2=8.1152$, $P=0.522$; polimorfismo contínuo: $gl=18$, $\chi^2=11.6943$, $P=0.862$). Desta forma, também não encontramos diferenças de acordo com o contraste cromático, como esperado. As abelhas aprenderam de forma eficiente a evitar o EC- ao longo do condicionamento, de forma que encontramos um efeito da repetição significativo em todos os casos (polimorfismo discreto: EC- = branco: $gl=9$, $\chi^2=31.252$, $P<0.01$, $N=35$; EC- = roxo: $gl=9$, $\chi^2=28.195$, $P<0.01$, $N=35$; polimorfismo contínuo: EC- = branco: $gl=9$, $\chi^2=30.088$, $P<0.001$, $N=31$; EC- = lilás: $gl=9$, $\chi^2=21.801$, $P<0.01$, $N=31$; EC- = roxo: $gl=9$, $\chi^2=30.903$, $P<0.001$, $N=31$). A performance de aprendizado é mostrada na forma de diminuição das visitas ao EC- (Fig. 2, quadros à esquerda), o que era esperado nesse cenário. Ela poderia ser mostrada como visitas ao EC+, porém como ambas variáveis estão correlacionadas (visitar um tipo significa não visitar o outro) é justificável escolher esse tipo de representação nesse caso.

A análise das respostas dos testes revelou que, na simulação de polimorfismo discreto, as abelhas visitam mais o novo estímulo apresentado (Fig. 2A, quadro à direita), uma vez que a resposta ao EC- foi significativamente menor que àquela ao outro estímulo (EC- = branco: branco = 20.00%, roxo = 80.00%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=21.542$, $P<0.001$; EC- = roxo: branco = 82.86%, roxo = 17.14%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=24.681$, $P<0.001$). Na simulação de polimorfismo contínuo, houve diferença nas escolhas nos casos em que o EC- era branco

ou roxo (EC- = branco: $gl=2$, $\chi^2=15.034$, $P<0.001$; EC- = roxo: $gl=2$, $\chi^2=21.465$, $P<0.001$; Fig. 2B, quadro à direita), sendo que as abelhas escolhem visitar mais o estímulo mais discriminável do condicionado (distâncias >0.1 UH) e generalizaram para o estímulo intermediário, o visitando de forma semelhante ao EC- (veja Tabela 2 para detalhes). Quando EC- era a cor intermediária as abelhas escolheram visitar igualmente os três estímulos apresentados (EC- = lilás: $gl=2$, $\chi^2=0.3859$, $P=0.824$; Fig. 2B, quadro à direita), indicando generalização entre todos os estímulos nesse caso. Esses resultados revelam que sob condicionamento diferencial as abelhas aprendem as propriedades inibitórias do EC-, o que as leva a evita-lo, escolhendo o novo estímulo mais discriminável nos testes.

No experimento de aprendizado excitatório, questionamos se as abelhas são capazes de aprender as propriedades excitatórias do EC+ (o estímulo cinza). Nossas análises estatísticas revelaram que não existe efeito da identidade do estímulo (condicionamento: $gl=4$, $\chi^2=1.112$, $P=0.89$; teste: $gl=4$, $\chi^2=8.347$, $P=0.07$), i.e. que as respostas eram semelhantes, independentemente de qual cor era utilizada. Dessa forma, os dados foram agrupados. As abelhas aprenderam a visitar o EC+ ao longo do condicionamento ($gl=9$, $\chi^2=67.003$, $P<0.01$, $N=150$) e preferiram visitá-lo ao invés da cor nova nos testes (EC+ = cinza: cinza = 78.94%, nova cor = 21.05%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=44.136$, $P<0.01$), indicando que as abelhas aprendem o valor positivo das flores com solução de sacarose (Fig. 2C), da mesma forma em que elas aprendem o valor negativo das flores sem recompensa (Fig. 2A,B).

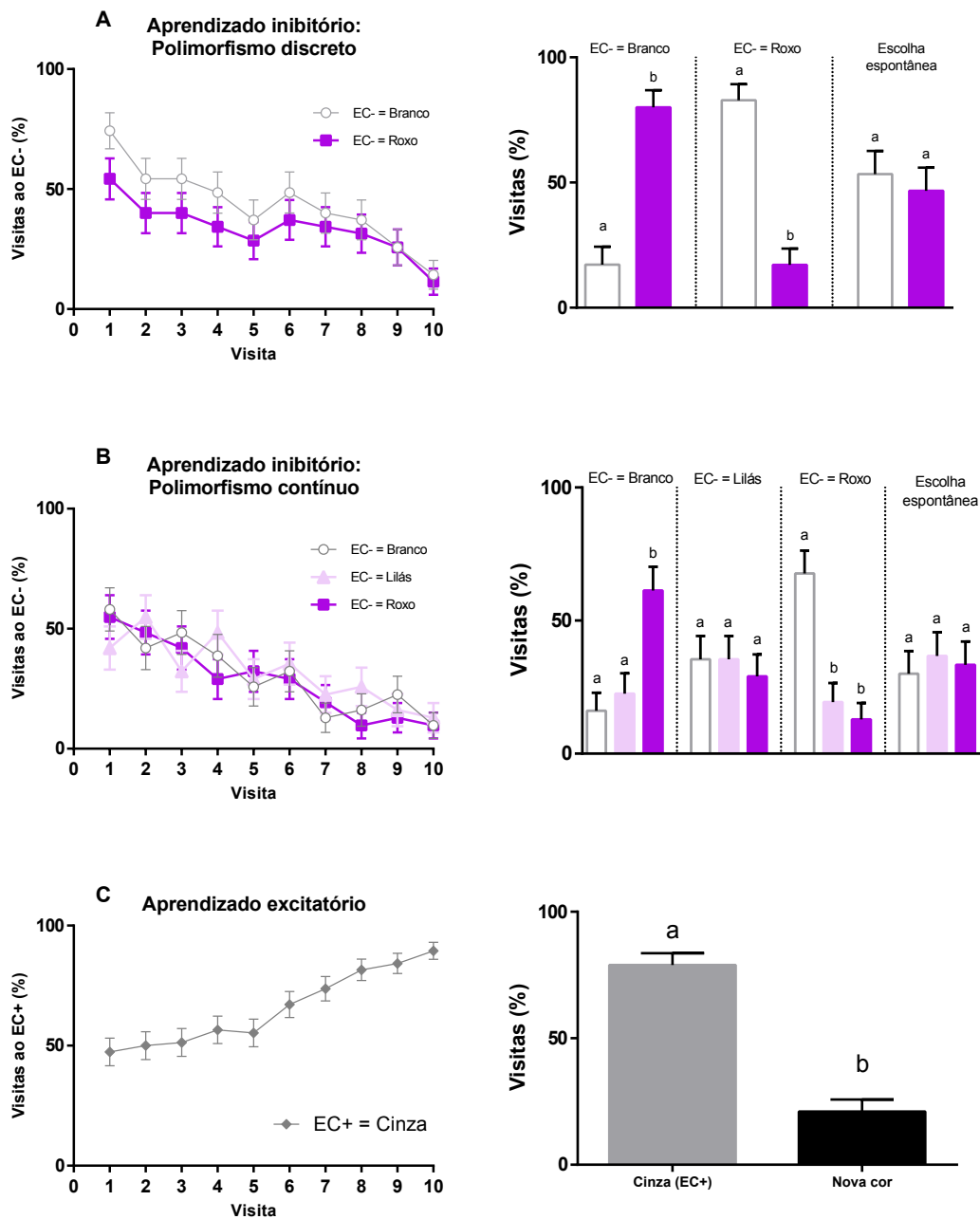


Fig. 2. Experimento 1: o papel do polimorfismo de cor na escolha. (A,B) Os quadros à esquerda mostram as curvas de aquisição para cada grupo condicionado com uma cor como EC- para avaliar o aprendizado das propriedades inibitórias do estímulo. Os quadros à direita mostram as escolhas de cada grupo testados imediatamente após o condicionamento. (A) Cenário do polimorfismo discreto: as abelhas foram treinadas a associar branco ($N=35$) ou roxo ($N=35$) como estímulo condicionado sem recompensa (EC-) durante 10 repetições de condicionamento. Em ambos os casos, as abelhas visitaram mais o estímulo alternativo ao EC- durante o teste (quadro à direita; χ^2 , $P < 0.001$). (B) Cenário do polimorfismo contínuo: as abelhas foram treinadas a associar branco ($N=31$), lilás ($N=31$) ou roxo ($N=31$) como estímulo condicionado sem recompensa (EC-) durante 10 repetições de condicionamento. Durante os testes (quadro à direita), quando o EC- era branco ou

roxo, as abelhas escolheram mais o estímulo alternativo com maior distância no modelo do hexágono (veja a seção Estímulos em Material e métodos para detalhes; Teste de Tukey, $P < 0.05$ em todos os casos), e de forma semelhante o lilás (Teste de Tukey, $P > 0.7$ em todos os casos), indicando generalização. Quando o EC- era lilás, as abelhas escolheram de forma semelhante entre as cores (Teste de Tukey, $P > 0.8$ em todos os casos), indicando que as abelhas generalizam entre os três estímulos quando as abelhas são treinadas com o estímulo intermediário. A escolha espontânea entre estímulos em (A) e (B) não foi diferente (χ^2 , $P > 0.6$ em todos os casos), indicando que não existe uma preferência prévia ao condicionamento para as cores utilizadas. (C) Dados agregados dos grupos de aprendizado das propriedades excitatórias do EC+ (cinza). Nessa fase, foi realizado o condicionamento diferencial como anteriormente (quadro à esquerda), mas as abelhas ($N=150$) foram testadas na presença do EC+ e o estímulo novo (quadro à direita). As abelhas aprenderam o valor positivo do EC+ e o visitaram mais durante os testes (χ^2 , $P < 0.01$) Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença significativa. As barras de erro representam o erro padrão da média.

Tabela 2. Experimento 1 – polimorfismo contínuo: análise estatística. (A) Resultados dos testes imediatamente após condicionamento para todos os grupos. (B) Valores estatísticos entre respostas para todos os grupos (Teste de Tukey). Casos significantes estão sinalizados em vermelho.

A) Resultados (porcentagem de visitas a cada estímulo durante o teste)

EC-	Teste (% Visitas)		
	Branco	Lilás	Roxo
Branco	16.12	22.58	61.29
Lilás	35.48	35.48	29.03
Roxo	67.74	19.35	12.90

B) Análise estatística

EC-	Diferenças nas respostas (Z_{184})					
	Branco vs. Lilás		Branco vs. Roxo		Lilás vs. Roxo	
	z	P	z	P	z	P
Branco	0.640	0.797	-3.445	<0.05	-2.988	<0.05
Lilás	0	1	0.543	0.850	0.543	0.850
Roxo	3.644	<0.01	4.022	<0.001	0.687	0.771

Experimento 2: O efeito do polimorfismo de cor floral no número de flores visitadas e no tempo de visita

Nesse experimento, investigamos quantas flores artificiais sem recompensa e por quanto tempo as abelhas às visitam em diferentes cenários de variabilidade de estímulos, avaliando, dessa forma, o efeito do polimorfismo de cor na polinização por engano. De acordo com a hipótese de Heinrich, em um cenário de engano polimórfico, as abelhas visitariam mais flores e demorariam mais tempo para aprender a evitar todas as flores. Nossas análises estatísticas revelaram a ausência do efeito de identidade do estímulo nos grupos de simulação do monomorfismo (número de visitas: $gl=2$, $\chi^2=0.1168$, $P=0.73$; tempo: $gl=2$, $\chi^2=0.0199$, $P=0.88$). Isso também indica que não encontramos diferenças no aprendizado de acordo com os contrastes cromáticos entre estímulos e a flor de acrílico, como esperado. Desta forma, pudemos agregar esses dados. Em ambos os cenários de polimorfismo (discreto e contínuo), as abelhas visitaram mais flores ($gl=2$, $\chi^2=20.376$, $P<0.001$; Fig. 3A) e por mais tempo ($gl=2$, $\chi^2=28.191$, $P<0.001$; Fig. 3B) que no cenário monomórfico. No entanto não houve diferença significativa do cenário de polimorfismo contínuo em relação ao cenário de polimorfismo discreto (veja Tabela 3 para detalhes), i.e. as abelhas visitaram um número de flores e por um tempo semelhantes em ambos os cenários polimórficos.

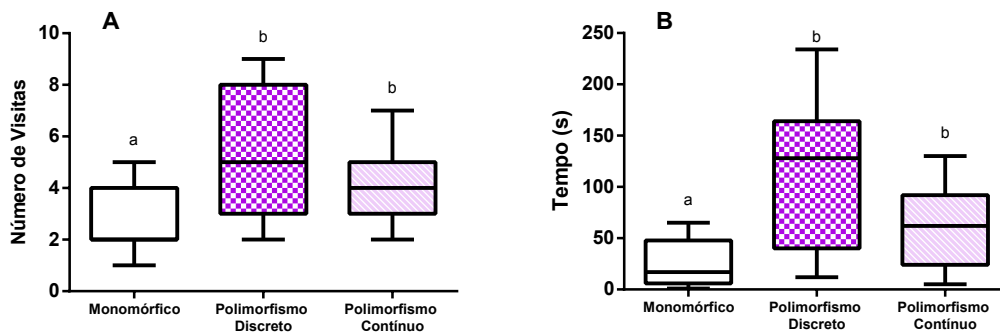


Fig. 3. Experimento 2: o papel do polimorfismo de cor no número de flores visitadas e no tempo de visita. As abelhas foram treinadas a visitar flores artificiais sem recompensa em três cenários: monomórfico (todas as flores de uma mesma cor; $N=45$ abelhas, dados agrupados), polimorfismo discreto (flores com duas cores discrimináveis entre si; $N=15$ abelhas) e polimorfismo contínuo (flores com três cores, sendo duas discrimináveis entre si e uma intermediária, indistinguível das outras duas; $N=15$ abelhas). Nós registramos o número de flores visitadas (A) e o tempo de visita à instalação experimental (B) nos três cenários. Para ambas as variáveis, o cenário monomórfico foi significativamente diferente dos cenários de polimorfismo (Teste de Tukey, $P<0.05$ em todos os casos), sendo que foram realizadas mais visitas e por mais tempo nos cenários polimórficos. No entanto, os cenários de polimorfismo discreto e contínuo não apresentaram diferença significativa (Teste de Tukey, $P>0.3$ em todos os casos). Letras diferentes indicam diferença significativa. As barras de erro representam o erro padrão da média.

Tabela 3. Experimento 2: análise estatística. (A) Resultados para todos os cenários. (B) Valores estatísticos entre respostas para todos os cenários (Teste de Tukey). Casos significantes estão sinalizados em vermelho.

A) Resultados. Número de visitas e tempo total em segundos para cada cenário. Valores são a média±EP.

Cenário	Número de visitas	Tempo (s)
Monomórfico	2.56±1.30	26.13±22.18
Polimorfismo discreto	5.2±2.3	110.06±72.08
Polimorfismo contínuo	4.26±1.57	62.80±39.09

B) Análise estatística. M = cenário monomórfico; D = cenário de polimorfismo discreto; C = cenário de polimorfismo contínuo.

Diferenças nas respostas (Z ₁₄₈)											
Número de visitas						Tempo					
M vs. D		M vs. C		D vs. C		M vs. D		M vs. C		D vs. C	
z	P	z	P	z	P	z	P	z	P	z	P
4.395	<0.01	3.005	<0.05	-1.173	0.469	4.996	<0.01	3.431	<0.05	-1.362	0.361

Discussão

Nós realizamos experimentos de aprendizado e memória de cores em abelhas, para avaliar se a presença de múltiplos sinais visuais tem papel na polinização de orquídeas por engano de alimento. Se a variação da cor floral em orquídeas polinizadas por esse mecanismo pode ser percebida e utilizada pelos polinizadores nas suas escolhas, ela poderia contribuir para a polinização por engano, fazendo difícil a associação entre ausência de recurso e sinais visuais. Encontramos que as abelhas são capazes de aprender as propriedades inibitórias e excitatórias dos estímulos, escolhendo um novo estímulo quando testadas na presença do EC- (aprendizado da propriedade inibitória) e escolhendo o estímulo recompensante quando testadas na presença do EC+ (aprendizado da propriedade excitatória). Além disso, encontramos que as abelhas visitam mais flores e por mais tempo quando múltiplos sinais visuais sem recompensa são apresentados. Ao apresentar múltiplos estímulos de valor negativo, existe uma perturbação no aprendizado das propriedades inibitórias das flores da espécie, que ocorre quando as abelhas ao visitarem e aprenderem um estímulo de valor negativo, visitam outro que também possui valor negativo. Isso leva a um maior número de flores visitadas até que todos os estímulos tenham as suas propriedades inibitórias aprendidas.

Dessa maneira, caracterizamos como a presença de variação de cor floral em plantas polinizadas por engano prejudica o aprendizado associativo dos polinizadores.

A discriminação entre cores depende não somente dos estímulos, mas também do procedimento de condicionamento empregado (Avarguès-Weber & Giurfa 2014). O condicionamento diferencial, utilizado em nossos experimentos, melhora a discriminação entre estímulos (e.g. cores e odores), uma vez que o animal tem que aprender a responder a um estímulo com recompensa (EC+) e não responder a um sem recompensa (EC-) (Dyer & Chittka 2004a, Giurfa 2004, Avarguès-Weber & Giurfa 2014, Barth *et al.* 2014, Perez *et al.* 2016). Isso resulta num gradiente de generalização excitatório em torno do EC+ e num gradiente inibitório em torno do EC- (Hanson 1959, Avarguès-Weber & Giurfa 2014). Em outras palavras, as abelhas aprendem o valor positivo do EC+ e o valor negativo do EC-, aprimorando a discriminação entre eles. No Experimento 1, encontramos que as abelhas aprendem o valor negativo do EC-, escolhendo visitar mais o estímulo novo, mesmo sem saber o seu valor, o que foi encontrado nos casos em que os estímulos eram perceptivamente discrimináveis. Além disso, que as abelhas aprendem o valor positivo do EC+, nesse caso evitando o estímulo novo, revelando que ambos os gradientes excitatório e inibitório estão sendo gerados ao longo do condicionamento. Mostramos dessa forma que o gradiente inibitório em torno do EC- está definitivamente sendo gerado ao longo do aprendizado e, dessa maneira, as abelhas aprendem efetivamente a evitar as flores sem recompensa e preferem visitar o estímulo novo, não condicionado. No contexto ecológico do nosso trabalho, isso revela o papel do aprendizado da propriedade inibitória de um estímulo na polinização por engano em orquídeas com sinais florais variáveis.

Por outro lado, o processo de generalização ocorre quando um animal trata como semelhantes estímulos diferentes (Guerrieri *et al.* 2005) e é considerado uma forma de economia cognitiva, pois permite que o animal aprenda a responder igualmente a esses estímulos, sem a necessidade de entrar em contato direto com todos eles (Stach & Giurfa 2005). No contexto da polinização, uma abelha que visita uma flor com presença de recurso (e.g., néctar ou pólen) e que apresenta um determinado sinal floral (e.g., cor ou odor), aprende a associar esse estímulo com a presença de recompensa e pode generalizar essa informação para outras flores de sinais florais semelhantes para elas. No Experimento 1, quando usamos apenas estímulos perceptivamente discrimináveis entre si, as abelhas aprendem a propriedade inibitória do EC- e, nos testes, elas visitam mais o outro estímulo, não apresentado durante o condicionamento, evidenciando a ausência de generalização (Fig. 2A). No entanto, quando adicionamos um estímulo perceptivamente indiscriminável, as abelhas visitam igualmente o

EC- e os estímulos mais semelhantes a ele (Fig. 2B). Trabalhos de treinamento de abelhas mostram que a tarefa em discriminar sinais coloridos perceptivamente próximos é difícil quando elas não são apresentadas a ambos os sinais no momento do condicionamento. Nesses casos as abelhas são treinadas em condicionamento absoluto com a presença apenas do EC+, gerando somente o gradiente excitatório em torno dele. Assim as abelhas não aprendem o sinal negativo do outro estímulo durante o condicionamento, o que piora a discriminação durante o teste (Giurfa 2004; Dyer & Chittka 2004b). Assim, no nosso caso podemos afirmar que existe uma generalização da propriedade inibitória do EC- nos testes em relação aos estímulos perceptivamente semelhantes que não foram apresentados ao longo do condicionamento. Isso revela o papel do fenômeno de generalização e da discriminação imprecisa entre estímulos visuais na presença de sinais visuais variáveis, no contexto da polinização por engano.

A hipótese de Heinrich (1975) sugere que a presença de variação intraespecífica nos atrativos florais de plantas polinizadas por engano atuaria favorecendo esse mecanismo ao perturbar o aprendizado associativo entre sinal e ausência de recurso. Usando populações manipuladas em campo, Smithson *et al.* (2007) buscaram testar essa hipótese. Eles mantiveram individualmente em vasos indivíduos de *Dactylorhiza sambucina*, uma orquídea polinizada por engano de alimento com polimorfismo discreto na cor floral. As plantas foram arranjadas em populações nas seguintes conformações: somente indivíduos de flores amarelas, somente indivíduos de flores vermelhas (cenários monomórficos), ou metade dos indivíduos com flores amarelas e metade com flores vermelhas (cenário polimórfico). As plantas foram deixadas no campo por nove dias e, após esse período, os autores quantificaram o pólen removido e depositado, além da frutificação. Eles não encontraram diferenças no sucesso reprodutivo entre os dois cenários, mas encontraram uma maior remoção de pólen nas populações monomórficas com flores amarelas. Isso indicaria uma ausência do efeito do polimorfismo floral e uma possível preferência das abelhas pelas flores amarelas, não suportando a hipótese de Heinrich. No entanto, o sucesso reprodutivo em orquídeas não está relacionado apenas à polinização. Recursos abióticos limitantes, como nutrientes e água, podem fazer com que as plantas produzam menos frutos, chegando a abortar flores já polinizadas (Montalvo & Ackerman 1987). Além disso, o processo de engano não pode ser quantificado pelo sucesso reprodutivo das plantas, uma vez que o aprendizado, e por consequência o engano, se dá ao nível individual dos polinizadores (Giurfa 2007). No nosso estudo, apesar de usarmos apenas estímulos de cor semelhantes aos das flores da orquídea modelo, e não as flores reais da espécie, focamos no processo de aprendizado e de escolha das

abelhas, mostrando, numa perspectiva do polinizador, o papel da variação da cor floral no momento em que ocorre o engano.

Outros trabalhos investigaram experimentalmente o papel do polimorfismo floral na polinização por engano. A revisão de Juillet & Scopece (2010) mostra que nenhum deles chegou a um resultado que suportasse de forma robusta a hipótese de Heinrich, inferindo que o polimorfismo seria mantido por um mecanismo não adaptativo de relaxamento na seleção estabilizadora dos sinais florais. No entanto, todos esses trabalhos tratam de forma superficial a capacidade cognitiva dos polinizadores, geralmente focando numa perspectiva da planta. Além disso, dos sete trabalhos que investigaram o polimorfismo de cor floral, quatro foram realizados com os mesmos modelos vegetal (*D. sambucina*) e animal (abelhas *Bombus*), o que pode causar um grande viés na análise comparativa proposta pela revisão. Nos outros três trabalhos que investigaram a variação de cor floral, o polinizador não era conhecido, sendo que em um deles a orquídea seria potencialmente polinizada por engano sexual. Isso revela a lacuna de conhecimento sobre o assunto e, assim, nosso trabalho se faz importante ao trazer modelos diferentes, num sistema de polinização por engano de alimento já descrito (Aguiar & Pansarin 2019). Ainda na mesma revisão os autores enumeram sugestões para explicar a falta de suporte à hipótese de Heinrich, sendo 1) os polinizadores não percebem a variação, 2) os polinizadores percebem a variação, mas não a usam nas suas escolhas, e 3) os polinizadores percebem a variação, mas não demoram mais a aprender a evitar a espécie sem recurso que apresenta polimorfismo floral. Ao usar uma perspectiva do polinizador, com os nossos resultados mostramos que todas as três explicações podem ser refutadas. No Experimento 1, as abelhas aprendem as propriedades inibitórias e excitatórias dos estímulos e usam esse aprendizado nas suas escolhas, indicando que podem perceber a variação e escolher a partir de experiências prévias, nesse contexto. Além disso, no Experimento 2, mostramos que os polinizadores aprendem mais rápido a evitar as flores num cenário monomórfico em comparação aos cenários polimórficos (Fig. 3).

Outro estudo usou um modelo matemático de simulação para entender como o polimorfismo de cor floral é mantido nas populações de orquídeas polinizadas por engano ao longo da evolução (Kagawa & Takimoto 2016). No modelo, a partir de dados de estudos empíricos, eles incluíram variáveis cognitivas dos polinizadores (e.g. capacidade de discriminação visual e taxa de aprendizado) e da biologia das plantas (e.g. efeito de mutação nas cores, número de visitas de polinizadores e sucesso reprodutivo), considerando também a existência do polimorfismo discreto e contínuo nas cores. Eles encontraram que a discriminação de cores imprecisa pelos polinizadores levaria, ao longo do tempo, à

manutenção do polimorfismo discreto nesse sinal. Isso seria explicado uma vez que no polimorfismo contínuo, as cores perceptivamente similares aos polinizadores (cores intermediárias) apresentariam uma força de associação maior com a ausência de recurso, já que ao visitar primeiro qualquer flor, com qualquer cor, as abelhas sempre aprenderiam a evitar as cores intermediárias pela sua capacidade limitada em discriminar cores, o que leva à generalização. Assim, essas flores de cores intermediárias teriam sempre menor sucesso reprodutivo, e as flores de cores perceptivamente diferentes seriam favorecidas. Como já explicado anteriormente, nossos resultados do Experimento 1 mostram o papel da discriminação imprecisa e da generalização no processo do engano, corroborando experimentalmente o que foi proposto pelo modelo. Ainda, ao analisarmos os resultados do Experimento 2, vemos que, as abelhas de fato aprendem mais rápido a evitar o cenário monomórfico, como previsto pelo modelo. No entanto, não encontramos diferenças significativas entre os cenários de polimorfismo discreto e contínuo, deixando incerto se ao longo do tempo seria favorecido o polimorfismo discreto, como sugerido pelo modelo matemático.

O uso de uma perspectiva das capacidades cognitivas do polinizador para responder questões de polinização permite o acesso a informações que a as respostas das plantas, como o sucesso reprodutivo, não são capazes de fornecer. Apesar de vários trabalhos evidenciarem a presença de variação intraespecífica de cor floral em orquídeas polinizadas por engano de alimento, existe uma grande lacuna de conhecimento acerca de como os polinizadores reagem nesses casos. A hipótese de Heinrich tem, de fato, um componente do sucesso reprodutivo das plantas, que foi testado pela maior parte dos estudos. Porém, numa escala temporal, antes da formação do fruto existe a escolha da flor pelo do polinizador. Nesse estudo, conseguimos demonstrar como o polimorfismo de cor floral atua no aprendizado e no engano dos polinizadores, avaliando o momento da escolha às flores visitadas. Assim, mesmo que não seja encontrado um sucesso reprodutivo maior em populações de orquídeas polinizadas por engano com polimorfismo de cor floral, a variação nesse sinal tem efeito no processo do engano ao prejudicar o aprendizado associativo dos polinizadores, suportando a hipótese de Heinrich nesse sentido.

Agradecimentos

Agradecemos Nielson A. P. Salvador pela ajuda na coleta das plantas, Pedro J. Bergamo pela ajuda na coleta de dados e análise da cor floral, André V. Rodrigues pela ajuda

inicial no desenho dos experimentos, Francismeire J. Telles pelo fornecimento do papel fotográfico, e Sidnei Mateus pelo trabalho de meliponicultura ao longo dos experimentos.

Referências

- Ackerman, J. 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, 1(2), 108–113.
- Ackerman, J. D., Cuevas, A. A., & Hof, D. 2011. Are deception-pollinated species more variable than those offering a reward? *Plant Systematics and Evolution*, 293(1–4), 91–99. DOI: 10.1007/s00606-011-0430-6
- Aguiar, J. M. R. B. V., & Pansarin, E. R. 2019. Deceptive pollination of *Ionopsis utricularioides* (Oncidiinae: Orchidaceae). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 250, 72–78. DOI: 10.1016/j.flora.2018.11.018
- Avarguès-Weber, A., & Giurfa, M. 2014. Cognitive components of color vision in honey bees: How conditioning variables modulate color learning and discrimination. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 200, 449–461 DOI: 10.1007/s00359-014-0909-z
- Barth, J., Dipt, S., Pech, U., Hermann, M., Riemensperger, T., & Fiala, A. 2014. Differential associative training enhances olfactory acuity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neuroscience*, 34(5), 1819–1837. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2598-13.2014
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R. H. B., Singmann, H., Dai, B., & Eigen, C. 2017. lme4: Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–113. DOI: 10.18637/jss.v067.i01
- Bretz, F., & Westfall, T. H. P. 2011. *Multiple Comparisons Using R*. CRC Press. DOI: 10.1128/AAC.03728-14
- Brito, V., Telles, F., & Lunau, K. 2014. Ecologia Cognitiva da Polinização. In: A. R. Rech, K. Agostini, P. E. Oliveira, & I. C. Machado (Eds.), *Biologia da Polinização*. pp. 417–438. Rio de Janeiro: Projeto Cultural.
- Chittka, L. 1992. The colour hexagon: a chromaticity diagram based on photoreceptor excitations as a generalized representation of colour opponency. *Journal of Comparative Physiology A*, 170(5), 533–543. DOI: 10.1007/BF00199331
- Chittka, L., Shmida, A., Troje, N., & Menzel, R. 1994. Ultraviolet as a component of flower reflections, and the colour perception of hymenoptera. *Vision Research*, 34(11), 1489–1508. DOI: 10.1016/0042-6989(94)90151-1
- Dyer, A. G., Boyd-Gerny, S., Shrestha, M., Lunau, K., Garcia, J. E., Koethe, S., & Wong, B.

- B. M. 2016. Innate colour preferences of the Australian native stingless bee *Tetragonula carbonaria* Sm. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 202(9–10), 603–613. DOI: 10.1007/s00359-016-1101-4
- Dyer, A. G., & Chittka, L. 2004a. Bumblebees (*Bombus terrestris*) sacrifice foraging speed to solve difficult colour discrimination tasks. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 190(9), 759–763. DOI: 10.1007/s00359-004-0547-y
- Dyer, A. G., & Chittka, L. 2004b. Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. *Naturwissenschaften*, 91(5), 224–227. DOI: 10.1007/s00114-004-0508-x
- Giurfa, M. 2004. Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften*, 91(5), 228–231. DOI: 10.1007/s00114-004-0530-z
- Giurfa, M. 2007. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: A taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 193, 801–824. DOI: 10.1007/s00359-007-0235-9
- Guerrieri, F., Lachnit, H., Gerber, B., & Giurfa, M. 2005. Olfactory blocking and odorant similarity in the honeybee. *Learning and Memory*, 12(2), 86–95. DOI: 10.1101/lm.79305
- Hanson, H. M. 1959. Effects of discrimination training on stimulus generalization. *Journal of Experimental Psychology*, 58(5), 321–334. DOI: 10.1037/h0042606
- Heinrich, B. 1975. Bee Flowers: A hypothesis on flower variety and blooming times. *Evolution*, 29(2), 325–334. DOI: 10.2307/2407220
- Jersáková, J., Johnson, S. D., & Kindlmann, P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews*, 81, 219–235. DOI: 10.1017/S1464793105006986
- Johnson, S. D., & Schiestl, F. P. 2016. *Floral Mimicry*. Oxford University Press.
- Juillet, N., & Scopece, G. 2010. Does floral trait variability enhance reproductive success in deceptive orchids? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 12, 317–322. DOI: 10.1016/j.ppees.2010.05.001
- Kagawa, K., & Takimoto, G. 2016. Inaccurate color discrimination by pollinators promotes evolution of discrete color polymorphism in food-deceptive flowers. *The American Naturalist*, 187(2). DOI: 10.1086/684433
- Kellenberger, R. T., Byers, K. J. R. P., De Brito Francisco, R. M., Staedler, Y. M., LaFountain, A. M., Schönenberger, J., Schiestl, F. P., & Schlüter, P. M. 2019.

- Emergence of a floral colour polymorphism by pollinator-mediated overdominance. *Nature Communications*, 10(1). DOI: 10.1038/s41467-018-07936-x
- Koethe, S., Bossems, J., Dyer, A. G., & Lunau, K. 2016. Colour is more than hue: preferences for compiled colour traits in the stingless bees *Melipona mondury* and *M. quadrifasciata*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 202(9–10), 615–627. DOI: 10.1007/s00359-016-1115-y
- Maia, R., Eliason, C. M., Bitton, P. P., Doucet, S. M., & Shawkey, M. D. 2013. pavo: An R package for the analysis, visualization and organization of spectral data. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(10), 906–913. DOI: 10.1111/2041-210X.12069
- Menzel, R., Ventura, D. F., Werner, A., Joaquim, L. C. M., & Backhaus, W. 1989. Spectral sensitivity of single photoreceptors and color vision in the stingless bee, *Melipona quadrifasciata*. *Journal of Comparative Physiology A*, 166(2), 151–164. DOI: 10.1007/BF00193460
- Montalvo, A. M., & Ackerman, J. D. 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica*, 19, 24–31.
- Papadopulos, A. S. T., Powell, M. P., Pupulin, F., Warner, J., Hawkins, J. A., Salamin, N., Chittka, L., Williams, N. H., Whitten, W. M., Loader, D., Valente, L. M., Chase, M. W., & Savolainen, V. 2013. Convergent evolution of floral signals underlies the success of Neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1765), 20130960–20130960. DOI: 10.1098/rspb.2013.0960
- Perez, M., Nowotny, T., d’Ettorre, P., & Giurfa, M. 2016. Olfactory experience shapes the evaluation of odour similarity in ants: a behavioural and computational analysis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1837), 20160551. DOI: 10.1098/rspb.2016.0551
- Roselino, A. C., Rodrigues, A. V., & Hrncir, M. 2016. Stingless bees (*Melipona scutellaris*) learn to associate footprint cues at food sources with a specific reward context. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 202(9–10), 657–666. DOI: 10.1007/s00359-016-1104-1
- Schimdt, V. M. S., Uchib, R. Z., & Artha, F. G. B. 2003. A stingless bee marks the feeding site in addition to the scent path (*Scaptotrigona aff. depilis*). *Apidologie*, 34, 237–248. DOI: 10.1051/apido
- Schimdt, V. M. S., Uchib, R. Z., & Artha, F. G. B. 2006. article Recruitment in a scent trail laying stingless bee (*Scaptotrigona aff. depilis*): Changes with reduction but not with increase of the energy gain. *Apidologie*, 37, 487–500. DOI: 10.1051/apido

Smithson, A., Juillet, N., Macnair, M. R., & Gigord, L. D. B. 2007. Do rewardless orchids show a positive relationship between phenotypic diversity and reproductive success? *Ecology*, 88(2), 434–442. DOI: 10.1890/05-1445

Stach, S., & Giurfa, M. 2005. The influence of training length on generalization of visual feature assemblies in honeybees. *Behavioural Brain Research*, 161(1), 8–17. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.02.008

Talavera, M., Berjano, R., & Ortiz, P. L. 2013. Abiotic factors may explain the geographical distribution of flower colour morphs and the maintenance of colour polymorphism in the scarlet pimpernel., 1613–1622. DOI: 10.1111/1365-2745.12151

Capítulo 2

As abelhas conseguem discriminar entre isômeros da fragrância floral?

Resumo

Muitas plantas com flores apresentam fragrâncias complexas e variáveis, que usualmente incluem diferentes isômeros da mesma molécula. Como a fragrância é uma pista essencial para o reconhecimento de flores pelos polinizadores, nós perguntamos se abelhas *Apis mellifera* são capazes de discriminar entre isômeros da fragrância floral em um contexto apetitivo. Nós usamos o condicionamento olfativo da resposta de extensão de probóscide, que permite treinar uma abelha imobilizada a um odor pareado com solução de sacarose. As abelhas foram treinadas sob condicionamento absoluto (apenas um odor com recompensa) ou diferencial (um odor com recompensa *versus* um sem recompensa), usando quatro pares diferentes de isômeros. Uma hora após o treinamento, foram testadas a discriminação e generalização entre os pares de isômeros. Abelhas treinadas sob condicionamento absoluto mostraram alta generalização e discriminaram apenas um dos quatro pares de isômeros; após condicionamento diferencial, elas aprenderam a diferenciar dois dos quatro pares de isômeros, mas em todos os casos as respostas ao isômero sem recompensa permaneceram altas, indicando alta generalização. Adicionar um gosto aversivo ao isômero sem recompensa facilitou a discriminação de isômeros que antes eram não discrimináveis, porém a generalização permaneceu alta. Apesar das abelhas discriminarem os isômeros sob algumas circunstâncias, elas realizaram a tarefa com dificuldade e tenderam a generalizar entre eles, revelando que essas moléculas são perceptivamente similares para elas. Concluímos que a presença de isômeros na fragrância floral não necessariamente contribui de forma intensa na diversidade do odor floral.

Palavras-chave: olfato, isômeros, aprendizado, discriminação, generalização, resposta da extensão de probóscide, *Apis mellifera*

Abstract

Many flowering plants present variable complex fragrances, which usually include different isomers of the same molecule. As fragrance is an essential cue for flower recognition by pollinators, we ask whether honey bees discriminate between floral-fragrance isomers in an appetitive context. We used the olfactory conditioning of the proboscis extension response, which allows training a restrained bee with an odor paired with sucrose solution. Bees were trained under an absolute (a single odorant rewarded) or a differential conditioning regime (a

rewarded versus a non-rewarded odorant) using four different pairs of isomers. One hour after training, discrimination and generalization between pairs of isomers were tested. Bees trained under absolute conditioning exhibited high generalization between isomers and discriminated only one out of four isomer pairs; after differential conditioning, they learned to differentiate between two out of four pairs of isomers but in all cases generalization responses to the non-rewarding isomer remained high. Adding an aversive taste to the non-rewarding isomer facilitated discrimination of isomers that otherwise seemed non-discriminable but generalization remained high. Although honeybees discriminated isomers under certain conditions, they achieved the task with difficulty and tended to generalize between them. We conclude that the presence of isomers within floral fragrances might not necessarily contribute to a dramatic extent to floral odor diversity.

Keywords: olfaction, isomers, learning, discrimination, generalization, proboscis extension response, honey bees

Introdução

As flores sinalizam a sua presença e identidade aos polinizadores por meio de pistas sensoriais conspícuas que podem ser atraentes de forma inata ou podem ser aprendidas e memorizadas em associação com o recurso floral que possuem (geralmente néctar e/ou pólen). Desta forma, as plantas obtêm o serviço da fertilização enquanto que os polinizadores obtêm o alimento necessário para a sobrevivência (Kevan & Baker 1983). As fragrâncias florais são atrativos essenciais em interações inseto-planta (Raguso 2008). Elas podem ser aprendidas em associação com alimento, de forma que os polinizadores podem reconhecer flores com recurso pelo seu odor (Riffell *et al.* 2008, Sandoz 2011). Desta forma, a constância floral, i.e. as visitas de forrageamento sucessivas à flores da mesma espécie, desde que sejam vantajosas (Waser 1986, Chittka *et al.* 1999), pode ser mantida, assegurando assim a polinização.

As fragrâncias florais podem conter várias moléculas aromáticas e se apresentar como buquês olfativos de complexa variabilidade (Dudareva & Pichersky 2006, Raguso 2008). Entre esses compostos, podem ser encontrados na fragrância isômeros de uma mesma molécula (Knudsen *et al.* 1993). Essa co-ocorrência é frequente no caso particular das orquídeas polinizadas por engano de alimento. Essas plantas não oferecem recurso e mesmo assim atraem os polinizadores usando diferentes estratégias, garantindo a sua reprodução (Jersáková *et al.* 2006, Wright & Schiestl 2009). Orquídeas polinizadas por engano de alimento apresentam fragrâncias com alta variação intraespecífica (Salzmann & Schiestl

2007, Salzmann *et al.* 2007a,b, Dormont *et al.* 2014), o que pode ser vantajoso para a planta. Como visitar uma flor sem recurso pode ser uma experiência negativa custosa (Jersáková *et al.* 2006, Gaskett 2011) e o polinizador pode aprender, desta forma, a evitar a flor baseando-se nos seus atributos florais, a alta variação intraespecífica dos sinais florais pode interferir nesse aprendizado e manter as visitas dos polinizadores. Em outras palavras, aprender a associação entre atributo floral e ausência de recurso seria mais difícil quando a informação floral é altamente variável (Heinrich 1975, Juillet & Scopece 2010). Visto que alguns polinizadores, como abelhas, podem detectar e aprender variações mínimas nas proporções dos compostos de uma mistura de odores (Locatelli *et al.* 2016), a presença de diferentes isômeros na fragrância floral de orquídeas polinizadas por engano pode promover um aumento na variabilidade olfativa e interferir no aprendizado.

A capacidade de polinizadores em distinguir entre isômeros foi estudada no caso da abelha do mel (*Apis mellifera*), que é um importante polinizador e um modelo padrão para o estudo da percepção, aprendizado e memória olfativa (Giurfa 2007, Sandoz 2011, Matsumoto *et al.* 2012). Essas abelhas são um modelo animal atraente para abordar essa questão já que podem ser facilmente treinadas a pousar em um alvo de odor com recompensa (no caso de abelhas em livre voo) ou a responder a um odor associado à solução de sacarose estendendo a probóscide (REP ou resposta da extensão de probóscide, no caso de abelhas imobilizadas). Em um experimento com abelhas em livre voo, 26 odores foram simultaneamente apresentados em garrafas adjacentes dispostas em um arranjo vertical e as abelhas foram treinadas a pousar na garrafa contendo o odor associado com a recompensa de sacarose. As abelhas foram capazes de discriminar entre alguns isômeros florais, como as formas ópticas de limoneno e α -pineno, mas não outros, como α -terpineol, indicando que a discriminação era específica à substância (Matthias Laska & Galizia 2001). No entanto, como todos os 26 odores foram apresentados simultaneamente e distribuídos em uma grande área, é difícil determinar se as abelhas tiveram de fato acesso à toda essa informação enquanto voavam pelo arranjo de garrafas e, assim, se as suas performances refletem a discriminação baseada na avaliação comparativa das alternativas de odores apresentados.

O condicionamento olfativo de REP, que fornece uma análise mais controlada da discriminação e generalização entre pares de odores (Bitterman *et al.* 1983, M. Giurfa & Sandoz 2012, Matsumoto *et al.* 2012) também já foi utilizado para estudar a discriminação entre isômeros em abelhas imobilizadas. Usando essa abordagem, foi revelado que machos podem ser treinados a discriminar entre os isômeros de ácido 4-methyl-hexanóico (Kafka *et al.* 1973) e que operárias podem ser treinadas a diferenciar isômeros de cresol, que são

indicadores de poluição do ar, água e solo (Blažytė-Čereškienė & Būda 2007). Nenhum desses odores é comum em fragrâncias florais: o primeiro tem um cheiro de queijo para humanos enquanto que o segundo é comumente encontrado em fezes e urina de mamíferos. A discriminação de isômeros presentes em fragrâncias florais foi estudada no caso do terpenóide carvona (Lensky & Blum 1974), em que alta discriminação foi relatada. No entanto, nenhuma informação sobre o condicionamento e teste no protocolo de REP foi fornecida, o que torna difícil avaliar a robustez desses resultados.

Aqui, focamos nos isômeros presentes em fragrâncias florais no intuito de entender a interação entre abelhas e orquídeas polinizadas por engano. A escolha de *A. mellifera* se justifica pelo fato de que esses insetos são conhecidos como visitantes florais de algumas dessas orquídeas (Gumbert & Kunze 2001, Suetsugu & Fukushima 2014, Aguiar & Pansarin 2019) e respostas fisiológicas aos componentes de fragrâncias de orquídeas polinizadas por engano já foram caracterizadas nesses insetos (Galizia *et al.* 2005). De forma específica, nosso objetivo foi determinar se esses insetos aprendem a discriminar entre isômeros comumente encontrados na fragrância floral dessas orquídeas. Nós usamos o condicionamento olfativo de REP e equipamentos de liberação de odores com a maior resolução temporal existente assim como modernos métodos de condicionamento e teste (Matsumoto *et al.* 2012, Szyszka *et al.* 2014).

Nós treinamos as abelhas sob dois regimes de condicionamento diferentes: condicionamento absoluto, em que apenas um odor é pareado com recompensa de sacarose, e condicionamento diferencial, em que dois odores são treinados, i.e. um positivo, associado com recompensa de sacarose, e um negativo, associado com ausência de recompensa ou uma substância de gosto aversivo. Apesar de em ambos os casos as abelhas serem usualmente capazes de responder ao odor pareado com sacarose, a habilidade em discriminar é geralmente aperfeiçoada pelo condicionamento diferencial, uma vez que acredita-se que esse tipo de condicionamento aumenta o processo de atenção e, assim, discriminação de estímulos, não só por abelhas, mas também em outras espécies (Avarguès-Weber & Giurfa 2014, Barth *et al.* 2014, Perez *et al.* 2016). Como o aprendizado de discriminação também é aperfeiçoado se a intensidade da penalização associada ao odor negativo é aumentada (de Brito Sanchez *et al.* 2015), nós ainda estudamos o condicionamento diferencial de isômeros quando o odor negativo é associado com uma substância de sabor aversivo (solução salina concentrada ou solução de quinina) (de Brito Sanchez *et al.* 2015). Em outras palavras, nós tentamos forçar a discriminação olfativa ao seu limite para determinar a real capacidade das abelhas em diferenciar isômeros presentes em fragrâncias florais.

Material e métodos

Abelhas

Indivíduos de *Apis mellifera* (Linnaeus 1758) foram obtidos no apiário do *Centre de Recherches sur la Cognition Animale*, localizado no campus da *Université Paul Sabatier*, Toulouse, França. Operárias forrageadoras, geralmente com 2-3 semanas de idade, foram coletadas quando pousavam em um alimentador contendo solução de sacarose 50% (m/m) antes que começassem a se alimentar. Desta forma, asseguramos que as abelhas capturadas para o experimento possuíssem alta motivação apetitiva. As abelhas foram colocadas em tubos de vidro submersos em gelo por 5 minutos para reduzir a sua atividade, depois posicionadas e imobilizadas individualmente em tubos de plástico e alimentadas com 5 μ l de solução de sacarose 50% (m/m). Os testes comportamentais foram iniciados 3 h após a imobilização das abelhas. Esse período é padrão para manter as abelhas com fome e assegurar alta motivação apetitiva para o condicionamento (Matsumoto *et al.* 2012). Durante esse intervalo, as abelhas foram mantidas em uma estufa escura e úmida, seguindo o protocolo padrão de condicionamento REP (Matsumoto *et al.* 2012).

Estímulos

Isômeros podem ser classificados como estruturais ou espaciais. Isômeros estruturais (isômeros constitucionais) possuem a mesma fórmula molecular, porém diferentes padrões de ligação e organização dos átomos; isômeros espaciais (estereoisômeros) possuem a mesma sequência de átomos, diferindo nas suas orientações no espaço, mas não na conectividade ou ligação (IUPAC, <http://goldbook.iupac.org>). Nós usamos quatro pares de isômeros, sendo três estereoisômeros e um par de isômeros estruturais (Fig. 1). Como isômeros estruturais, utilizamos α -pineno e β -pineno, que foram obtidos a partir da mistura racêmica 1:1 dos seus respectivos estereoisômeros. Como estereoisômeros, utilizamos os pares R-(+)-limoneno e S-(-)-limoneno, (+)- α -pineno e (-)- α -pineno, e (+)- β -pineno e (-)- β -pineno. Escolhemos esses isômeros uma vez que são comumente encontrados nas fragrâncias altamente variáveis de várias espécies de orquídeas polinizadas por engano de alimento, e também em flores de várias outras espécies de plantas (e.g. Salzmänn *et al.* 2007a,b, Dormont *et al.* 2014). Assim, a performance de abelhas em experimentos controlados de discriminação olfativa deve revelar o papel desses odores na polinização dessas plantas. Todos os estímulos utilizados foram comprados da Sigma-Aldrich® (Saint-Quentin Fallavier, França). A Tabela 1 mostra a pureza dos odores utilizados.

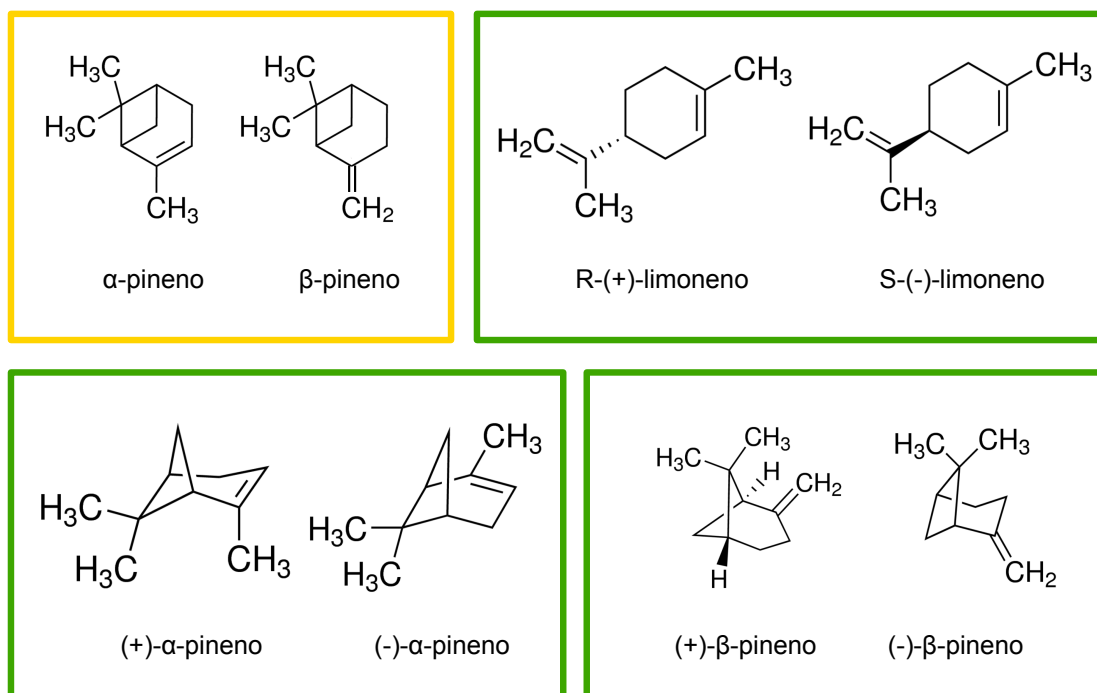


Fig. 1. Isômeros utilizados como estímulos no condicionamento. Cada quadro apresenta um par de isômeros, que foram usados nos experimentos. O quadro amarelo contém o par de isômeros estruturais, enquanto que os quadros verdes contêm os estereoisômeros.

Tabela 1. Pureza* dos odores utilizados

Odor	Pureza (%)
(+)- α -pineno	98.0
(-)- α -pineno	98.0
(+)- β -pineno	99.0
(-)- β -pineno	99.0
(R)-(+)-limoneno	97.0
(S)-(-)-limoneno	96.0

*Valores de pureza de acordo com medidas de cromatografia gasosa (descrição comercial do produto).

Condicionamento olfativo

Os odores foram utilizados como estímulos condicionados no condicionamento olfativo REP, um protocolo de condicionamento apetitivo Pavloviano que permite o treinamento de abelhas imobilizadas a associar odores, o estímulo condicionado (EC), com uma recompensa de solução de sacarose, o estímulo não condicionado (ENC).

O procedimento experimental do condicionamento olfativo REP foi o padrão descrito por Matsumoto *et al.* (2012). Antes do condicionamento, as abelhas foram testadas para REP

não condicionada, apresentando solução de sacarose 50% (m/m) à antena (o que induz REP). Abelhas que não apresentaram REP durante essa estimulação inicial estavam saciadas, em má condição física (exaustas) ou fisicamente impedidas (a probóscide estava presa ao tubo de imobilização). Independentemente do motivo para a ausência de REP, abelhas que não responderam à solução de sacarose nessa etapa foram removidas do experimento. De fato, uma ausência de REP à sacarose resulta na ausência de REP ao odor condicionado, o que nesses casos não necessariamente corresponde à ausência de aprendizado (Matsumoto *et al.* 2012).

Os odores a serem condicionados estavam contidos em tubos de vidro e foram expostos à abelha por um equipamento automatizado de liberação de odores controlado por um microcomputador (Arduino® Uno, Tilburg, North Brabant, Holanda). A abelha imobilizada foi posicionada em frente ao equipamento. A instalação liberava um fluxo de ar limpo contínuo para a antena da abelha e o fluxo podia ser direcionado para os tubos contendo os odores, para fornecer o estímulo condicionado por 4 s. Um exaustor de ar foi posicionado atrás da abelha para prevenir a acumulação de odores. Em seguida à estimulação de odor, a solução de sacarose 50% (m/m) (ENC) foi apresentada à antena e probóscide por 3 s, com 1 s de sobreposição com a apresentação de odor, no caso de EC+ (EC com recompensa). Assim, o intervalo entre estímulos era 2 s. Cada repetição durou 1 minuto e começou com o posicionamento da abelha na instalação por 26 s, seguido pela estimulação EC-ENC (por um total de 6 s); finalmente, a abelha permaneceu na instalação por mais 28 s até ser substituída pela próxima abelha a ser treinada. Uma hora após o condicionamento, um teste de retenção de memória foi realizado, em que o EC era apresentado sem recompensa. Nesse teste o outro isômero do par também foi apresentado para avaliar a presença generalização ou discriminação, dependendo do experimento realizado. Os odores foram apresentados no teste em uma sequência aleatória de uma abelha para outra.

Experimento 1: condicionamento absoluto

No condicionamento absoluto, um único odor era pareado com recompensa de sacarose. Para isso, foram realizadas três repetições de condicionamento, espaçadas em 10 minutos, uma vez que isso assegura alta aquisição e retenção (Menzel 1999, Giurfa 2007, Giurfa & Sandoz 2012). Dois grupos de abelhas foram condicionados em paralelo, cada um com um dos isômeros de um determinado par como EC+. Uma hora após o condicionamento, ambos os grupos eram testados para retenção, em que o EC era apresentado, e para generalização em que era apresentado o outro isômero do par. Durante o teste, não era

apresentada recompensa.

Experimento 2: condicionamento diferencial

No condicionamento diferencial, dois odores foram utilizados como EC: um pareado com recompensa de sacarose (EC+), e outro que não era associado com recompensa (EC-). As abelhas tinham que aprender a discriminar entre EC+ e EC-. Essa forma de condicionamento é particularmente útil para determinar se indivíduos podem de fato diferenciar dois estímulos, já que aperfeiçoa a discriminação em várias espécies e modalidades sensoriais, devido ao efeito diferente de cada estímulo condicionado (Hanson 1959, Giurfa *et al.* 1999, Dyer & Chittka 2004, Giurfa 2004, Avarguès-Weber & Giurfa 2014, Barth *et al.* 2014, Perez *et al.* 2016).

Os dois isômeros de um par foram usados como estímulo condicionado para determinar se abelhas conseguem de fato discriminar entre eles. Dez repetições de condicionamento espaçadas em 10 minutos foram realizadas (i.e. cinco repetições EC+ e cinco EC-). A apresentação de EC+ e EC- durante o condicionamento foi pseudoaleatória. Assim como no experimento anterior, as abelhas passaram por um teste de retenção 1 h após o condicionamento. Nesse teste, elas eram apresentadas novamente aos dois odores treinados na ausência de recompensa.

Experimento 3: condicionamento diferencial com penalidade maior no EC-

Para potencialmente melhorar o aprendizado de discriminação entre isômeros, nós aumentamos a penalidade associada ao EC-, uma vez que foi demonstrado que esse procedimento aprimora a discriminação (Avarguès-Weber & Giurfa 2014). Enquanto que o EC+ continuou a ser pareado com recompensa de sacarose, o EC- agora foi pareado com solução de quinina 60 mmol l⁻¹ ou com solução 3 mol l⁻¹ de sal (NaCl), o que tem efeito no condicionamento olfativo diferencial (M. G. de Brito Sanchez *et al.* 2015). Esse experimento foi realizado com o par (+)- α -pineno e (-)- α -pineno como EC. Escolhemos esse par de isômeros uma vez que as abelhas foram incapazes de diferenciar entre eles nos Experimentos 1 e 2 (veja a seção Resultados para detalhes).

Análise de dados e estatística

Durante os testes e condicionamento, a REP foi registrada como uma resposta binomial (0 para ausência de REP e 1 para a ocorrência de REP). Nós calculamos e representamos a proporção de abelhas que exibiram REP aos odores condicionados (i.e.

respostas condicionadas) em todos os condicionamentos e testes. Para a aquisição durante o condicionamento, a proporção de abelhas que respondeu ao EC+ (condicionamento absoluto) ou ao EC+ e EC- (condicionamento diferencial) foi analisada por um modelo linear generalizado misto (GLMM) para a família binomial, em que “Repetição” foi considerada um fator contínuo (efeito da repetição) e “Identidade Individual” (Abelha) e “Data” (réplica) como efeitos aleatórios (efeito individual). Esse procedimento revelou que não existe efeito da identidade do EC+ em cada par de isômeros, i.e. que o aprendizado era o mesmo, independentemente de qual isômero do par era associado à recompensa de sacarose. Assim, podemos agregar esses dados tanto para a aquisição quanto para os testes. Múltiplas comparações foram realizadas com método de Tukey (valores z mostrados ao longo do manuscrito).

Toda a análise estatística foi realizada com o software R 3.4.2 (<http://www.R-project.org/>). Os pacotes *lme4* e *lsmeans* (Bretz & Westfall 2011, Bates *et al.* 2017) foram utilizados para o GLMM e o método de Tukey para comparações múltiplas, respectivamente.

Resultados

Experimento 1: condicionamento absoluto

Nós treinamos abelhas a associar um determinado isômero com recompensa de solução de sacarose. O teste de retenção foi realizado 1 h após o condicionamento, apresentado o isômero treinado sem recompensa. O outro isômero do par também foi apresentado em um teste de generalização 1 h após o condicionamento. O aprendizado foi similar para ambos isômeros de um par, de forma que uma única curva de aquisição é mostrada na Fig. 2 para cada par. Para todos os isômeros treinados, foi encontrado um efeito de repetição (isômeros estruturais de pineno: $gl=2$, $\chi^2=45.814$, $P<0.001$, $N=65$; estereoisômeros de α -pineno: $gl=2$, $\chi^2=55.483$, $P<0.001$, $N=61$; estereoisômeros de β -pineno: $gl=2$, $\chi^2=62.136$, $P<0.001$, $N=63$; estereoisômeros de limoneno: $gl=2$, $\chi^2=49.857$, $P<0.001$, $N=61$), indicando que as abelhas aprenderam ao longo das repetições a associar o isômero treinado à recompensa de açúcar (Fig. 2).

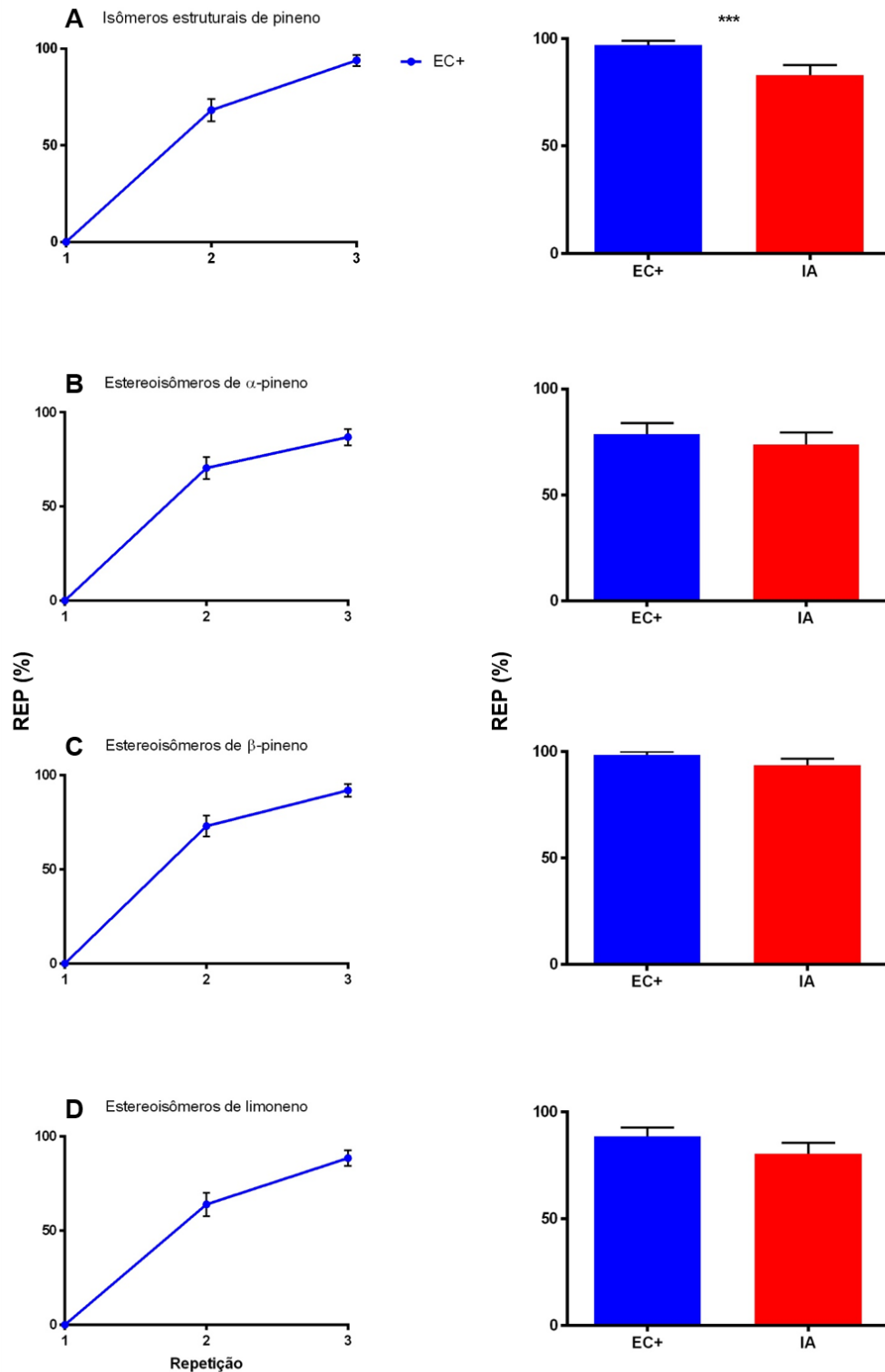


Fig. 2. Experimento 1: condicionamento absoluto. Os quadros à esquerda mostram as curvas de aquisição agrupadas para os dois subgrupos de cada par de isômeros (cada subgrupo foi treinado com um dos isômeros de cada par) durante o condicionamento absoluto. As abelhas foram treinadas a associar um isômero (EC+) com solução de sacarose ao longo de três repetições. Os quadros à direita mostram as performances agrupadas de retenção (barra azul, resposta ao EC+) e generalização (barra vermelha, resposta ao isômero alternativo (IA)) dos dois subgrupos de cada par de isômeros testados 1 h após o condicionamento, na ausência de recompensa. Uma discriminação significativa entre EC+ e IA foi encontrada apenas para o par de isômeros estruturais de pineno ($P < 0.001$, ANOVA). No entanto, em todos os casos, incluindo o dos isômeros estruturais de pineno, a generalização para o IA foi muito alta, revelando, assim, que as abelhas percebem os isômeros de um par como altamente similares. As barras de erro representam o erro padrão da média. (A) isômeros estruturais de pineno,

$N=65$; (B) estereoisômeros de α -pineno, $N=61$; (C) estereoisômeros de β -pineno, $N=63$; (D) estereoisômeros de limoneno, $N=61$. REP, resposta de extensão de probóscide. *** $P<0.001$.

Durante os testes de retenção, as abelhas responderam ao EC+ em um nível similar ao obtido na última repetição do condicionamento (Fig. 2, barras azuis), revelando uma eficiente retenção a médio prazo. A resposta ao isômero alternativo (IA), não treinado, também foi alta e comparável àquela do EC+, revelando alta generalização ou ausência de discriminação entre isômeros de um par. Esse resultado foi particularmente evidente para os pares de estereoisômeros (estereoisômeros de α -pineno: EC+ = 78.68%, IA = 73.77%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=1.9467$, $P=0.16$; estereoisômeros de β -pineno: EC+ = 93.65%, IA = 88.88%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=1.0374$, $P=0.30$; estereoisômeros de limoneno: EC+ = 88.52%, IA = 80.32%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=3.6709$, $P=0.06$). No caso dos isômeros estruturais de pineno, a generalização também foi alta, porém significativamente diferente da resposta ao EC+ (EC+ = 96.92%, IA = 83.07%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=14.1759$, $P<0.001$), indicando que 1 h após o condicionamento absoluto as abelhas conseguem diferenciar entre esses dois isômeros estruturais (Fig. 2A), mesmo que eles tenham sido tratados como altamente similares por elas. No caso dos estereoisômeros, permanece a dúvida de se eles podem ser de fato diferenciados. O próximo experimento buscou responder essa questão.

Experimento 2: condicionamento diferencial

Nós treinamos abelhas a discriminar os dois isômeros de um par ao recompensar um com solução de sacarose e não apresentar recompensa junto ao outro. Desta forma, nós buscamos determinar se as abelhas podem de fato discriminar entre isômeros que desencadearam respostas similares no experimento anterior. A retenção de memória foi testada 1 h após o condicionamento, apresentando tanto EC+ quanto EC-. Para todos os pares de isômeros, a aquisição foi similar, independentemente de qual isômero de um par era associado com ou sem recompensa. Assim, o resultado dos dois subgrupos de um par de isômeros foram agrupados e apresentados como curvas de discriminação de EC+ *versus* EC- (Fig. 3, quadros à esquerda).

Para todos os pares de isômeros, encontramos um efeito de repetição, uma vez que as respostas variaram ao longo do condicionamento (isômeros estruturais de pineno: $gl=4$, $\chi^2=125.899$, $P<0.001$, $N=65$; estereoisômeros de α -pineno: $gl=4$, $\chi^2=128.510$, $P<0.001$, $N=63$; estereoisômeros de β -pineno: $gl=4$, $\chi^2=119.829$, $P<0.001$, $N=67$; estereoisômeros de limoneno: $gl=4$, $\chi^2=124.908$, $P<0.001$, $N=61$). No entanto, para todos os pares de isômeros, as

respostas aumentaram tanto para o EC+ quanto para o EC- de forma que em três dos quatro casos (estereoisômeros de α -pineno, estereoisômeros de β -pineno e isômeros estruturais de pineno) as abelhas foram incapazes de discriminar entre dois isômeros de um par ao longo do condicionamento (EC+ *versus* EC-: isômeros estruturais de pineno: $z_{1298}=-1.910$, $P=-0.66$; estereoisômeros de α -pineno: $z_{1258}=1.403$, $P=0.92$; estereoisômeros de β -pineno: $z_{1398}=0.339$, $P=1$). Apenas no caso dos estereoisômeros de limoneno (Fig. 3D), a discriminação foi significativa (EC+ *versus* EC-: $z_{1218}=-4.334$, $P<0.01$), mas, mesmo nesse caso, o nível de resposta ao EC- permaneceu alto ao final do treinamento.

Nos testes de retenção, as abelhas novamente responderam ao EC+ em um nível similar ao atingido na última repetição do condicionamento (Fig. 3, barras azuis). As respostas ao EC- permaneceram altas e a discriminação foi mais uma vez visível para os estereoisômeros de limoneno (EC+ = 98.36%, EC- = 54.09%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=13.1679$, $P<0.001$), mas também para os isômeros estruturais de pineno (EC+ = 98.41%, EC- = 69.84%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=8.5088$, $P=0.03$). Os outros pares não foram discrimináveis (estereoisômeros de α -pineno: EC+ = 96.92%, EC- = 89.23%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=3.0227$, $P=0.08$; estereoisômeros de β -pineno: EC+ = 85.07%, EC- = 74.62%; efeito da escolha, $gl=1$, $\chi^2=1.3716$, $P=0.24$). Assim, após condicionamento diferencial, a discriminação foi encontrada para os isômeros estruturais de pineno e estereoisômeros de limoneno (Fig. 3A,D), No entanto, mesmo que esses isômeros tenham sido discrimináveis, foram observados altos níveis de generalização entre os membros de um par. Nos outros casos, as abelhas não apresentaram discriminação significativa entre isômeros (Fig. 3B,C).

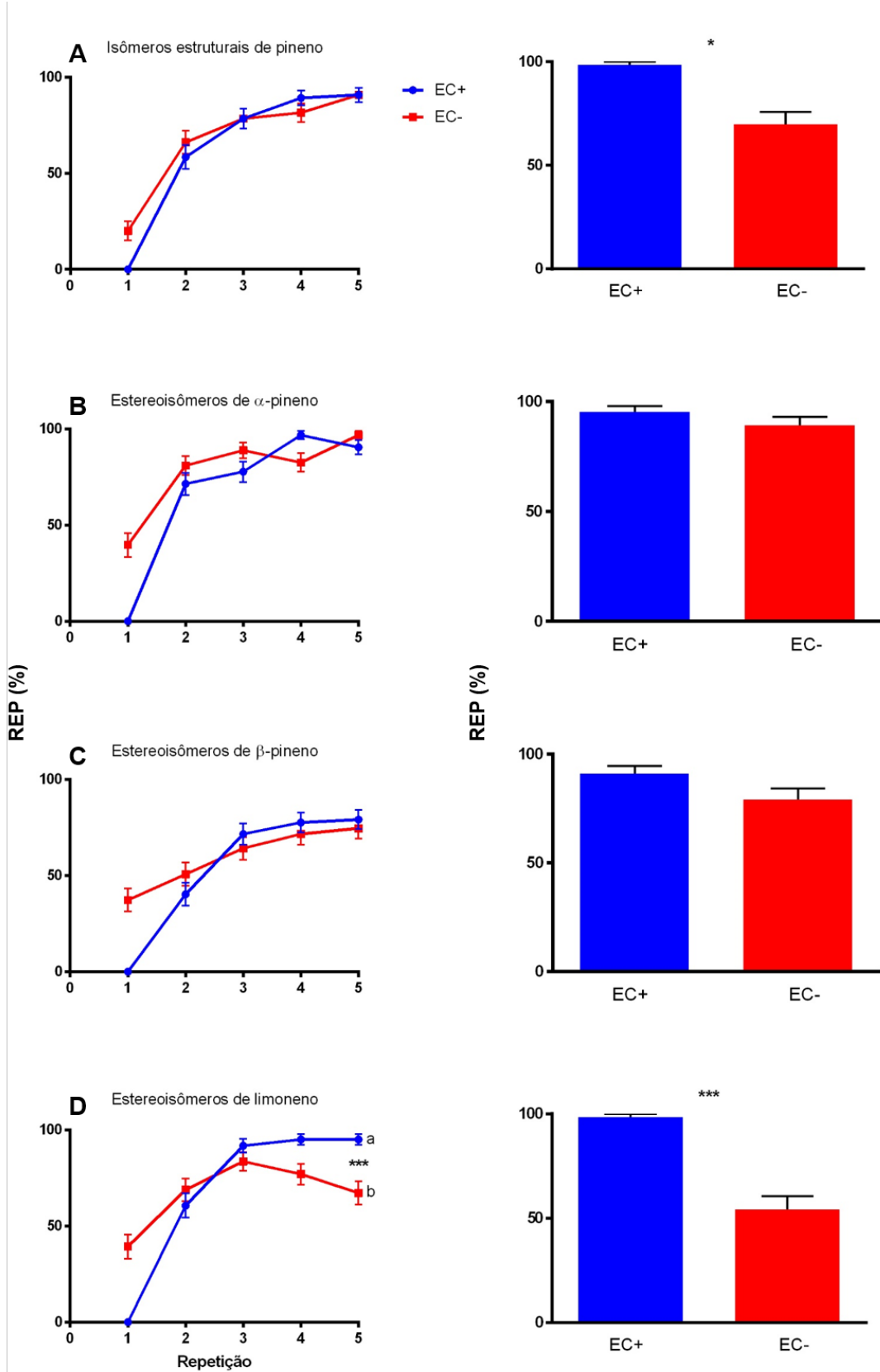


Fig. 3. Experimento 2: condicionamento diferencial. Os quadros à esquerda mostram as curvas de aquisição agrupadas para os dois subgrupos de cada par de isômeros usados para treinar a discriminação dos isômeros em condicionamento diferencial. As abelhas foram treinadas a associar um isômero com solução de sacarose (EC+) e o isômero alternativo na ausência de recompensa (EC-) ao longo de dez repetições (cinco repetições de EC+ e

cinco de EC-). As abelhas aprenderam a diferenciar entre os estereoisômeros de limoneno ($P < 0.001$, teste de Tukey) Os quadros à direita mostram as performances agrupadas de retenção (barra azul, resposta ao EC+; barra vermelha, resposta ao EC) dos dois subgrupos de cada par de isômeros testados 1 h após o condicionamento, na ausência de recompensa. A discriminação foi mais uma vez visível para os estereoisômeros de limoneno ($P < 0.001$, ANOVA) e agora também para os isômeros estruturais de pineno ($P = 0.03$, ANOVA). Em todos os casos, observou-se uma alta generalização entre EC+ e EC-. As barras de erro representam o erro padrão da média. (A) isômeros estruturais de pineno, $N = 65$; (B) estereoisômeros de α -pineno, $N = 61$; (C) estereoisômeros de β -pineno, $N = 63$; (D) estereoisômeros de limoneno, $N = 61$. REP, resposta de extensão de probóscide. * $P < 0.005$; *** $P < 0.001$.

Experimento 3: o efeito das soluções de quinina e de sal no aprendizado de discriminação

Nesse experimento, nós buscamos melhorar a discriminação ao aumentar a penalidade associada ao EC- no procedimento de condicionamento diferencial. Enquanto que o EC+ continuou a ser pareado com recompensa de sacarose, o EC- foi agora pareado com solução de quinina 60 mmol l⁻¹ ou com solução 3 mol l⁻¹ de NaCl. Esse experimento foi realizado com os estereoisômeros de α -pineno, os quais não foram discriminados pelas abelhas nos experimentos anteriores.

Quando a solução de quinina foi utilizada como reforço negativo pareado ao EC- (Fig. 4A), a aquisição não mudou ao compararmos com a obtida quando o EC- não era reforçado (Fig. 3B). O grupo de abelhas treinado com quinina aumentou as respostas ao longo do condicionamento (efeito da repetição: $gl = 4$, $\chi^2 = 64.328$, $P < 0.001$, $N = 60$) mas não aprendeu a discriminar entre EC+ e EC- (EC+ *versus* EC-: $z_{858} = 1.553$, $P = 0.87$). Apenas no teste de retenção, uma discriminação significativa foi encontrada (EC+ = 90.47%, EC- = 80.95%; efeito da escolha, $gl = 1$, $\chi^2 = 4.6378$, $P = 0.03$) mas as respostas tanto ao EC+ quanto ao EC- foram altas (Fig. 4A, barras azul e vermelha); assim, foi revelado um alto nível de generalização entre isômeros.

Quando a solução salina foi utilizada como reforço negativo pareado ao EC- (Fig. 4B), as abelhas também aumentaram as respostas ao longo do condicionamento (efeito da repetição: $gl = 4$, $\chi^2 = 97.373$, $P < 0.001$, $N = 60$), mas, desta vez, elas foram capazes de discriminar entre os dois estereoisômeros de α -pineno ao final do treinamento (Fig. 4B, EC+ *versus* EC-: $z_{1198} = -4.399$, $P < 0.001$).

Durante os testes de retenção, as abelhas responderam significativamente mais ao EC+ que ao EC- (EC+ = 90.00%, EC- = 71.66%; efeito da escolha, $gl = 1$, $\chi^2 = 19.879$, $P < 0.001$), confirmando dessa forma a significativa discriminação observada ao final do treinamento (Fig. 4B, barras azul e vermelha). Mais uma vez, altas porcentagens de generalização foram observadas entre os dois isômeros, assim como nos últimos dois experimentos. Desse modo, sob certas circunstâncias de reforço durante o condicionamento (aqui, o uso de solução salina

como um ENC aversivo), a discriminação entre isômeros pode ser melhorada. No entanto, mesmo nesses casos, essa tarefa permanece difícil para as abelhas, devido aos altos níveis de generalização entre os isômeros testados.

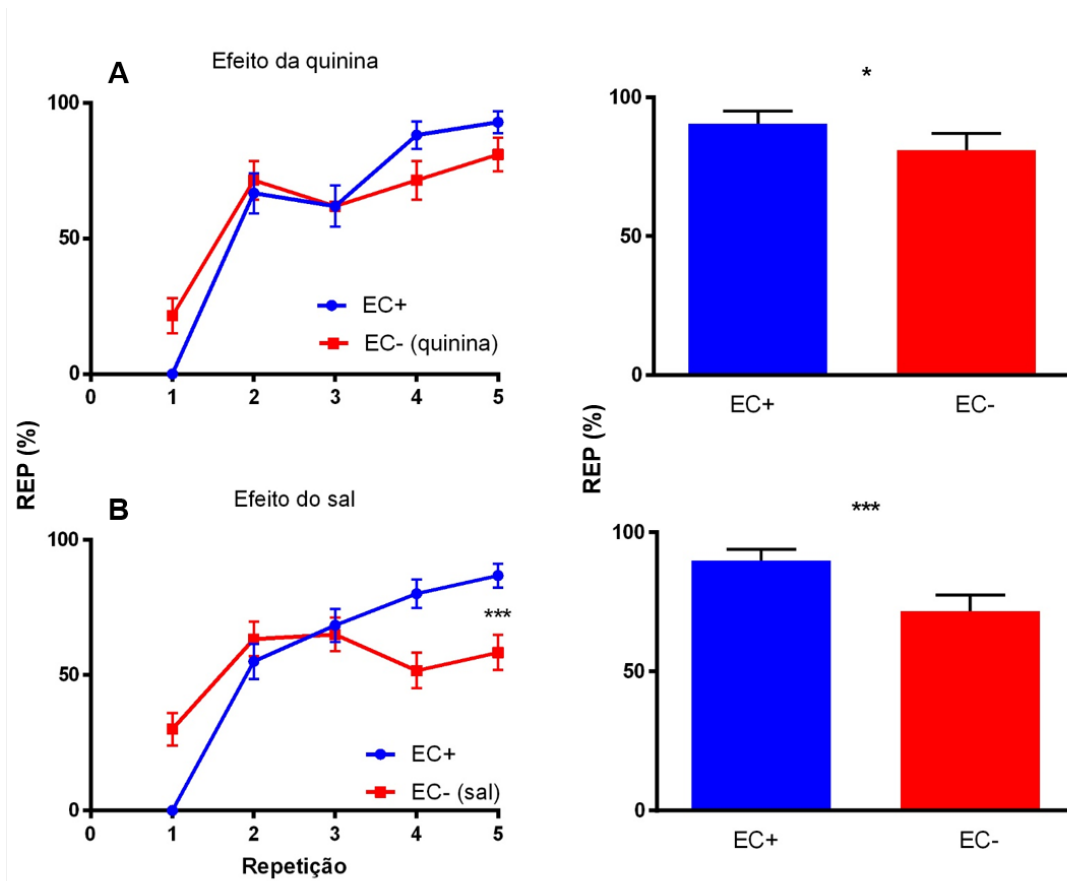


Fig. 4. Experimento 3: o efeito das soluções de quinina e de sal no aprendizado de discriminação. Os quadros à esquerda mostram as curvas de aquisição agrupadas para os dois subgrupos treinados a discriminar os dois estereoisômeros de α -pineno em condicionamento diferencial. (A) As abelhas (N=60) foram treinadas a associar um isômero (EC+) com solução de sacarose e o isômeros alternativo (EC-) com solução de quinina ao longo de dez repetições de condicionamento (cinco EC+ e cinco EC-). (B) As abelhas (N=60) foram treinadas a associar um isômero (EC+) com solução de sacarose e o isômeros alternativo (EC-) com solução de sal (NaCl) ao longo de dez repetições de condicionamento (cinco EC+ e cinco EC-). Apenas as abelhas treinadas com solução concentrada de NaCl aprenderam a discriminação ($P < 0.001$, teste de Tukey). Em (A) e (B), os quadros à direita mostram as performances de retenção agregadas (barra azul, resposta ao EC+; barra vermelha, resposta ao EC-) dos dois subgrupos testados 1 h após o condicionamento, na ausência de recompensa. Tanto o grupo da quinina, quanto o grupo do sal responderam significativamente mais ao EC+ que ao EC- (grupo quinina: $P = 0.03$; grupo sal: $P < 0.001$, ANOVA). Em ambos os grupos foi observado um alto nível de generalização entre EC+ e EC-. As barras de erro representam o erro padrão da média. REP, resposta de extensão de probóscide. * $P < 0.005$; *** $P < 0.001$.

Discussão

Nós realizamos experimentos controlados de aprendizado e memória de odores, para avaliar a capacidade da abelha do mel em discriminar isômeros comumente encontrados na fragrância floral de orquídeas polinizadas por engano de alimento. Se os isômeros fossem facilmente discriminados, a sua presença variável nas fragrâncias florais poderia contribuir para a diversidade desse atrativo floral de orquídeas polinizadas por engano, tornando difícil a associação entre ausência de recurso e sinais olfativos. Nós encontramos que, apesar das abelhas aprenderem facilmente a associar os isômeros florais com recompensa de sacarose, e lembrar de tal associação após 1 h, é difícil para elas discriminar entre pares de isômeros e, se elas o fazem, apresentam altos níveis de generalização entre esses estímulos similares. Isso indica que os isômeros utilizados em nosso estudo são muito semelhantes entre eles para as abelhas. Em outras palavras, se a polinização por engano em orquídeas depende em parte da variação intraespecífica na fragrância, a presença de isômeros pode não contribuir de forma expressiva na diversidade desse sinal floral.

A discriminação olfativa não é uma capacidade sensorial que depende apenas das propriedades estruturais dos odores considerados. Ela também varia significativamente dependendo do procedimento de condicionamento empregado e, assim, da forma em que os investigadores fazem as suas perguntas (Giurfa 2004, Li *et al.* 2008, Linster *et al.* 2002). Em especial, o condicionamento diferencial melhora a discriminação de odores, uma vez que demanda aos animais aprender a responder a um odor com recompensa e não responder a um odor sem recompensa (Barth *et al.* 2014, Perez *et al.* 2016). Isso resulta em dois processos independentes sendo gerados: um gradiente de generalização excitatório em torno do EC+, e um gradiente inibitório em torno do EC- (Hanson 1959, Avarguès-Weber & Giurfa 2014). Interações aditivas e multiplicativas entre esses gradientes foram propostas como explicação das performances de discriminação (Perez *et al.* 2016). Particularmente, foi sugerido que o condicionamento diferencial aprimoraria o processo de atenção, melhorando, assim, a discriminação entre EC+ e EC- (e.g. Carrillo *et al.* 2000). Insetos não são exceção nesse caso: o condicionamento diferencial melhora a discriminação e diminui o nível de generalização entre estímulos olfativos em moscas (Barth *et al.* 2014) e formigas (Josens *et al.* 2009, Perez *et al.* 2016, Desmedt *et al.* 2017). Um fenômeno similar foi observado no caso da discriminação visual em abelhas do mel (Avarguès-Weber & Giurfa 2014). Nos nossos experimentos, diferenças entre condicionamento absoluto e diferencial podem ser observadas se focarmos nas performances de retenção após o treinamento, que foram obtidas sob condições idênticas nos testes. Após condicionamento absoluto, a discriminação ocorreu

apenas para os isômeros estruturais de pineno (α - e β -pineno). Após condicionamento diferencial, a discriminação ocorreu tanto para esse par de isômeros quanto para o par de estereoisômeros de limoneno [R-(+)-limoneno e S-(+)-limoneno]. A diferenciação aumentou entre condicionamentos absoluto e diferencial de 13.85% para 25.57% no caso do pineno e de 8.20% para 44.27% no caso do limoneno. Note que a diferenciação de 8.20% quase atingiu significância estatística ($P=0.06$), o que revela que a mudança no procedimento de condicionamento permitiu que a discriminação fosse possível no caso desses odores. No entanto, em ambos os casos, o nível de respostas ao EC- após condicionamento diferencial permaneceu alto. Essas respostas foram ainda mais altas nos casos dos outros pares de estereoisômeros [(+)- e (-)- α -pineno; (+)- e (-)- β -pineno], em que não foi encontrada discriminação após condicionamento diferencial.

Aumentar a penalidade associada ao CS- durante o condicionamento diferencial pode também impulsionar a discriminação entre estímulos (Avarguès-Weber & Giurfa 2014, M. G. de Brito Sanchez *et al.* 2015). Na abelha do mel, associar o EC- a uma substância de sabor aversivo, como solução concentrada (3 mol l⁻¹) de NaCl e, com menor efeito, solução concentrada (60 mmol l⁻¹) de quinina, aumentam a discriminação entre EC+ e EC- no condicionamento olfativo REP (de Brito Sanchez *et al.* 2015). Nossos resultados revelam que para o par de estereoisômeros de α -pineno, que não podem ser diferenciados tanto em condicionamento absoluto quanto diferencial, a discriminação foi possível quando o EC- era pareado com quinina. Isso foi ainda mais aprimorado quando a associação foi feita com a solução salina (Fig. 4). Essa diferença na força inibitória entre quinina e NaCl também foi encontrada por de Brito Sanchez *et al.* (2015), e indica que, para o paladar da abelha do mel, a solução concentrada de quinina provavelmente não é tão aversiva quanto para humanos (de Brito Sanchez 2011), dado que o seu efeito foi relativamente baixo (3% de aprimoramento na discriminação) comparado à solução salina (11% de aprimoramento). Esses resultados podem ser explicados baseados no aprimoramento ou piora no processo de atenção resultante da presença ou ausência de uma penalidade maior associada ao EC- (Aavarguès-Weber & Giurfa 2014). A ausência de penalidade ou a presença de uma baixa penalidade (solução de quinina) não aumentaria a atenção, fazendo com que os estereoisômeros de α -pineno fossem dificilmente discrimináveis. De forma contrária, a presença da solução altamente aversiva de NaCl aumentaria o processo de atenção acerca das escolhas discriminativas, aprimorando, assim, a diferenciação. Note, no entanto, que mesmo sob essas condições, as abelhas continuaram a responder em um nível muito alto ao EC-, revelando que a tarefa era particularmente difícil em termos perceptuais.

Estudos anteriores mostram que abelhas em livre voo e imobilizadas alcançam melhores performances de discriminação quando treinadas a diferenciar isômeros. Usando abelhas do mel em livre voo, Laska & Galizia (2001) treinaram os animais a pousar em três garrafas contendo um odor com recurso em uma matriz de 48 garrafas similares dispostas em um arranjo vertical de 70x80 cm com seis fileiras, cada uma com oito garrafas. As outras garrafas continham odores alternativos, sem recompensa. Em um teste sem recompensa, as abelhas tinham que detectar a única garrafa contendo o odor previamente recompensado, dentre os outros odores não recompensados presentes nas outras garrafas. Os estímulos incluíram 10 pares de isômeros. As abelhas foram capazes de discriminar entre os estereoisômeros de limoneno, α -pineno, β -citronelol, mentol e carvona, mas falharam em distinguir entre as formas (+) e (-) de α -terpineol, cânfora, óxido de rosa, fenchona e 2-butanol. No nosso estudo, usamos o condicionamento olfativo de REP e abelhas imobilizadas, o que permite um cenário mais controlado que aquele com abelhas em livre voo. Encontramos diferenciação entre os isômeros estruturais de pineno e entre os estereoisômeros de limoneno após condicionamento diferencial, e entre os estereoisômeros de α -pineno quando a solução de NaCl foi pareada ao EC- em condicionamento diferencial. No entanto, em todos os casos foram observados altos níveis de generalização entre os odores, enquanto que Laska & Galizia (2001) observaram abelhas escolhendo com mais de 90% de acurácia. Essa diferença pode ser explicada ao considerarmos o desenho experimental utilizado nos dois casos. Primeiramente, é provável que seja mais custoso para uma abelha voar e escolher um alvo do que apenas estender sua probóscide. Assim, a acurácia poderia ser aprimorada em um cenário com abelhas em livre voo. Porém, nosso condicionamento de REP olfativo comparou respostas explícitas aos dois isômeros de um par que foram apresentados de forma temporalmente adjacente (i.e. eles foram apresentado um após o outro), enquanto que o desenho de Laska & Galizia (2001) não apresentou controle para a adjacência na apresentação de isômeros com e sem recompensa. Assim, odores percebidos imediatamente após a escolha do isômero treinado poderiam ser muito diferentes, facilitando o contraste perceptual e discriminação. Além disso, dada a grande área em que as abelhas deveriam voar, o tipo de informação utilizado durante as suas escolhas, e os odores que compararam sucessivamente enquanto voavam pela matriz experimental permanecem desconhecidos. Finalmente, devido ao grande número de odores treinados nesse experimento ($N=26$), apenas três abelhas foram treinadas e testadas por estímulo com recompensa (Laska & Galizia 2001), tamanho amostral esse que poderia distorcer conclusões e que contrasta com o alto número de indivíduos (pelo menos 30 por odor treinado) do nosso protocolo de REP.

Além do estudo com as abelhas em livre voo, três estudos anteriores usaram o condicionamento REP para investigar a discriminação entre isômeros por abelhas do mel. Um deles mostrou que machos podem ser treinados a discriminar entre isômeros de ácido 4-metilhexanóico (Kafka et al. 1973) enquanto que o outro revelou que operárias podem distinguir entre isômeros de cresol, que são indicadores de poluição (Blažytė-Čereškienė & Būda 2007). Esses odores, no entanto, não são encontrados nas fragrâncias de flores polinizadas por abelhas. Na verdade, isômeros de cresol são conhecidos por serem repelentes para as abelhas (Kite 1995, Jürgens *et al.* 2006). O único estudo que utilizou condicionamento olfativo REP para determinar se abelhas eram capazes de distinguir entre isômeros presentes nas fragrâncias florais (Lensky & Blum 1974) revelou uma alta discriminação entre os estereoisômeros de carvona – um odor presente em muitas flores polinizadas por abelhas Euglossinae (Armbruster *et al.* 1989, Whitten *et al.* 1986). Porém, esse estudo não fornece informações nem sobre o procedimento do condicionamento REP nem sobre a análise dos dados, o que torna impossível de comparar tais resultados com os de nosso estudo. Nosso trabalho é o primeiro estudo detalhado analisando a discriminação olfativa de isômeros presentes em fragrâncias florais por abelhas do mel, usando o procedimento de condicionamento olfativo REP.

Nós encontramos que a discriminação entre isômeros é específica à substância. Enquanto que foi mais difícil para as abelhas discriminarem entre os isômeros de pineno, a discriminação entre isômeros de limoneno foi possível sob condicionamento diferencial. De fato, a discriminação do último parece ser uma tarefa simples para outras espécies, como humanos e macacos-esquilo (Laska *et al.* 1999, Laska & Galizia 2001). Foi demonstrado que a discriminação e generalização entre odores depende da concentração dos odores utilizados (Wright e Smith 2004). Concentrações muito baixas (e.g. $0.0002 \text{ mol l}^{-1}$) resultam em alta generalização, enquanto que altas concentrações (e.g. 0.2 mol l^{-1} e 2.0 mol l^{-1}) promovem discriminação. No nosso caso, utilizamos odores quase puros (Tabela 1), o que exclui a possibilidade de generalização por baixa detecção.

Uma simples explicação para a dificuldade exibida pelas abelhas em discriminar entre isômeros pode ser que o grau de pureza das moléculas utilizadas em nosso experimento não foi alto o suficiente para evitar contaminação pelo isômero alternativo. No entanto, em todos os casos selecionamos a mais alta pureza disponível no mercado (98-99%), exceto pelos isômeros de limoneno em que a pureza foi de 96-97%. Esse é precisamente o par que pode ser discriminado após condicionamento diferencial, revelando, assim, que a potencial presença de impurezas, incluindo àqueles referentes à presença do isômero alternativo de limoneno, não

afetou a discriminação. Pode-se discutir que até impurezas menores que 1% podem ser detectadas pelas abelhas e resultar em generalização. O método de imageamento de cálcio usado no lobo antenal de moscas-das-frutas revelou que uma impureza de 0.0006% em uma amostra química era responsável por uma resposta mensurável nas células receptoras olfativas (Paoli *et al.* 2017). No entanto, uma única resposta de célula receptora não necessariamente traduz em resposta comportamental. Em experimentos em que abelhas eram treinadas a discriminar dois odores puros, por exemplo, a resposta à razão 90:10 desses odores foi muito similar àquela desencadeada por odores puros (Fernandez *et al.* 2009). Assim, uma diferença de 10% não induziu uma diferença perceptual drástica. Concluimos, então, que potenciais contaminações com o isômero alternativo, entre 1-2%, não levariam às respostas de generalização observadas em nossos testes.

Em um contexto ecológico, os polinizadores geralmente visitam de duas a cinco flores da mesma orquídea polinizada por engano antes de abandonar a inflorescência (Johnson *et al.* 2004, Jersáková & Johnson 2006, Tuomi *et al.* 2015, Aguiar & Pansarin 2019). Isso seria mais similar ao condicionamento absoluto, uma vez que o animal teria contato com o mesmo estímulo várias vezes, sem uma comparação com um estímulo diferente. Ainda, dado o custo de visitar e manipular uma flor sem recurso, uma flor de engano pode ser considerada uma experiência negativa para um polinizador (Jersáková *et al.* 2006, Gaskett 2011). Durante o condicionamento diferencial, nós aprimoramos a discriminação ao usar uma recompensa apetitiva (solução de sacarose) e uma punição (solução salina), mas uma orquídea polinizada por engano não apresenta uma substância de sabor aversivo aos seus polinizadores. Assim, o cenário natural de polinização difere do condicionamento diferencial empregado, ao não apresentar mecanismos para aprimorar a discriminação. É, então, plausível assumir que diferentes isômeros não possuem um grande papel na variabilidade perceptual da fragrância floral, já que no contexto da polinização seria difícil para uma abelha discriminar entre odores tão similares.

Responder questões de polinização utilizando uma abordagem cognitiva como a do nosso estudo permite acessar a perspectiva do polinizador em uma interação inseto-planta. Vários estudos demonstram a grande variabilidade na fragrância floral em orquídeas polinizadas por engano de alimento (Salzmann & Schiestl 2007, Salzmann *et al.* 2007a,b, Dormont *et al.* 2014) e esse polimorfismo poderia ter um importante papel no engano dos polinizadores (Heinrich 1975). No entanto, poucos estudos levam em consideração o ponto de vista do polinizador para elucidar essa questão. Aqui, fomos capazes de determinar até que ponto as abelhas são capazes de diferenciar isômeros da mesma molécula, e como esses

odores contribuem para a variabilidade perceptual das fragrâncias florais. O fato de que as abelhas têm dificuldade em discriminar entre os isômeros testados não refuta, no entanto, a hipótese de que o polimorfismo dos atributos florais poderia ter um importante papel na polinização por engano, uma vez que os isômeros são apenas parte da variabilidade da fragrância. Outras pistas sensoriais como cores e formas são altamente variáveis em orquídeas polinizadas por engano (Ackerman *et al.* 2011) e poderiam contribuir, pela sua variação, para o fenômeno do engano. Essa hipótese precisa ser testada considerando as flores pela perspectiva dos polinizadores e não pela perspectiva humana do investigador (Vorobyev *et al.* 1997, Juillet & Scopece 2010). Nosso estudo mostra que a informação que obtemos das plantas, como os perfis variáveis de fragrâncias florais, provenientes de análises de cromatografia gasosa, podem ter um significado diferente quando são levadas em conta as habilidades cognitivas dos polinizadores.

Agradecimentos

Os resultados desse capítulo foram publicados no periódico *Journal of Experimental Biology* (Aguiar *et al.* 2018). Agradeço aos demais autores desse artigo: Ana Carolina Roselino, Marlies Sazima e Martin Giurfa, pelas suas importantes contribuições. Agradecemos David Baracchi por comentários e correções extremamente úteis. Também agradecemos Maria Eugenia Villar e Paul Marchal pela ajuda com os experimentos de REP, Alexis Buatois pela suporte com as análises de dados e estatística, e Lucie Hotier pelo trabalho de apicultura durante os experimentos.

Referências

- Ackerman, J. D., Cuevas, A. A., & Hof, D. 2011. Are deception-pollinated species more variable than those offering a reward? *Plant Systematics and Evolution*, 293(1–4), 91–99. DOI: 10.1007/s00606-011-0430-6
- Aguiar, J. M. R. B. V., & Pansarin, E. R. 2019. Deceptive pollination of *Ionopsis utricularioides* (Oncidiinae: Orchidaceae). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 250, 72–78. DOI: 10.1016/j.flora.2018.11.018
- Aguiar, J. M. R. B. V., Roselino, A. C., Sazima, M., & Giurfa, M. 2018. Can honey bees discriminate between floral-fragrance isomers? *Journal of Experimental Biology*, 221, jeb180844. DOI: 10.1242/jeb.180844
- Armbruster, W. S., Keller, S., Matsuki, M., & Clausen, T. P. 1989. Pollination of *Dalechampia magnoliifolia* (Euphorbiaceae) by male euglossine bees. *American Journal*

- of Botany, 76(9), 1279–1285. DOI: 10.2307/2444554
- Avarguès-Weber, A., & Giurfa, M. 2014. Cognitive components of color vision in honey bees: How conditioning variables modulate color learning and discrimination. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 200, 449-461. DOI: 10.1007/s00359-014-0909-z
- Barth, J., Dipt, S., Pech, U., Hermann, M., Riemensperger, T., & Fiala, A. 2014. Differential associative training enhances olfactory acuity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neuroscience*, 34(5), 1819–1837. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2598-13.2014
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R. H. B., Singmann, H., Dai, B., & Eigen, C. 2017. lme4: Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–113. DOI: 10.18637/jss.v067.i01
- Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., & Schäfer, S. 1983. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(2), 107–119. DOI: 10.1037//0735-7036.97.2.107
- Bretz, F., & Westfall, T. H. P. 2011. *Multiple Comparisons Using R*. CRC Press. DOI: 10.1128/AAC.03728-14
- Carrillo, M. C., Gabrieli, J. D. E., & Disterhoft, J. F. 2000. Selective effects of division of attention on discrimination conditioning. *Psychobiology*, 28(3), 293–302. DOI: 10.3758/BF03331988
- Chittka, L., Thomson, J. D., & Waser, N. M. 1999. Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften*, 86, 361-377. DOI: 10.1007/s001140050636
- de Brito Sanchez, M. G. 2011. Taste perception in honey bees. *Chemical Senses*, 36(8), 675–92. DOI: 10.1093/chemse/bjr040
- de Brito Sanchez, M. G., Serre, M., Avarguès-Weber, A., Dyer, A. G., & Giurfa, M. 2015. Learning context modulates aversive taste strength in honey bees. *Journal of Experimental Biology*, 218(6), 949–959. DOI: 10.1242/jeb.117333
- Blažytė-Čereškienė, L. & Būda, V. 2007. Ability of honey bees to detect and recognise isomers of cresol. *Ekologija*, 53, 16-21.
- Desmedt, L., Baracchi, D., Devaud, J.-M., Giurfa, M., & d’Ettorre, P. 2017. Aversive learning of odor–heat associations in ants. *Journal of Experimental Biology*, 220(24), 4661–4668. DOI: 10.1242/jeb.161737
- Dormont, L., Delle-Vedove, R., Bessière, J. M., & Schatz, B. 2014. Floral scent emitted by white and coloured morphs in orchids. *Phytochemistry*, 100, 51–59. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.01.009

- Dudareva, N., & Pichersky, E. 2006. Biology of Floral Scent. *Biology of Floral Scent*, 199–217. DOI: 10.1201/9781420004007
- Dyer, A. G., & Chittka, L. 2004. Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. *Naturwissenschaften*, 91(5), 224–227. DOI: 10.1007/s00114-004-0508-x
- Fernandez, P. C., Locatelli, F. F., Person-Rennell, N., Deleo, G., & Smith, B. H. 2009. Associative conditioning tunes transient dynamics of early olfactory processing. *Journal of Neuroscience*, 29(33), 10191–10202. DOI: 10.1523/jneurosci.1874-09.2009
- Galizia, C. G., Kunze, J., Gumbert, A., Borg-Karlson, A. K., Sachse, S., Markl, C., & Menzel, R. 2005. Relationship of visual and olfactory signal parameters in a food-deceptive flower mimicry system. *Behavioral Ecology*, 16(1), 159–168. DOI: 10.1093/beheco/arh147
- Gaskett, A. C. 2011. Orchid pollination by sexual deception: Pollinator perspectives. *Biological Reviews*, 86(1), 33–75. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2010.00134.x
- Giurfa, M. 2004. Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften*, 91(5), 228–231. DOI: 10.1007/s00114-004-0530-z
- Giurfa, M. 2007. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: A taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 193, 801–824. DOI: 10.1007/s00359-007-0235-9
- Giurfa, M., Hammer, M., Stach, S., Stollhoff, N., Müller-Deisig, N., & Mizyrycki, C. 1999. Pattern learning by honeybees: Conditioning procedure and recognition strategy. *Animal Behaviour*, 57(2), 315–324. DOI: 10.1006/anbe.1998.0957
- Giurfa, M., & Sandoz, J.-C. 2012. Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & Memory*, 19(2), 54–66. DOI: 10.1101/lm.024711.111
- Gumbert, A., & Kunze, J. 2001. Colour similarity to rewarding model plants affects pollination in a food deceptive orchid, *Orchis boryi*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72(3), 419–433. DOI: 10.1006/bijl.2000.0510
- Hanson, H. M. 1959. Effects of discrimination training on stimulus generalization. *Journal of Experimental Psychology*, 58(5), 321–334. DOI: 10.1037/h0042606
- Heinrich, B. 1975. Bee flowers: a hypothesis on flower variety and blooming times. *Evolution*, 29(2), 325–334. DOI: 10.2307/2407220
- Jersáková, J., & Johnson, S. D. 2006. Lack of floral nectar reduces self-pollination in a fly-pollinated orchid. *Oecologia*, 147(1), 60–68. DOI: 10.1007/s00442-005-0254-6

- Jersáková, J., Johnson, S. D., & Kindlmann, P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews*, 81, 219-235. DOI: 10.1017/S1464793105006986
- Johnson, S. D., Peter, C. I., & Ågren, J. 2004. The effects of nectar addition on pollen removal and geitonogamy in the non-rewarding orchid *Anacamptis morio*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1541), 803–809. DOI: 10.1098/rspb.2003.2659
- Josens, R., Eschbach, C., & Giurfa, M. 2009. Differential conditioning and long-term olfactory memory in individual *Camponotus fellah* ants. *Journal of Experimental Biology*, 212(12), 1904–1911. DOI: 10.1242/jeb.030080
- Juillet, N., & Scopece, G. 2010. Does floral trait variability enhance reproductive success in deceptive orchids? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 12, 317-322. DOI: 10.1016/j.ppees.2010.05.001
- Jürgens, A., Dötterl, S., & Meve, U. 2006. The chemical nature of fetid floral odours in stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae). *New Phytologist*, 172(3), 452–468. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01845.x
- Kafka, W. A., Ohloff, G., Schneider, D., & Vareschi, E. 1973. Olfactory discrimination of two enantiomers of 4-methyl-hexanoic acid by the migratory locust and the honeybee. *Journal of Comparative Physiology*, 87(3), 277–284. DOI: 10.1007/BF00696047
- Kevan, P. G., & Baker, H. G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology*, 28(1), 407–453. DOI: 10.1146/annurev.en.28.010183.002203
- Kite, G. C. 1995. The floral odour of *Arum maculatum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(4), 343–354. DOI: 10.1016/0305-1978(95)00026-Q
- Knudsen, J. T., Tollsten, L., & Bergström, L. G. 1993. Floral scents-a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, 33, 253-280. DOI: 10.1016/0031-9422(93)85502-I
- Laska, M., & Galizia, C. G. 2001. Enantioselectivity of odor perception in honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Behavioral Neuroscience*, 115(3), 632–639. DOI: 10.1037//0735-7044.115.3.632
- Laska, M., Liesen, A., & Teubner, P. 1999. Enantioselectivity of odor perception in squirrel monkeys and humans. *The American Journal of Physiology*, 277(4 Pt 2), R1098–R1103.
- Lensky, Y., & Blum, M. S. 1974. Chirality in insect chemoreceptors. *Life Sciences*, 14(10), 2045–2049. DOI: 10.1016/0024-3205(74)90422-6
- Li, W., Howard, J. D., Parrish, T. B., & Gottfried, J. A. 2008. Aversive learning enhances

- perceptual and cortical discrimination of indiscriminable odor cues. *Science*, 319(5871), 1842–1845. DOI: 10.1126/science.1152837
- Linster, C., Johnson, B. A., Morse, A., Yue, E., & Leon, M. 2002. Spontaneous versus reinforced olfactory discriminations. *The Journal of Neuroscience*, 22(16), 6842–6845. DOI: 10.1523/jneurosci.22-16-06842.2002
- Locatelli, F. F., Fernandez, P. C., & Smith, B. H. 2016. Learning about natural variation of odor mixtures enhances categorization in early olfactory processing. *The Journal of Experimental Biology*, 219(17), 2752–2762. DOI: 10.1242/jeb.141465
- Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J. C., & Giurfa, M. 2012. Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: A step toward standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(1), 159–167. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.018
- Menzel, R. 1999. Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 185, 323-340. DOI: 10.1007/s003590050392
- Paoli, M., Münch, D., Haase, A., Skoulakis, E., Turin, L., & Galizia, C. G. 2017. Minute impurities contribute significantly to olfactory receptor ligand studies: tales from testing the vibration theory. *Eneuro*, 4(3), ENEURO.0070-17.2017. DOI: 10.1523/ENEURO.0070-17.2017
- Perez, M., Nowotny, T., d’Ettorre, P., & Giurfa, M. 2016. Olfactory experience shapes the evaluation of odour similarity in ants: a behavioural and computational analysis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1837), 20160551. DOI: 10.1098/rspb.2016.0551
- Raguso, R. A. 2008. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1), 549–569. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601
- Riffell, J. A., Alarcon, R., Abrell, L., Davidowitz, G., Bronstein, J. L., & Hildebrand, J. G. 2008. Behavioral consequences of innate preferences and olfactory learning in hawkmoth-flower interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9), 3404–3409. DOI: 10.1073/pnas.0709811105
- Salzmann, C. C., Cozzolino, S., & Schiestl, F. P. 2007. Floral scent in food-deceptive orchids: species specificity and sources of variability. *Plant Biology*, 9(6), 720–729. DOI: 10.1055/s-2007-965614
- Salzmann, C. C., Nardella, A. M., Cozzolino, S., & Schiestl, F. P. 2007. Variability in floral

- scent in rewarding and deceptive orchids: The signature of pollinator-imposed selection? *Annals of Botany*, 100(4), 757–765. DOI: 10.1093/aob/mcm161
- Salzmann, C. C., & Schiestl, F. P. 2007. Odour and colour polymorphism in the food-deceptive orchid *Dactylorhiza romana*. *Plant Systematics and Evolution*, 267(1–4), 37–45. DOI: 10.1007/s00606-007-0560-z
- Sandoz, J. C. 2011. Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 98. DOI: 10.3389/fnsys.2011.00098
- Suetsugu, K., & Fukushima, S. 2014. Bee pollination of the endangered orchid *Calanthe discolor* through a generalized food-deceptive system. *Plant Systematics and Evolution*, 300(3), 453–459. DOI: 10.1007/s00606-013-0894-7
- Szyszkka, P., Gerkin, R. C., Galizia, C. G., & Smith, B. H. 2014. High-speed odor transduction and pulse tracking by insect olfactory receptor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16925–16930. DOI: 10.1073/pnas.1412051111
- Tuomi, J., Lämsä, J., Wannas, L., Abeli, T., & Jäkäläniemi, A. 2015. Pollinator behaviour on a food-deceptive orchid *Calypso bulbosa* and coflowering species. *Scientific World Journal*. DOI: 10.1155/2015/482161
- Vorobyev, M., Gumbert, A., Kunze, J., Giurfa, M., & Menzel, R. 1997. Flowers through insect eyes. *Israel Journal of Plant Sciences*, 45(2–3), 93–101. DOI: 10.1080/07929978.1997.10676676
- Waser, N. M. 1986. Flower constancy: definition, cause, and measurement. *The American Naturalist*, 127(5), 593–603. DOI: 10.1086/284507
- Whitten, W. M., Williams, N. H., Armbruster, W. S., Battiste, M. A., Strekowski, L., & Lindquist, N. 1986. Carvone oxide: an example of convergent evolution in euglossine pollinated plants. *Systematic Botany*, 11(1), 222. DOI: 10.2307/2418960
- Wright, G. A., & Schiestl, F. P. 2009. The evolution of floral scent: The influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards. *Functional Ecology*, 23(5), 841–851. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2009.01627.x

Capítulo 3

O perfume da memória: a dominância olfativa na fragrância floral de orquídeas polinizadas por engano e o aprendizado dos polinizadores

Resumo

A polinização por engano de alimento, característica de muitas espécies de orquídeas, consiste em atrair os polinizadores mas não fornecer recompensa de alimento para eles. A alta variabilidade na fragrância floral dessas orquídeas pode ser importante na manutenção da polinização por engano, uma vez que poderia dificultar o aprendizado em evitar as flores sem recurso. No entanto, a presença simultânea de compostos abundantes e recorrentes na fragrância poderia atrapalhar a polinização por engano se eles servissem como pistas preditivas para a ausência de recurso. Para estudar esse problema, nós combinamos análises químicas da fragrância de *Ionopsis utricularioides*, uma orquídea polinizada por engano, com experimentos comportamentais de aprendizado olfativo e registros optofisiológicos dos circuitos olfativos no cérebro de abelhas estimuladas com compostos majoritários e minoritários da fragrância da orquídea. Encontramos que o composto majoritário da fragrância, β -ocimeno, induz sinais neurais fracos no cérebro da abelha, diferentemente dos compostos minoritários. Por consequência, ele foi ofuscado por três dos quatro compostos minoritários utilizados nos experimentos de comportamento. Esse fenômeno foi mantido mesmo quando a razão entre composto majoritário e minoritário foi de 50:1. Além disso, a generalização entre misturas diferentes, porém com a presença do composto majoritário, foi reduzida. Nossos resultados mostram que no domínio olfativo a polinização por engano pode ser mantida pois os compostos minoritários ofuscam o composto abundante, que induz fraca sinalização neural, impossibilitando seu uso como um preditor confiável de ausência de recurso. Nossa abordagem multidimensional também revela a importância de adotar uma perspectiva cognitiva do polinizador na análise de interações inseto-planta.

Palavras-chave: polinização por engano, *Ionopsis utricularioides*, abelha, *Apis mellifera*, olfato, mistura de odores, *overshadowing*

Abstract

Deceptive orchids attract pollinators but do not provide food reward. The high variability of their floral fragrance may be adaptive as it can impair avoidance learning of the absence of reward. Yet, the simultaneous presence of abundant, recurrent odorants could disrupt deceptive pollination if these odorants served as predictive cues for reward absence.

To analyze this problem, we combined chemical analyses of the deceptive orchid *Ionopsis utricularioides* fragrance with behavioral experiments on olfactory learning and optophysiological recordings of olfactory circuits in the brain of bees stimulated with major and minor components of the orchid blend. We found that the major and recurrent component of the orchid's fragrance, β -ocimene, induced weak neural signals in the bee brain, contrary to other minor components. In consequence, it was overshadowed by three of four minor components assayed in mixture-learning experiment. Moreover, generalization across different, yet overlapping, mixtures was reduced. Our results show that in the olfactory domain deceptive pollination is maintained because minor odorants overshadow the abundant odorant, which induces weak neural signals that hinder its use as a reliable predictor of reward absence. Our multidimensional approach also underlines the importance of adopting a pollinators' cognitive perspective in the analysis of insect-plant interactions.

Keywords: deceptive pollination, *Ionopsis utricularioides*, honey bee, *Apis mellifera*, olfaction, odour mixtures, overshadowing.

Introdução

Cerca de um terço das espécies de orquídeas não apresentam recursos aos seus visitantes florais sendo, assim, polinizadas por engano, utilizando diferentes estratégias (Ackerman 1986, Jersáková *et al.* 2006). O mecanismo de engano mais comum é o chamado engano generalizado de alimento, em que as flores apresentam múltiplos sinais sensoriais que exploram as preferências dos polinizadores, atraindo o maior número possível de visitantes florais (Johnson & Schiestl 2016). Nessas orquídeas, geralmente os atributos florais apresentam grande variabilidade intraespecífica, em diferentes domínios sensoriais (e.g. visual, olfativo) (Nicolas Juillet & Scopece 2010). Foi sugerido que essa variabilidade seria um elemento chave na polinização por engano, pois perturbaria o aprendizado dos polinizadores em evitar as flores, que são capazes de aprender a associar uma pista confiável com a ausência de recurso floral (Heinrich 1975, Johnson & Schiestl 2016). Desta forma, pistas sensoriais variáveis promoveriam mais visitas às flores sem recurso e, assim, assegurariam a sua polinização.

A variação na fragrância em orquídeas polinizadas por engano apresenta um interessante dilema para essa hipótese. Por um lado a fragrância dessas espécies pode ser altamente variável (Salzmann & Schiestl 2007, Salzmann *et al.* 2007), o que suporta a ideia de que a variabilidade poderia perturbar o aprendizado em evitar as flores. Por outro lado, elas podem incluir compostos que são particularmente abundantes (Salzmann & Schiestl 2007,

Wróblewska *et al.* 2019) e que poderiam atuar como pistas preditivas para a ausência de recursos. Os polinizadores poderiam superar a variabilidade da fragrância usando esses compostos e, dessa maneira, aprender a evitar as flores sem recurso. Então, como pode a polinização por engano ser compatível com a presença de compostos abundantes que poderiam facilitar o aprendizado em evitar as flores? Uma forma de abordar esse problema é estudar a dominância dos odores entre os componentes de uma mistura, usando a análise cognitiva de *overshadowing* (Tennant & Bitterman 1975, Cook & Mineka 1987, Derby *et al.* 1996, Brembs & Heisenberg 2001, Leising *et al.* 2011, Prados 2011, Kosaki *et al.* 2013, Schubert *et al.* 2015). Essa estratégia fornece uma perspectiva do polinizador nos mecanismos olfativos fundamentais ao sucesso das orquídeas polinizadas por engano.

O *overshadowing* (do inglês, ofuscamento) olfativo é um fenômeno perceptual e psicológico que consiste em 1) aprender melhor um composto (o estímulo ofuscante ou dominante) às custas de outro (o estímulo ofuscado ou dominado) em uma mistura binária e 2) responder menos ao estímulo dominado após o aprendizado da mistura em comparação à quando ele é aprendido individualmente (Kamin 1968). No caso das orquídeas polinizadas por engano, é possível questionar se o sucesso desse mecanismo de polinização conta, em termos olfativos, com o fato de que compostos minoritários e variáveis da fragrância ofuscam compostos abundantes e menos variáveis, permitindo a manutenção desse mecanismo de polinização.

Análises do processamento olfativo pelos insetos podem contribuir para responder essa questão. No caso dos insetos polinizadores, essas análises foram particularmente desenvolvidas para a abelha *Apis mellifera*. Essa abelha é um modelo padrão para análises comportamentais do aprendizado olfativo (Menzel 1999, Giurfa 2007, Giurfa & Sandoz 2012), incluindo o fenômeno do *overshadowing* (Schubert *et al.* 2015). Além disso, métodos optofisiológicos para registrar atividade neural em áreas-chave dos circuitos olfativos durante estimulações com odores estão disponíveis para esses insetos (Sandoz 2011, Giurfa & Sandoz 2012). Análises por imageamento de cálcio mostram que nos lobos antenais, a região olfativa primária do cérebro das abelhas, odores são codificados como padrões espaciais de atividade específicos localizados nas subunidades, denominadas glomérulos (Joerges *et al.* 1997, Sandoz 2011, Giurfa & Sandoz 2012). Dessa maneira, é possível analisar como compostos majoritários e minoritários da fragrância das orquídeas são percebidos e aprendidos pelas abelhas, caracterizando ao mesmo tempo os fundamentos neurais dessas performances comportamentais.

Nós utilizamos essa estratégia para estudar o caso da interação entre *Ionopsis utricularioides*, uma orquídea polinizada por engano, cuja variação na fragrância inclui compostos majoritários e minoritários, e a abelha *Apis mellifera*, que é um dos visitantes florais da espécie (Aguiar & Pansarin 2019). Nós caracterizamos as interações entre os compostos majoritários e minoritários da fragrância dessa orquídea e as suas consequências no aprendizado e percepção olfativa das abelhas. Para isso, nós combinamos análises químicas da fragrância da orquídea com experimentos comportamentais e registros optofisiológicos dos lobos antenais de abelhas estimuladas com compostos majoritários e minoritários da fragrância de *I. utricularioides*. Nossos resultados revelam que compostos minoritários são mais variáveis e ofuscam o composto mais abundante e recorrente da fragrância variável da orquídea, diminuindo sua relevância perceptual. Esse efeito foi mantido mesmo quando a razão entre composto majoritário e minoritário foi de 50:1. As análises neurais mostraram que apesar da sua abundância, o composto majoritário da fragrância da orquídea induz sinais neurais fracos e é dominado por alguns dos compostos minoritários. Dessa maneira, fornecemos uma explicação mecanicista da polinização por engano baseada em análises olfativas que integram dimensões ecológicas, comportamentais e neurais. Nossos resultados mostram que no domínio olfativo, orquídeas sem recurso tem sucesso em enganar os polinizadores pois os compostos abundantes induzem sinais neurais fracos e são ofuscados pelos compostos minoritários e mais variáveis, o que impede a possibilidade de aprender tais compostos como pistas preditivas de ausência de recurso.

Material e métodos

Análise da fragrância floral

Indivíduos de *Ionopsis utricularioides* foram coletados de uma população na cidade de Serra Azul, São Paulo, Brasil. Eles foram mantidos individualmente em vasos de cerâmica, sob tela de sombreamento 50% e regados todos os dias durante um ano antes das análises da fragrância. Para caracterizar o perfil de fragrância floral de cada indivíduo ($N=25$) as inflorescências foram ensacadas individualmente em sacos de poliéster (PET; 27 cm x 41 cm). A extremidade superior direita do saco foi conectada ao sistema de coleta de voláteis (ARS, Gainesville, FL, EUA), conectado a filtros de carvão, umidificadores e fluxômetros, que bombeavam ar filtrado e umidificado por mangueiras de PTFE (poly-tetrafluoretileno) para dentro do saco selado, a 1.0 l min^{-1} . A extremidade superior esquerda do saco foi acoplada a uma bomba à vácuo conectada a filtros com o polímero adsorvente Haysep® (30 mg, 80/100 mesh, Alltech Assoc.) que puxavam o ar do sistema a uma taxa de 1.0 l min^{-1} . A

coleta de voláteis foi conduzida durante o dia, das 10:00 às 16:00 h, que coincide com o período de atividade de forreamento dos polinizadores (Aguiar & Pansarin 2019). Em seguida, os filtros de polímero foram lavados com 150 μl de diclorometano e os extratos resultantes foram armazenados em tubos de vidro selados, mantidos em um freezer a -30°C até a análise. Nós adicionamos 2 μL de uma solução 10 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ de acetato de nonila como um padrão interno para cada amostra. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo Shimadzu 2010 (CG) equipado com um detector por ionização por chama (DIC) usando uma coluna HP-1MS (30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μm espessura do filme; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Dois microlitros de cada amostra foram injetadas em um injetor *splitless*, com hélio como gás de carreamento. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C por 5 minutos, e depois acrescida de 5°C por minuto até atingir 150°C e após acrescida de 20°C por minuto até atingir 250°C . Cada composto foi quantificado comparando a sua área de pico relativo a do acetato de nonila no CG-DIC. Para caracterizar os compostos, as amostras foram injetadas em um cromatógrafo Shimadzu QP 2010 Ultra, acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo (CG-EM Quadrupolo), adotando as mesmas configurações utilizadas para o CG-DIC. Os compostos foram identificados calculando o índice de Kovats, assim como comparando as suas espectrometrias de massa com a biblioteca NIST 08 Mass Spectral Library (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, EUA) e, quando disponível, àquelas de padrões sintéticos.

Abelhas

Indivíduos de *Apis mellifera* foram obtidos no apiário do *Centre de Recherches sur la Cognition Animale* localizado no campus da *Université Paul Sabatier*, Toulouse, França. Operárias forrageadoras foram coletadas ao pousarem em um alimentador contendo solução de sacarose 50% (m/m), antes que começassem a se alimentar, para manter a motivação apetitiva dos animais. As abelhas foram inseridas em tubos de vidro que foram imersos em gelo por cinco minutos para reduzir as suas atividades, depois posicionadas e imobilizadas individualmente em tubos de plástico e alimentadas com 5 μl de solução de sacarose 50% (m/m). Os testes tiveram início 3 h após a imobilização das abelhas. Esse período é padrão para manter as abelhas com fome e assegurar alta motivação apetitiva para o condicionamento (Matsumoto *et al.* 2012). Durante esse intervalo, as abelhas foram mantidas em uma estufa escura e úmida, seguindo o protocolo padrão de condicionamento REP (Matsumoto *et al.* 2012).

Estímulos

De acordo com as análises de fragrância floral, nós escolhemos cinco odores que categorizamos como majoritário (presente na maioria dos indivíduos da orquídea e em altas quantidades; β -ocimeno) ou minoritários (presentes esporadicamente nos indivíduos e/ou em baixas quantidades; fenilacetaldéido, decanal, β -mirceno e R-limoneno) (veja a Tabela 2 na sessão Resultados). β -ocimeno é o composto majoritário na maior parte dos indivíduos e disponível em maiores quantidades em comparação aos outros componentes da fragrância. Fenilacetaldéido, decanal, β -mirceno e R-limoneno são altamente variáveis em termos de presença e quantidade entre indivíduos. Todos os cinco odores foram obtidos da Sigma Aldrich (Deisenhofen, Alemanha) e tiveram suas pressões de vapor padronizadas (Tabela 1) pelas suas diluições em óleo mineral.

Tabela 1. Características dos odores utilizados. São fornecidos dados de pureza (descrição comercial do produto), valores de pressão de vapor e diluição em óleo mineral.

Odor	Pureza (%)	Pressão de vapor (mm Hg; 25°C)	Diluição (in 1 ml) odor/óleo mineral (μ l)
β -ocimeno	90.0	1.56	6.4/993.6
Fenilacetaldéido	95.0	0.37	27.2/972.8
Decanal	98.0	0.10	97.1/902.9
β -mirceno	95.0	2.09	4.8/995.2
R-limoneno	97.0	1.98	5.0/995.0

Condicionamento olfativo

As abelhas imobilizadas foram condicionadas seguindo o protocolo de condicionamento olfativo da resposta de extensão da probóscide (REP), em que elas aprendem a associar odores como estímulos condicionados (EC) com uma recompensa de solução de sacarose, o estímulo não condicionado (ENC). As abelhas que aprendem a associação estendem suas probóscides na presença do odor, prevendo a recompensa de alimento (Bitterman *et al.* 1983, Giurfa & Sandoz 2012).

Antes do condicionamento, as abelhas foram testadas para a REP não condicionada, apresentando solução de sacarose 50% (m/m) às suas antenas (o que induz REP). Abelhas que não demonstraram REP à sacarose nesta fase inicial ou durante os experimentos foram excluídas.

Os odores foram mantidos em tubos de vidro e expostos às antenas das abelhas por um

equipamento de liberação de odores, controlado por um microcomputador (Arduino® Uno, Tilburg, North Brabant, Holanda) (Szyszka *et al.* 2014). A abelha imobilizada foi posicionada em frente ao equipamento, que emitia um fluxo contínuo de ar limpo para as suas antenas durante todo o processo. O fluxo de ar podia ser direcionado para os tubos de vidro contendo os odores, para fornecer o EC. Um exaustor de ar foi posicionado atrás da abelha para prevenir a acumulação de odores.

Cada repetição de condicionamento durou 1 minuto e começou com o posicionamento da abelha em frente ao equipamento por 26 s. Após esse período o EC era fornecido por 4 s. O ENC de sacarose era fornecido à antena e probóscide da abelha 3 s após o EC e durante 3 s. Portanto o intervalo entre estímulos foi de 3 s. Após a estimulação EC-ENC, a abelha foi mantida na instalação por mais 28 s e depois substituída pela próxima abelha a ser condicionada.

As abelhas foram treinadas seguindo um regime de condicionamento absoluto, com um único EC (odor individual ou mistura binária de odores) pareado com a recompensa de sacarose. Três repetições de condicionamento, espaçadas em 10 minutos, foram realizadas, uma vez que isso assegura alta aquisição e retenção (Menzel 1999, Giurfa 2007, Giurfa & Sandoz 2012).

Experimentos comportamentais

Experimento 1: O composto majoritário tem dominância sobre os minoritários quando apresentados em uma mistura?

Nós estudamos *overshadowing* entre o composto majoritário β -ocimeno e os minoritários fenilacetaldéido, decanal, β -mirceno e R-limoneno, usando misturas binárias 1:1 (AB), em que A sempre era β -ocimeno e B um dos compostos minoritários. Apesar da concentração ser a mesma entre compostos nesse experimento, escolhemos continuar com o uso dos termos majoritário e minoritário, relativos ao perfil de fragrância natural da orquídea. Três grupos de abelhas foram condicionados em paralelo: dois grupos controle foram treinados com os respectivos odores A ou B como EC e um grupo experimental (grupo *overshadowing*) foi treinado com a mistura AB como EC. Uma hora após o condicionamento, todos os grupos foram testados com A, B e AB, apresentados em uma sequência pseudoaleatória, sempre na ausência de sacarose, espaçada em 10 minutos entre apresentações. Dessa forma, buscamos determinar se o componente majoritário A ofusca o componente minoritário B em cada mistura binária. Se esse fosse o caso, as respostas a A deveriam ser significativamente maiores que a B após o treinamento com a mistura, e as

respostas a B após o treinamento com a mistura deveriam ser menores que após treinamento com B.

Experimento 2: Aumentar a concentração do composto dominado reverte o fenômeno de overshadowing?

Nesse experimento, seguimos os mesmos procedimentos do Experimento 1, tanto na fase de condicionamento quanto na fase de testes, mas agora usando uma mistura 50:1 de β -ocimeno (composto majoritário) e β -mirceno (composto minoritário). Esse par foi escolhido pois na média, a razão entre eles é 50:1 na fragrância dos indivíduos analisados (veja Tabela 2 na sessão Resultados).

Experimento 3: A presença do composto majoritário promove generalização entre misturas?

Nesse experimento, seguimos o mesmo método de condicionamento dos experimentos anteriores usando uma mistura 1:1 de β -ocimeno e fenilacetaldéido (AB) ou decanal (AC) como EC durante o condicionamento. Escolhemos esses dois odores minoritários nos baseando nos resultados do Experimento 1, que revelou que ambos apresentavam dominância sobre β -ocimeno quando apresentados na mistura binária (veja na sessão de Resultados). Uma hora após o condicionamento, testamos a REP à ambas as misturas AB e AC de forma pseudoaleatória para determinar se a presença comum de β -ocimeno (A) induz generalização entre elas.

Imageamento de cálcio

Nós realizamos imageamento de cálcio *in vivo* do lobo antenal. O lobo antenal é composto por cerca de 160 glomérulos, que são locais de interação sináptica entre neurônios de recepção olfativa vindos da antena, interneurônios locais que conectam os glomérulos lateralmente, e neurônios de projeção que levam a mensagem processada pelo lobo antenal para centros de ordem superior no cérebro das abelhas, como os corpos cogumelares (Sandoz 2011). Para os registros, injetamos o corante de cálcio Fura-2 dextrano nos neurônios de projeção do trato lateral. Esse método registra as propriedades de codificação de odores dos neurônios de projeção, visualizados ao nível dos dendritos no lobo antenal, produzindo mapas de atividade neural. As abelhas foram estimuladas da mesma forma como nos experimentos comportamentais, com os mesmo cinco compostos e as quatro misturas contendo o composto majoritário β -ocimeno, e com um controle de ar (sopro de ar puro). Os compostos foram usados nas mesmas concentrações que nos experimentos comportamentais.

Nós calculamos as distâncias Euclidianas, uma medida de dissimilaridade, entre os mapas de atividade de todos os estímulos ($N=45$ pares de estímulos) em cada animal ($N=11$), e fizemos uma média entre todos os animais. A matriz de distâncias obtidas foi usada para uma análise multidimensional de dimensionamento (análise de proximidade) para revelar as dimensões principais explicando as relações de similaridade entre mapas de resposta aos odores. Uma análise de agrupamento foi realizada para agrupar os odores de acordo com a matriz de distâncias Euclidianas. No entanto, as dimensões exibidas pelas análises anteriores são projeções de um espaço multidimensional, de forma que as distâncias entre estímulos nesse plano não são as distâncias reais (nesse plano, a representação da variância geral é maximizada, e não as distâncias individuais). Para revelar as relações precisas entre mapas neurais, nós representamos diretamente as distâncias Euclidianas, obtidas a partir dos pixels das imagens, entre as representações de cada mistura binária e seus dois compostos. Construímos, então, triângulos com tais distâncias reais, onde os vértices representam os dois compostos e a sua mistura binária (Deisig *et al.* 2006, 2010).

Análise de dados e estatística

Durante os testes e repetições de condicionamento, a REP foi registrada como uma resposta binomial (0 para ausência de REP e 1 para a sua ocorrência). Calculamos e representamos a proporção de abelhas apresentando REP aos odores condicionados (i.e. respostas condicionadas) em todos os condicionamentos e testes. A proporção de abelhas que escolheram o EC durante o condicionamento foi analisada por um modelo linear generalizado misto (GLMM) para a família binomial em que “Repetição” foi considerada como fator contínuo (efeito da repetição) e “Identidade Individual” (Abelha) e “Data” (réplica) como efeitos aleatórios (efeito individual). Comparações entre respostas durante os testes foram realizadas usando teste χ^2 ou teste χ^2 de McNemar, assim como em (Schubert *et al.* 2015). O valor de alfa foi corrigido para 0.025 ao invés de 0.05 quando os mesmos dados eram usados em duas análises. Para o imageamento de cálcio, foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas e teste de múltiplas comparações Holm-Sidak corrigido, para avaliar a significância entre as diferenças entre intensidade dos sinais neurais. O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar a significância das distâncias entre os vértices dos triângulos.

Resultados

Análise da fragrância floral revela a presença de compostos majoritários e minoritários

Dezoito compostos voláteis diferentes foram encontrados nas flores de *Ionopsis*

utricularioides (Tabela 2). O composto majoritário foi β -ocimeno, presente em 76% dos indivíduos com uma emissão média de 52.6 ± 13.7 ng/ μ l (média \pm E.P.). Esse composto ilustra bem o dilema olfativo da polinização por engano: devido à sua abundância, ele poderia atuar como pista preditiva para a ausência de recurso em *I. utricularioides*, atrapalhando a polinização por engano. Nós escolhemos outros quatro compostos, que foram caracterizados como minoritários em relação à β -ocimeno quanto à emissão e/ou frequência: fenilacetaldeído está presente em 64% dos indivíduos, com uma emissão média de 17.6 ± 7.5 ng/ μ l, Decanal em 40% dos indivíduos, com uma emissão média de 5.4 ± 2.3 ng/ μ l, β -mirceno em 68% dos indivíduos, com uma emissão média de 0.9 ± 0.2 ng/ μ l e R-limoneno em 72% dos indivíduos, com uma emissão média de 4.1 ± 2.1 ng/ μ l.

Experimento 1: O composto majoritário tem dominância sobre os minoritários quando apresentados em uma mistura?

Nós estudamos o fenômeno de *overshadowing* em quatro misturas binárias contendo β -ocimeno e um dos compostos minoritários. Para cada mistura, três grupos foram treinados ou com a mistura (AB) ou com um dos odores individualmente (A ou B). Em todos os casos, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ao longo do condicionamento (GLMM; β -ocimeno - fenilacetaldeído: $gl=2$, $\chi^2=1.38$, $P=0.50$, $N=101$; β -ocimeno – decanal: $gl=2$, $\chi^2=4.01$, $P=0.13$, $N=93$; β -ocimeno – β -mirceno: $gl=2$, $\chi^2=0.54$, $P=0.76$, $N=94$; β -ocimeno – R-limoneno: $gl=2$, $\chi^2=0.38$, $P=0.82$, $N=97$). De maneira similar, a interação entre Repetição e identidade do EC não foi significativa em todas as misturas (β -ocimeno - fenilacetaldeído: $gl=4$, $\chi^2=0.95$, $P=0.91$, $N=101$; β -ocimeno – decanal: $gl=4$, $\chi^2=0.09$, $P=0.99$, $N=93$; β -ocimeno – β -mirceno: $gl=4$, $\chi^2=0.08$, $P=0.99$, $N=94$; β -ocimeno – R-limoneno: $gl=4$, $\chi^2=0$, $P=1$, $N=97$). As abelhas aprenderam eficientemente a associação entre EC e recompensa de sacarose (Fig. 1, quadros à esquerda), de forma que foi encontrado um efeito de repetição significativo em todos os casos (β -ocimeno - fenilacetaldeído: $gl=2$, $\chi^2=54.94$, $P<0.001$, $N=101$; β -ocimeno – decanal: $gl=2$, $\chi^2=61.56$, $P<0.001$, $N=93$; β -ocimeno – β -mirceno: $gl=2$, $\chi^2=29.86$, $P<0.001$, $N=94$; β -ocimeno – R-limoneno: $gl=2$, $\chi^2=42.93$, $P<0.001$, $N=97$).

A análise das respostas dos testes revelou que, apesar de ser o composto majoritário, β -ocimeno é ofuscado na mistura por três dos quatro compostos minoritários: fenilacetaldeído, decanal e β -mirceno (Fig. 1A-C, quadros à direita). Nesses casos os dois critérios para que ocorra *overshadowing* foram confirmados: a resposta ao β -ocimeno (A) foi significativamente menor ($P<0.001$ em todos os casos) que aquela ao componente minoritário

(B) após o treinamento com a mistura AB (Fig. 1A-C, últimas três barras de cada quadro; compare barras azuis *versus* vermelhas) e também significativamente menor ($P < 0.001$ em todos os casos) que àquela observada após o treinamento de β -ocimeno individualmente (Fig. 1A-C, compare a 1ª e a 3ª barra azul de cada quadro) (veja a Tabela 3 para detalhes). No caso da mistura de β -ocimeno e R-limoneno, não foi observado *overshadowing* (Fig. 1D, últimas três barras, compare barras azul *versus* vermelha). Desta forma, em três das quatro misturas, os compostos minoritários e variáveis da fragrância da orquídea ofuscaram o composto majoritário β -ocimeno. Note, no entanto, que os compostos foram apresentados em proporções equilibradas (1:1), o que poderia ter amplificado a capacidade de *overshadowing* dos compostos minoritários. Esse resultado é mantido mesmo quando a proporção dos componentes é desequilibrada, favorecendo β -ocimeno?

Tabela 2. Compostos voláteis detectados na fragrância floral de *Ionopsis utricularioides*. Os odores utilizados para os experimentos de condicionamento olfativo estão destacados. Em azul, o composto majoritário β -ocimeno. Em vermelho, os compostos minoritários: fenilacetaldéido, decanal, β -mirceno e R-limoneno. Note que todos os compostos são variáveis em presença e quantidade de um indivíduo para o outro.

Compostos da fragrância	Emissão padronizada (ng/ μ l) para o número médio de flores for (N=20 flores)																									
	Indivíduos de <i>Ionopsis utricularioides</i>																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Média \pm EP
3-hexen-1-ol acetato	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.4	0.5	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1 \pm 0.1
Ácido acético fenetil éster	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	3.4	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	2.7	0.0	0.0	0.0	0.3 \pm 0.1
α -copeno	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	2.5	1.5	2.5	0.0	2.7	0.0	0.0	0.6	0.5	0.0	0.0	0.3	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5 \pm 0.1
Fenilacetaldéido	0.0	0.0	1.1	0.0	78.0	71.2	0.0	170.7	13.3	4.4	15.6	0.2	21.9	0.5	0.9	26.5	1.2	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	32.8	0.0	0.4	17.6 \pm 7.5
β -mirceno	0.0	0.0	0.3	2.7	0.7	0.0	4.4	1.1	0.0	5.0	0.0	0.5	0.4	1.2	1.0	0.3	0.7	3.3	0.2	0.7	0.0	0.1	1.1	0.0	1.0	0.9 \pm 0.2
β -pineno	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	22.8	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.3	3.3	8.9	0.0	0.7	0.0	1.3	1.8	0.4	0.4	1.7 \pm 0.9
β -linalol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	6.4	1.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4 \pm 0.2
β -ocimeno	20	0	182.4	9.7	8.7	0	1.1	0	51.5	3.8	69.4	32.1	57.2	0.5	229	58.4	114.9	236.6	59.1	27.7	0	75.7	25.9	0	92	52.6 \pm 13.7
Álcool cinâmico	0.0	0.0	0.7	0.0	2.0	0.0	0.0	0.5	0.0	18.4	0.0	0.5	3.0	0.0	0.8	0.0	0.8	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1 \pm 0.7
R-limoneno	0.0	8.7	2.3	8.0	2.9	0.0	0.0	0.0	0.9	56.1	6.1	0.0	0.3	0.2	1.3	0.3	0.7	1.5	0.9	4.3	2.4	5.7	0.0	0.0	1.1	4.1 \pm 2.1
Decanal	0.0	3.3	25.5	15.7	53.8	0.0	0.0	0.6	6.1	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.9	6.2	5.1	0.0	0.0	0.0	5.4 \pm 2.3
Indol	0.0	0.0	0.0	0.0	12.4	0.0	0.0	0.4	0.5	0.0	0.0	0.0	19.0	0.0	0.0	36.6	0.0	0.0	6.7	3.5	0.0	22.5	11.9	0.0	0.0	4.5 \pm 1.8
Metil salicilato	5.5	3.4	1.8	2.5	2.0	1.7	0.0	0.0	0.3	94.3	8.2	0.6	0.7	0.6	0.6	0.0	1.3	11.0	0.6	5.6	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	5.9 \pm 3.6
Tetradecano	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	47.0	0.0	0.9	13.1	0.0	0.3	0.4	0.4	6.4	2.5	1.1	0.0	15.5	0.0	0.0	0.0	3.5 \pm 1.9
β -cariofileno	0.0	0.0	0.9	0.0	4.1	0.0	0.0	20.0	1.4	0.0	12.0	1.1	1.2	0.4	1.2	1.8	2.9	7.3	0.0	2.1	4.3	5.6	3.3	0.0	3.2	2.9 \pm 0.8
cis- β -farneseno	0.0	0.0	1.0	0.0	0.3	0.0	26.0	0.0	0.0	2.6	0.0	0.4	0.8	0.1	0.6	0.2	2.3	2.7	0.0	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5 \pm 1.0
Tiglato de benzila	0.0	4.3	14.9	5.2	39.6	1.5	26.0	28.5	4.1	25.7	1.6	6.0	6.0	0.0	16.4	0.5	2.3	22.3	0.0	9.4	2.2	1.8	17.6	0.0	34.1	10.8 \pm 2.3
cis- α -farneseno	0.0	0.0	1.6	0.0	1.8	0.9	0.0	1.4	0.7	0.0	3.2	0.6	5.8	0.0	1.3	1.1	1.5	2.0	0.0	7.6	24.9	37.8	0.0	0.0	0.0	3.6 \pm 1.7

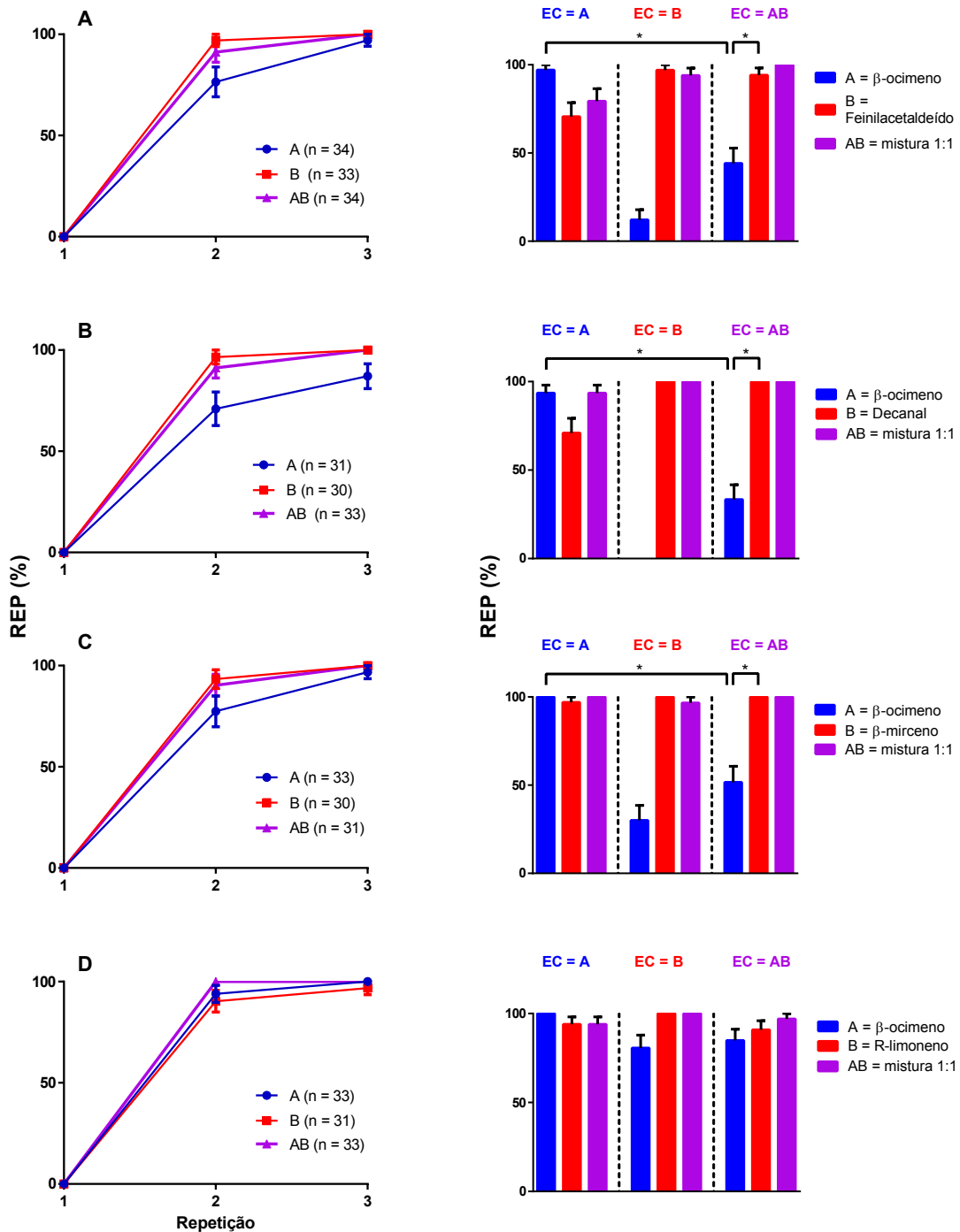


Fig. 1. Experimento 1: *overshadowing* em misturas 1:1. Os quadros à esquerda mostram as curvas de aquisição para os três subgrupos de cada par de odores (A e B) e suas misturas (AB) durante condicionamento absoluto. Os quadros à direita mostram as performances de retenção e generalização de cada subgrupo testados uma hora após o condicionamento. As abelhas foram treinadas a associar β -ocimeno (A, barras azuis), fenilacetaldéido, decanal, β -mirceno ou R-limoneno (B, barras vermelhas) ou a mistura 1:1 deles (AB, barras roxas) como estímulo condicionado (EC) com solução de sacarose durante 3 repetições de condicionamento. Nos três primeiros casos, β -ocimeno foi ofuscado pelo outro odor, uma vez que a REP para A é menor que a para B quando AB era o EC (χ^2 de McNemar, $P < 0.05$) e também menor que a resposta à A quando A era o EC (χ^2 , $P < 0.025$). No último caso (R-limoneno) não foram encontradas diferenças, indicando que β -ocimeno não é ofuscado por esse odor. As barras de erro representam o erro padrão da média.

Tabela 3. Experimento 1: análise estatística. (A) Resultados dos testes uma hora após condicionamento para todos os grupos. Células vermelhas indicam os casos onde foi encontrado efeito de *overshadowing* significativo no grupo AB, i.e. quando a resposta a um elemento após o treinamento com a mistura foi significativamente maior que ao outro. Escrito em azul são os casos com diferenças significantes entre repostas ao elemento ofuscado no grupo AB e quando treinado sozinho (grupos controle A ou B). (B) Valores estatísticos para todos os grupos, de acordo com a análise empregada: χ^2 de McNemar para efeito de *overshadowing* (vermelho; $gl=1$; $\alpha=0.05$) e teste χ^2 para respostas ao estímulo ofuscado (azul; $gl=1$; $\alpha=0.025$). Casos significantes estão sinalizados com as respectivas cores.

A) Experimento 1: Resultados dos testes:

■ Efeito de *overshadowing*

Diferenças nas repostas ao estímulo ofuscado

Estímulo condicionado (EC)	Teste (%REP ao EC)		
	A	B	AB
β -ocimeno (A)	97.06	70.59	79.41
Fenilacetaldéido (B)	12.12	96.97	93.94
β -ocimeno/fenilacetaldéido (AB)	44.12	94.12	100.00
β -ocimeno (A)	93.55	70.97	93.55
Decanal (B)	0	100.00	100.00
β -ocimeno/decanal (AB)	33.33	100.00	100.00
β -ocimeno (A)	100.00	96.97	100.00
β -mirceno (B)	30.00	100.00	96.67
β -ocimeno/ β -mirceno (AB)	51.61	100.00	100.00
β -ocimeno (A)	100.00	93.94	93.94
R-limoneno (B)	80.65	100.00	100.00
β -ocimeno/R-limoneno (AB)	84.85	90.91	96.97

B) Experimento 1: Análise estatística

Par de odores	Efeito de <i>overshadowing</i> ($\chi^2_{(1;0.05)}$ de McNemar)		Diferenças nas repostas ao estímulo ofuscado ($\chi^2_{(1;0.025)}$)	
	χ^2	P	χ^2	P
β -ocimeno – Fenilacetaldéido	15.05	< 0.001	20.471	< 0.001
β -ocimeno - Decanal	20.04	< 0.001	22.22	< 0.001
β -ocimeno - β -mirceno	13.06	< 0.001	18.24	< 0.001
β -ocimeno - R-limoneno	0.25	0.61	2.98	0.084

Experimento 2: Aumentar a concentração do composto dominado não reverte o fenômeno

de overshadowing

Nesse experimento nós focamos o estudo do fenômeno de *overshadowing* no caso da mistura de β -ocimeno e β -mirceno, onde as diferenças entre as proporções desses compostos é a maior na fragrância natural da orquídea (razão de 50:1). No experimento anterior, β -mirceno ofuscou β -ocimeno quando a razão entre esses odores foi de 1:1. Aqui nós perguntamos se aumentar a concentração de β -ocimeno reverte o *overshadowing* encontrado anteriormente, usando uma mistura de razão 50:1, semelhante à encontrada em condições naturais.

A Fig. 2 (quadros à esquerda) mostra que todos os três grupos (A, B, AB) aprenderam eficientemente a responder ao EC. Não encontramos diferenças significativas entre grupos durante o condicionamento (efeito do grupo; $gl=2$, $\chi^2=0.45$, $P=0.79$, $n=90$) e apenas o efeito da repetição foi significativo ($gl=2$, $\chi^2=51.61$, $P<0.001$, $N=90$). A interação entre repetição e identidade do EC não foi significativa ($gl=4$, $\chi^2=0$, $P=1$, $N=90$), revelando que os três grupos aprenderam seu EC de forma semelhante.

As respostas durante os testes revelaram que mesmo após aumentar em 50 vezes a quantidade de β -ocimeno em relação ao β -mirceno, o *overshadowing* não foi revertido (Fig. 2, quadro à direita). A resposta ao β -ocimeno (A) foi significativamente menor ($P<0.001$) que àquela ao β -mirceno (B) após o treinamento com a mistura AB (Fig. 2, três últimas barras; compare barras azul *versus* vermelha) e também significativamente menor ($P<0.001$) que àquela em que β -ocimeno foi treinado individualmente (Fig. 2, compare a 1ª e a 3ª barra azul) (veja a Tabela 4 para detalhes).

Dessa forma, o *overshadowing* é mantido mesmo quando o composto majoritário e o minoritário diferem em 50 vezes, o que corresponde a proporção natural desses odores na fragrância da orquídea. Então, β -ocimeno foi, na verdade, perceptivamente irrelevante para as abelhas, apesar da sua abundância na fragrância de *I. utricularioides*.

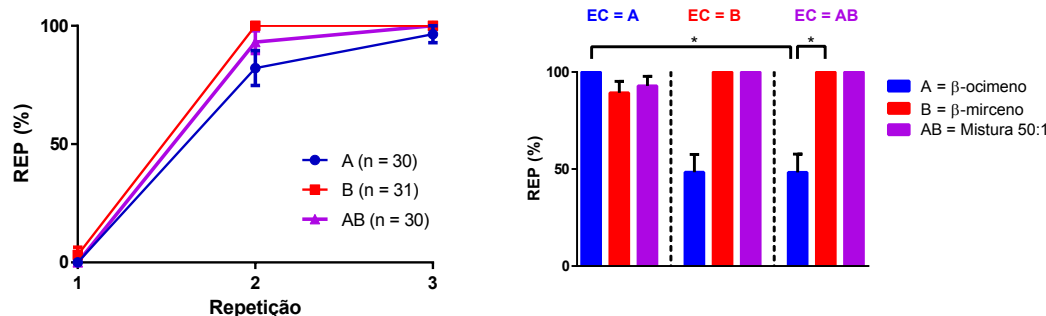


Fig. 2. Experimento 2: overshadowing em mistura 50:1. O quadro à esquerda mostra as curvas de aquisição para os três subgrupos de cada odor (A e B) e sua mistura (AB) durante condicionamento absoluto. O quadro à direita mostra as performances de retenção e generalização de cada subgrupo testados uma hora após o condicionamento. As abelhas foram treinadas a associar β -ocimeno (A, barras azuis), β -mirceno (B, barras vermelhas) ou a mistura 50:1 deles (AB, barras roxas) como estímulo condicionado (EC) com solução de sacarose durante 3 repetições de condicionamento. β -ocimeno foi ofuscado por β -mirceno, mesmo em uma concentração maior, uma vez que a REP para A é menor que a para B quando AB era o EC (χ^2 de McNemar, $P < 0.05$) e também menor que a resposta à A quando A era o EC (χ^2 , $P < 0.025$). As barras de erro representam o erro padrão da média.

Tabela 4. Experimento 2: análise estatística. (A) Resultados dos testes uma hora após condicionamento. Células vermelhas indicam efeito de *overshadowing* significativo no grupo AB, i.e. quando a resposta a um elemento após o treinamento com a mistura foi significativamente maior que ao outro. Escrito em azul, a diferença significativa entre repostas ao elemento ofuscado no grupo AB e quando treinado sozinho (grupos controle A ou B). (B) Valores estatísticos, de acordo com a análise empregada: χ^2 de McNemar para efeito de *overshadowing* (vermelho; $gl=1$; $\alpha=0.05$) e teste χ^2 para respostas ao estímulo ofuscado (azul; $gl=1$; $\alpha=0.025$). Casos significantes estão sinalizados com as respectivas cores.

A) Experimento 2: Resultados dos testes:

■ Efeito de *overshadowing*

Diferenças nas respostas ao estímulo ofuscado

Estímulo condicionado (EC)	Teste (%REP ao EC)		
	A	B	AB
β -ocimeno (A)	100.00	89.29	92.86
β -mirceno (B)	48.39	100.00	100.00
β -ocimeno/ β -mirceno (AB)	48.28	96.77	100.00

B) Experimento 2: Análise estatística

Par de odores	Efeito de <i>overshadowing</i> ($\chi^2_{(1;0.05)}$ de McNemar)		Diferenças nas respostas ao estímulo ofuscado ($\chi^2_{(1;0.025)}$)	
	χ^2	p	χ^2	p
β -ocimeno - β -mirceno	13.06	< 0.001	17.07	< 0.001

Experimento 3: O composto majoritário β -ocimeno não promove generalização entre misturas que o contém

No Experimento 1, mostramos que tanto fenilacetaldéido (Fig. 1A) quanto decanal (Fig. 1B) dominam as suas respectivas misturas binárias com β -ocimeno. Aqui, perguntamos se apesar da ocorrência de *overshadowing*, a presença comum de β -ocimeno promove generalização entre duas misturas binárias que o contém (AB: β -ocimeno/fenilacetaldéido; AC: β -ocimeno/decanal).

Ao longo do condicionamento, as abelhas aprenderam bem e de forma semelhante a responder à ambas as misturas (Fig. 3, painel à esquerda), de forma que não foi encontrado um efeito significativo do grupo ($gl=1$, $\chi^2=1.44$, $P=0.22$, $n=72$) enquanto que encontramos um efeito significativo da repetição ($gl=2$, $\chi^2=69.05$, $P<0.001$, $N=72$). A interação entre repetição e identidade do EC não foi significativa ($gl=2$, $\chi^2=3.22$, $P=0.19$, $N=72$). Nos testes (Fig. 3, painel à esquerda), ambos os grupos responderam significativamente mais à sua mistura condicionada que à nova mistura (condicionamento com AB: AB = 91.89%, AC = 35.13%, χ^2 de McNemar =19.048, $gl=1$, $P<0.001$; condicionamento com AC: AB = 25.71%, AC = 94.28%, χ^2 de McNemar =22.042, $gl=1$, $P<0.001$). A porcentagem de resposta à mistura nova, seja ela AB ou AC, foi em ambos os casos significativamente menor que um nível teórico de 50% (teste t de uma amostra; condicionamento com AB: $gl=34$, $t=-3.24$, $P<0.001$; condicionamento com AC: $gl=36$, $t=-2.49$, $P<0.05$), o que seria esperado se as abelhas processassem as misturas aditivamente. Se esse fosse o caso, respostas a A após o treinamento com a mistura deveriam representar 50%, enquanto que a mistura levaria a 100% de respostas. Sob essa suposição, abelhas respondendo a A na nova mistura também deveriam apresentar níveis de resposta em torno de 50%. O fato de que as respostas à nova mistura foram abaixo desse nível, mostram que a generalização entre misturas baseadas no composto comum, β -ocimeno, não foi relevante.

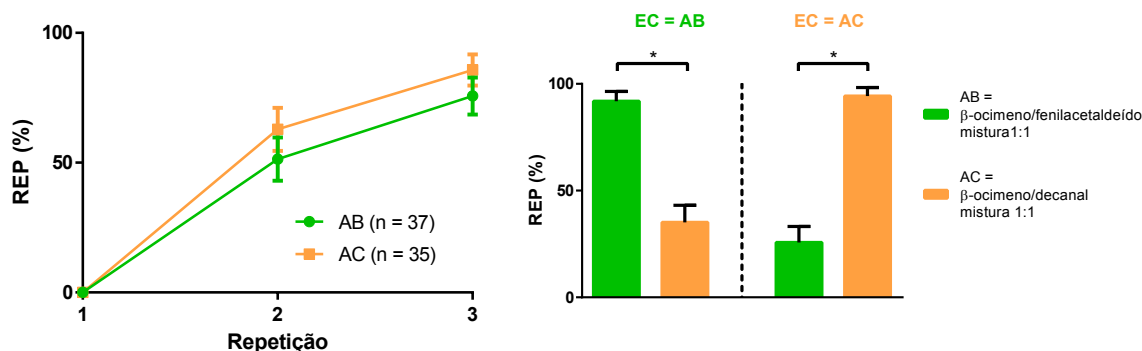


Fig. 3. Experimento 3: Reconhecimento de misturas. As abelhas foram treinadas a associar misturas 1:1 de β -ocimeno e fenilacetaldéido (AB) ou β -ocimeno e decanal (AC) como estímulo condicionado (EC) com solução de sacarose durante três repetições em condicionamento absoluto. O quadro à esquerda mostra as curvas de aquisição durante o condicionamento. O quadro à direita mostra as performances de retenção e generalização testadas uma hora após o condicionamento. As abelhas foram capazes de diferenciar entre as duas misturas em ambas os casos (χ^2 de McNemar, $p < 0.05$), indicando que β -ocimeno não induz generalização e não é a principal pista preditiva na fragrância de *I. utricularioides*, mesmo sendo o seu composto majoritário. As barras de erro representam o erro padrão da média.

Imageamento de cálcio

A Fig. 4A mostra exemplos representativos dos mapas olfativos (ativação glomerular do lobo antenal) obtidos em uma abelha após a estimulação. Não foi registrada respostas para o controle de ar, mas respostas claras foram obtidas para a maior parte dos outros estímulos, sendo a menor observada para β -mirceno. O composto majoritário β -ocimeno também induziu fracos sinais. De forma geral, as respostas às misturas foram qualitativamente similares àquelas dos composto mais saliente em cada mistura (compare, por exemplo, a resposta ao fenilacetaldéido e à mistura β -ocimeno/fenilacetaldéido).

A análise de intensidade de pixels para cada mapa registrado revelou que as respostas aos compostos assim como às suas misturas correspondentes variaram significativamente (ANOVA, efeito do estímulo: $F_{9,109}=27.6$, $P<0.0001$; Fig. 4B). No caso dos compostos individuais, confirmamos que a resposta mais forte foi induzida pelo fenilacetaldéido, enquanto que a mais fraca foi induzida pelo β -mirceno. Enquanto que a maior parte dos estímulos diferiu do controle de ar (Holm-Sidak, $P<0.01$ para fenilacetaldéido, $P<0.05$ para decanal e R-limoneno), as respostas ao β -mirceno não foram diferentes ($P=0.39$). Em relação às misturas contendo β -ocimeno, os níveis de resposta foram mais altos para a mistura β -ocimeno/fenilacetaldéido e os mais baixos foram para a mistura β -ocimeno/ β -mirceno. As respostas às misturas foram significativamente diferentes do controle de ar (β -ocimeno/fenilacetaldéido e β -ocimeno/decanal: $P<0.001$; β -ocimeno/R-limoneno: $P<0.05$), exceto para a mistura β -ocimeno/ β -mirceno ($P=0.23$).

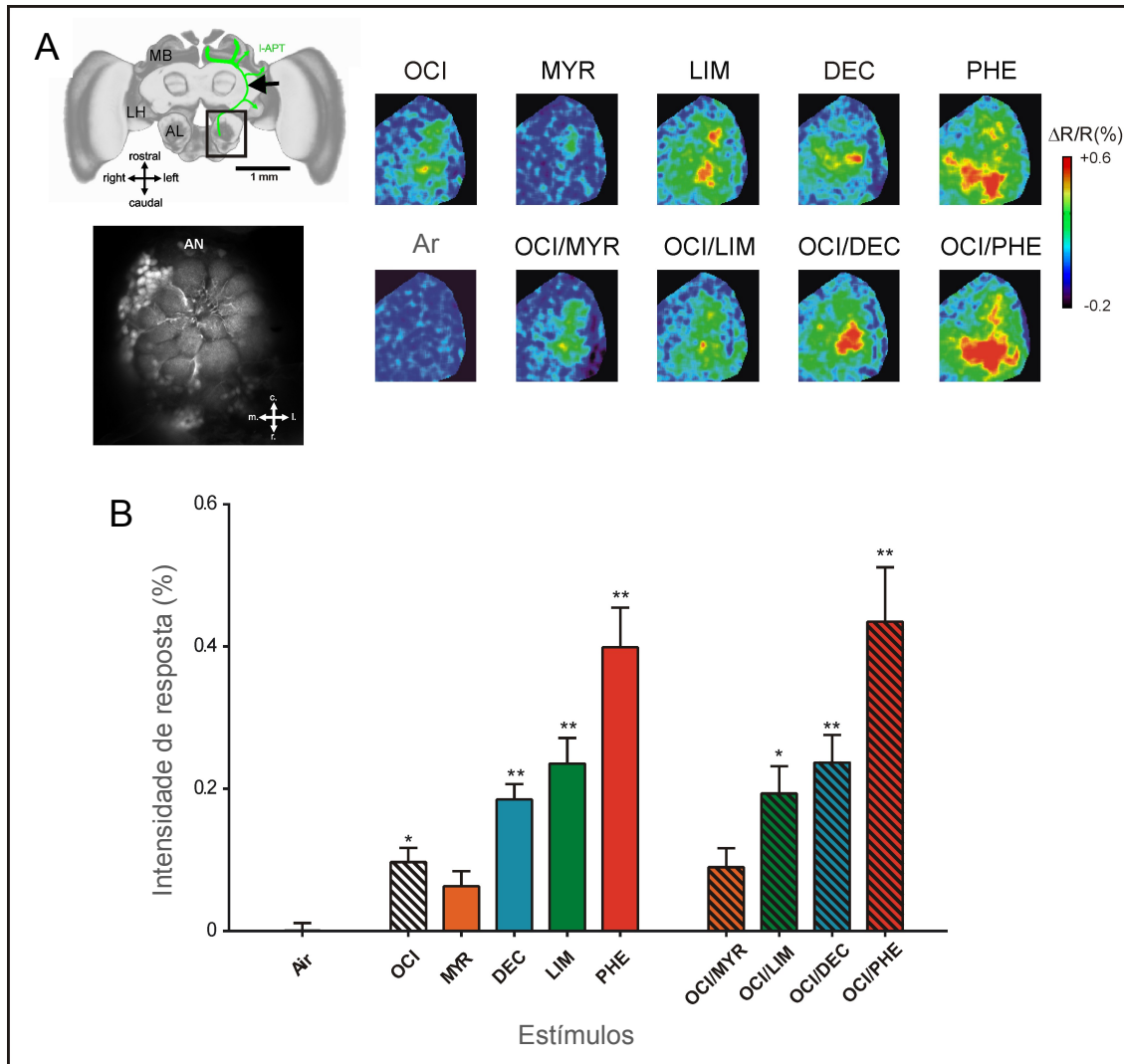


Fig. 4. Respostas neurais no lobo antenal. (A) Exemplo representativo dos mapas olfativos obtidos para uma abelha durante estimulação com os estímulos. À esquerda, esquema do cérebro de uma abelha, indicando o local de injeção do corante (seta). No destaque, uma imagem do lobo antenal. À direita, cada imagem representa os padrões de ativação induzidos para cada composto ou suas misturas binárias. (B) Intensidade das respostas para cada composto ou suas misturas binárias. Note que β -mirceno induz o sinal mais fraco, não sendo diferente do controle de ar ($P=0.39$), enquanto que fenilacetaldéido induz o sinal mais forte. β -ocimeno, o composto majoritário da fragrância da orquídea também induz sinal fraco. Em relação às misturas binárias, a mistura β -ocimeno/ β -mirceno induziu o sinal mais fraco, enquanto que a mistura β -ocimeno/fenilacetaldéido o mais forte. As barras de erro representam o erro padrão da média. OCI = β -ocimeno, PHE = fenilacetaldéido, DEC = decanal, MYR = β -mirceno, LIM = R-limoneno.

A análise de proximidade a partir da matriz de distâncias obtida revelou que as duas principais dimensões representaram 66.1% e 8.9% de variância geral. A Fig. 5A apresenta as respostas aos dez estímulos analisados (5 compostos, 4 misturas e controle de ar) no plano formado por essas duas dimensões. A primeira dimensão separou os estímulos baseado nas intensidades das respostas. A resposta mais fraca, ao controle de ar, apareceu à esquerda do espaço, enquanto que a mais forte, ao fenilacetaldéido, apareceu à direita. Conseqüentemente, os compostos individuais mais fracos, β -mirceno e β -ocimeno, estão mais próximos à resposta

ao ar, enquanto que R-limoneno e decanal aparecem ao centro do espaço. As misturas se agruparam de acordo com o seu composto mais forte. Por exemplo, a mistura β -ocimeno/ β -mirceno ficou mais próxima de β -ocimeno que de β -mirceno e a mistura β -ocimeno/fenilacetaldeído aparece mais próxima de fenilacetaldeído que de β -ocimeno.

A análise de agrupamento (Fig. 5B) confirmou que a atividade neural induzida pelo composto fraco β -mirceno é mais próxima daquela induzida pelo controle de ar. Todos os outros grupos foram formados por um composto individual e a mistura contendo esse composto. O primeiro grupo a se separar dos demais incluiu o composto forte fenilacetaldeído e sua mistura com β -ocimeno. Em seguida, uma segunda separação agrupou em um lado as duas misturas contendo decanal ou R-limoneno e suas respectivas misturas, e do outro lado todos os estímulos fracos (β -mirceno e β -ocimeno) e o controle de ar. Dentro desse segundo grupo, a mistura β -ocimeno/ β -mirceno se agrupou com β -ocimeno.

Os quatro triângulos construídos a partir das distâncias Euclidianas reais entre os estímulos apresentaram diferentes graus de assimetria, sendo desde um triângulo quase simétrico (β -ocimeno/R-limoneno) até um triângulo altamente assimétrico (β -ocimeno/fenilacetaldeído) (Fig. 5C). Comparações estatísticas das distâncias entre os dois compostos e a mistura revelaram que três triângulos eram, de fato, assimétricos. A mistura β -ocimeno/decanal foi estatisticamente mais próxima de decanal que de β -ocimeno (Wilcoxon, $Z=2.67$, $P<0.01$), a mistura β -ocimeno/fenilacetaldeído foi mais próxima de fenilacetaldeído que de β -ocimeno ($Z=2.85$, $P<0.01$) e a mistura β -ocimeno/ β -mirceno foi mais próxima de β -ocimeno que de β -mirceno ($Z=2.48$, $P<0.05$). Para a mistura β -ocimeno/R-limoneno, não foi encontrada diferença significativa ($Z=1.51$, $P>0.05$). Com base nesses dados neurais, é possível prever que R-limoneno não ofuscava β -ocimeno, enquanto que fenilacetaldeído e decanal ofuscavam esse composto. Essas previsões estão de acordo com o que foi encontrado nos resultados dos experimentos comportamentais. A única diferença encontrada, nesse sentido, foi para a mistura β -ocimeno/ β -mirceno. Nesse caso, esperávamos encontrar uma diferença na atividade neural em favor do β -mirceno, devido à sua capacidade em ofuscar β -ocimeno revelada pelos experimentos comportamentais. No entanto, encontramos o oposto: β -ocimeno induziu atividade neural mais forte que àquela de β -mirceno.

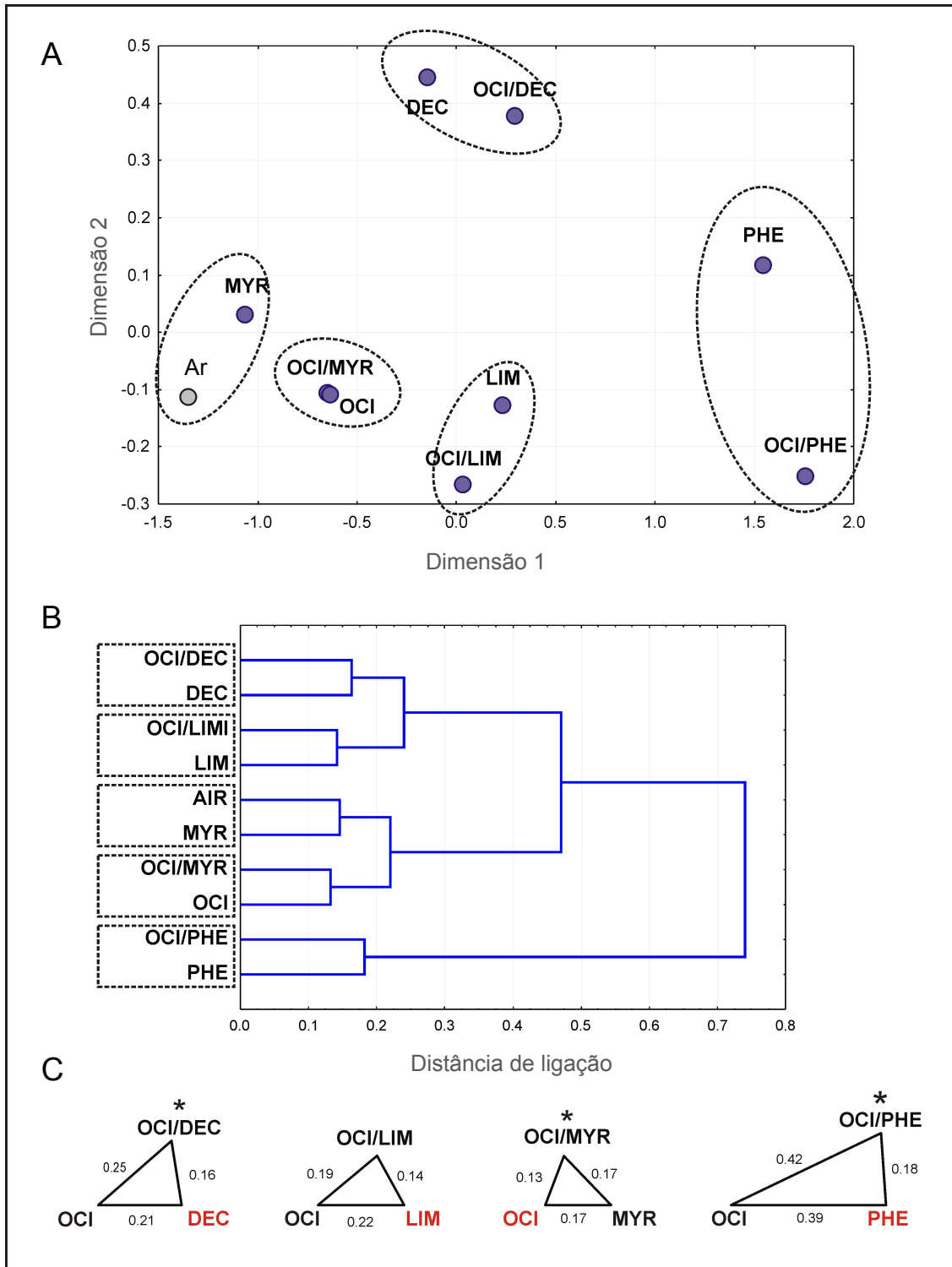


Fig. 5. Análise de similaridade para as respostas neurais no lobo antenal. (A) As duas principais dimensões representam respectivamente 66.1% e 8.9% da variância geral. β -mirceno foi o composto mais próximo do controle de ar, uma vez que não induziu respostas significativamente diferente dele. As misturas foram agrupadas de acordo com o seu composto mais forte. (B) A análise de agrupamento uniu as misturas de acordo com seu composto mais forte, confirmando a análise anterior. (C) Triângulos construídos com as distâncias reais entre os compostos e suas respectivas misturas. Os vértices representam os dois compostos e a mistura deles. O composto em vermelho é o considerado mais forte pelas análises anteriores. De acordo com essa análise, β -ocimeno deveria ser ofuscado por fenilacetaldéido e decanal, ($P < 0.01$), mas não por R-limoneno, o que vai de acordo com o encontrado nos experimentos comportamentais. β -mirceno deveria ser dominado por β -ocimeno, ($P < 0.05$), diferente do que encontrado nos experimentos comportamentais. OCI = β -ocimeno, PHE = fenilacetaldéido, DEC = decanal, MYR = β -mirceno, LIM = R-limoneno.

Discussão

Para revelar os mecanismos olfativos subjacentes à polinização por engano, nós focamos na interação entre *Ionopsis utricularioides*, uma orquídea polinizada por engano, e um de seus visitantes florais, a abelha *Apis mellifera*. Nós caracterizamos os componentes da fragrância variável da orquídea e determinamos a presença e identidade de compostos majoritários e minoritários. O fato de que a fragrância exibe uma expressiva variabilidade nos seus compostos fragrantes, mas ao mesmo tempo apresenta um composto recorrente e abundante, é importante para entender como a polinização por engano ocorre. Enquanto que a primeira característica deveria facilitar a polinização por engano ao dificultar o aprendizado preditivo de ausência de recurso, a segunda deveria ter um efeito contrário, facilitando tal aprendizado e atrapalhando a polinização por engano. Nós, então, perguntamos se o sucesso de orquídeas polinizadas por engano conta com o fato de que compostos minoritários e variáveis da fragrância ofuscariam compostos abundantes e menos variáveis, mantendo esse mecanismo de polinização. Para responder essa questão, nós adotamos uma abordagem de psicologia experimental e usamos experimentos de condicionamento olfativo para avaliar como as abelhas percebem e aprendem misturas binárias de compostos majoritários e minoritários da fragrância da orquídea. Nossos resultados mostram que β -ocimeno, o composto majoritário da fragrância de *I. utricularioides*, foi ofuscado por três dos quatro compostos minoritários utilizados (β -mirceno, decanal e fenilacetaldéido) e que esse fenômeno foi mantido mesmo quando a razão entre compostos majoritário e minoritário foi de 50:1. Além disso, ao condicionar abelhas a uma mistura binária e testá-las com uma nova mistura binária compartilhando o composto β -ocimeno com a aprendida, mostramos que a generalização entre misturas é reduzida. As performances comportamentais foram parcialmente devido ao processamento neural dos compostos da fragrância da orquídea. As medidas optofisiológicas de atividade neural no lobo antenal das abelhas revelou que o composto majoritário, β -ocimeno, induz, na verdade, fraco sinal neural, o que resultou no seu ofuscamento pelo fenilacetaldéido e pelo decanal. R-limoneno não apresentou diferenças nas distâncias reais de atividade neural em relação ao β -ocimeno e a mistura dos dois compostos, o que explica a ausência de *overshadowing* após o condicionamento com a mistura β -ocimeno/R-limoneno. Apenas no caso da mistura β -ocimeno/ β -mirceno uma discrepância entre performances comportamentais e neurais foi encontrada. De acordo com os dados de ativação neural, β -mirceno foi ainda mais fraco que β -ocimeno e não deveria ter ofuscado o

composto majoritário após o condicionamento com a mistura β -ocimeno/ β -mirceno, como encontrado nos experimentos comportamentais.

Em conjunto, nossos resultados indicam que apesar da presença de um composto majoritário e recorrente na fragrância da orquídea, a polinização por engano é mantida pois os compostos minoritários ofuscam o composto mais abundante, que poderia atuar como um preditor confiável da ausência de recurso nas espécies polinizadas por engano. O fato de que a generalização entre misturas é reduzida também contribui para a manutenção da polinização por engano, pois diminui a possibilidade de transferência de experiências negativas entre visitas com pistas olfativas variáveis, mesmo que existam compostos em comum. Ambas as situações possuem claras correlações neurais: β -ocimeno, o composto majoritário da fragrância da orquídea, induziu fracos sinais neurais que refletiram na sua incapacidade de atuar como uma pista saliente, e ambas as misturas contendo β -ocimeno utilizadas (β -ocimeno/fenilacetaldéido e β -ocimeno/decanal) se apresentaram distantes entre si no espaço olfativo das abelhas (Fig. 5A), reduzindo a possibilidade de generalização entre as misturas.

No nosso estudo usamos uma abordagem multidimensional, que incluiu o condicionamento olfativo de extensão de probóscide, um protocolo padrão de aprendizado estabelecido para o estudo de aprendizado e memória em abelhas (Bitterman *et al.* 1983, Giurfa & Sandoz 2012, Matsumoto *et al.* 2012). Ele possui a vantagem de reproduzir o contexto de busca por comida que ocorre durante o forrageamento ao utilizar alimento (solução de sacarose) como equivalente do recurso de néctar, se baseando na capacidade das abelhas em aprender pistas sensoriais predictoras de recompensa (Menzel 1985). Além disso, ele fornece condições de laboratório controladas para quantificar respostas comportamentais em problemas de percepção e aprendizado, que são comumente estudados na psicologia experimental. *Overshadowing* é um dos fenômenos que tem sido estudados repetitivamente usando esse protocolo para entender se e como as interações entre componentes de misturas binárias de odores afetam o aprendizado e percepção olfativa dos insetos (Pelz *et al.* 1997, Smith 1998, Reinhard *et al.* 2010, Schubert *et al.* 2015). A originalidade do nosso trabalho, em relação aos anteriores, está no uso de compostos fragrantes específicos da orquídea *I. utricularioides*, colocando nossa investigação cognitiva em um contexto ecológico. No entanto, a principal diferença entre nosso contexto experimental e aquele da polinização por engano na natureza é o contraste entre aprendizado sobre recompensas de alimento (condicionamento REP) e o aprendizado sobre a ausência de recursos (polinização por engano). Independentemente desse fato, nossa abordagem representa uma forma legítima para entender o caso da polinização por engano, uma vez que a questão levantada no nosso

trabalho se refere a como as abelhas processam a informação olfativa (o estímulo condicionado, em termos pavlovianos) e não o subsequente reforço, seja ele sacarose ou a sua ausência (o estímulo não-condicionado). Tal processamento do EC, que é mediado pelos mesmos caminhos olfativos, é comum para ambas as formas de aprendizado, apetitivo e aversivo. Então, é compreensível que experimentos sobre o aprendizado em *Apis mellifera* mostram que a dinâmica do aprendizado olfativo apetitivo e aversivo são comparáveis, contam com avaliação perceptiva semelhante e levam a performances de retenção similares (Giurfa *et al.* 2009, Giurfa & Sandoz 2012, Tedjakumala & Giurfa 2013). Como consequência, os resultados obtidos no contexto apetitivo do condicionamento REP podem ser justificadamente generalizados para o caso da polinização por engano.

Enquanto que no primeiro e segundo experimento estudamos o *overshadowing* para entender possíveis interações dentro da mistura, no terceiro experimento estudamos a generalização entre misturas diferentes de odores, porém que tinham em comum a presença de β -ocimeno. As abelhas treinadas a uma mistura binária não generalizaram as suas respostas apetitivas a nova mistura binária contendo um composto da mistura previamente usada como EC. Esse resultado mostra que interações dentro da mistura possuem outra consequência, que também pode favorecer a polinização por engano: o processamento holístico de misturas olfativas. A questão se animais percebem os elementos de uma mistura de estímulos (processamento elementar, e.g. Rescorla 1972, 1973, Rescorla & Wagner 1972) ou tratam a mistura como uma entidade integral, diferente dos seus elementos (processamento holístico, e.g. Pearce 1987, J M Pearce 1994) tem sido sujeito de intenso debate tanto dentro quanto entre modalidades sensoriais. Pesquisas acerca do processamento olfativo em abelhas mostraram que os processamentos elementar ou holístico ocorrem dependendo do treinamento e dos parâmetros usados no experimento. Traduzindo para os nossos experimentos, caso as abelhas processassem as misturas olfativas de forma elementar, era esperada uma resposta de ao menos 50% à nova mistura durante os testes, uma vez que o β -ocimeno é responsável por metade da composição em ambas as misturas e tal hipótese tem como base o processamento aditivo dos componentes da mistura. No nosso caso, no entanto, o reduzido nível de generalização entre misturas (< 50%) é favorável à hipótese holística. Se as misturas são percebidas como entidades únicas, como proposto pela hipótese holística, variar a composição da mistura de uma flor para outra seria uma solução adaptativa que reduziria a generalização de experiências negativas entre visitas sem recompensa e promoveria a polinização por engano de alimento.

Para expandir a nossa análise, incorporamos a quantificação da atividade neural no lobo antenal, o centro olfativo principal do cérebro das abelhas, durante a estimulação com os compostos da fragrância da orquídea e suas misturas binárias. Essa abordagem tem sido raramente abordada, revelando a dificuldade de aliar análises ecológicas e neurobiológicas. Na orquídea polinizada por engano *Orchis israelítica*, que imita as cores de outra espécie de planta com recursos florais, os registros por imageamento de cálcio revelaram que as respostas às fragrâncias do modelo e do mimético eram diferentes, indicando que esse sinal provavelmente não está envolvido no mimetismo floral (Galizia *et al.* 2005). No nosso caso, a atividade neural no lobo antenal teve correlação acurada com três dos quatro casos de processamento de misturas. O *overshadowing* comportamental de β -ocimeno por fenilacetaldéido e decanal pode ser explicado pelos sinais neurais fracos induzidos por β -ocimeno e pelos sinais fortes induzidos pelos outros dois compostos, o que resultou no ofuscamento. A ausência de *overshadowing* entre β -ocimeno e R-limoneno também pode ser explicada pelo fato de que os sinais neurais desses dois compostos tiveram pesos similares, de forma que a mistura β -ocimeno/R-limoneno não foi dominada por nenhum dos dois. No entanto, os dados neurais não puderam explicar o motivo de β -mirceno ofuscar β -ocimeno nos experimentos de comportamento, uma vez que ele induziu sinais ainda mais fracos comparado ao β -ocimeno. Nesse caso, nossa hipótese é de que outros estágios subsequentes de processamento em áreas de ordem superior do cérebro da abelha (e.g. corpos cogumelares) podem levar a uma amplificação do sinal de β -mirceno, e/ou enfraquecimento do sinal de β -ocimeno, o que levaria ao ofuscamento de β -ocimeno por β -mirceno. Essa hipótese pode ser testada em trabalhos futuros, uma vez que o imageamento nessas áreas do cérebro é tecnicamente difícil, porém possível (Szyszka *et al.* 2005, Haehnel *et al.* 2009, Roussel *et al.* 2014).

A abordagem utilizada em nosso trabalho permitiu analisar a questão olfativa da polinização por engano em laboratório para entendê-la a partir da perspectiva do polinizador. Ao reconhecermos que fenômenos cognitivos, como o *overshadowing* e generalização reduzida possuem um papel fundamental nas decisões dos polinizadores durante o forrageamento, a abordagem reversa poderia também ser utilizada, i.e. interpretar as interações inseto-flor no campo baseando-se em fenômenos cognitivos. Apesar do crescente interesse pela ecologia cognitiva da polinização (Chittka & Thomson 2001, Brito *et al.* 2014), tal abordagem ainda é incomum e deveria ser mais utilizada, uma vez que o mundo sensorial das flores precisa ser interpretado a partir da perspectiva sensorial e de aprendizagem do polinizador, e não a partir da perspectiva de um pesquisador humano (Vorobyev *et al.* 1997).

Essa situação é ilustrada por um estudo de caso que focou na interação entre *Anacamptis morio*, uma orquídea polinizada por engano de alimento, e abelhas *Bombus* (Juillet *et al.* 2011), no qual a variabilidade da fragrância da orquídea foi manipulada experimentalmente adicionando anisaldeído como uma pista de odor comum às flores sem recurso na população natural e em matrizes artificiais de flores usadas para testar as abelhas. Ao fazer isso, a expectativa era de facilitar o aprendizado em evitar as flores e, dessa forma, reduzir o sucesso reprodutivo das flores manipuladas, assim como as visitas das abelhas às flores sem recurso. No entanto, como o efeito da adição do odor não foi significativo, foi concluído que a variação na fragrância floral não teria um papel na polinização por engano. Porém, o estudo não levou em consideração possíveis interações entre os compostos da fragrância, como aquelas reveladas pelo nosso trabalho. Portanto, a ausência de diferenças entre as flores manipuladas e as controle pode ser devido ao fenômeno de *overshadowing* (i.e. a fragrância natural de *A. morio* poderia ter ofuscado o odor adicionado), que não foi considerado nesse estudo.

Outro atalho que deve ser evitado em análises ecológicas de percepção dos polinizadores diz respeito a suposição de que medidas de detecção de sinais refletem na percepção integral daquele sinal. Por exemplo, no estudo mencionado acima, o uso de anisaldeído para manipular a fragrância floral foi justificado por desencadear respostas fisiológicas ao nível da antena da abelha (Salzmann *et al.* 2007). Esse argumento se baseia na detecção do sinal, i.e. nas respostas periféricas a um sinal sensorial, que são mediadas por receptores olfativos. Porém, os receptores olfativos correspondem apenas a entrada ao sistema nervoso e não refletem a percepção verdadeira, uma vez que ela surge ao nível central (e.g. no cérebro) por processamento em estágios múltiplos nos circuitos responsáveis por tal sinal. Tal processamento pode introduzir um remodelamento considerável do sinal de entrada por meio de circuitos inibitórios e excitatórios, resultando em uma resposta diminuída ao sinal inicialmente detectada ao nível de entrada (Sachse *et al.* 1999, Sachse & Galizia 2002, 2003).

A hipótese de Heinrich sobre a polinização por engano sugere que quanto mais diferentes são as flores de uma espécie sem recursos florais, mais tempo levaria um polinizador a aprender a evitar tal espécie (Heinrich 1975). O teste dessa hipótese, que nós consideramos aqui no domínio olfativo, poderia ser estendido a outras modalidades sensoriais que participam na detecção e reconhecimento das flores (e.g. visão). De fato, a variação na cor floral já foi extensamente descrita em orquídeas polinizadas por engano (Gigord *et al.* 2002, Salzmann & Schiestl 2007, Juillet & Scopece 2010b, Ackerman *et al.* 2011, Kagawa & Takimoto 2016, Aguiar & Pansarin 2019). Vários modelos já foram propostos para entender a visão em cores das abelhas (Backhaus 1991, Chittka 1992, Vorobyev & Osorio 1998) e para

realizar inferências sobre o papel das características das cores florais no contexto da polinização por engano (Galizia *et al.* 2005, Papadopulos *et al.* 2013, Aguiar & Pansarin 2019). Alguns desses modelos são baseados no processamento central de sinais de cor baseados em neurônios oponentes de cores (Backhaus 1991, Chittka 1992), enquanto que outros levam em conta o processamento dos receptores (Vorobyev & Osorio 1998). Modelos como os criados para o domínio visual não existem para o domínio olfativo das abelhas, uma vez que a dimensionalidade da percepção de odores é ainda pouco conhecida (Haddad *et al.* 2008). Por esse motivo, a melhor maneira de entender como a variação na fragrância é percebida pelos polinizadores é utilizar análises comportamentais e neurobiológicas da percepção olfativa.

Ao analisarmos nossos dados de composição da fragrância e resultados comportamentais e neurais, podemos nos perguntar qual o papel da abundância e recorrência do β -ocimeno nas flores de *I. utricularioides*. Se ele é dominado pela maioria dos compostos minoritários, por que investir na alta produção e emissão desse composto em específico? O β -ocimeno é muito comum em muitas flores com recursos que são polinizadas por insetos (Knudsen *et al.* 2006, Farré-Armengol *et al.* 2017). Além disso, um dos isômeros dessa molécula, E- β -ocimeno, possui um papel de feromônio em *Apis mellifera*. Larvas jovens produzem esse composto como uma forma de expressar suas necessidades nutricionais para as operárias na colônia (Maisonnasse *et al.* 2010), aumentando a sua produção quando famintas (He *et al.* 2016). Apesar do estudo revelar o papel de feromônio de apenas um dos isômeros de β -ocimeno, sabemos que as abelhas generalizam muito entre isômeros da fragrância floral (Aguiar *et al.* 2018). Portanto, podemos afirmar que β -ocimeno está intrinsicamente relacionado a um contexto apetitivo em abelhas. Existe uma hipótese de que a recorrência e abundância de β -ocimeno atuaria como um sinal floral global para várias plantas com flores em uma comunidade e compostos minoritários e outros sinais florais poderiam assegurar a especificidade necessária para a polinização (Farré-Armengol *et al.* 2017). Traduzindo para o nosso contexto da polinização por engano, β -ocimeno poderia atuar como um sinal global em *I. utricularioides* e, ao visitar as flores, as abelhas perceberiam e aprenderiam melhor os outros compostos minoritários e mais dominantes, os associando com a ausência de recurso. A variabilidade dos compostos minoritários e as suas dominâncias atuariam em favor da polinização por engano, ao perturbar o aprendizado em evitar as flores.

Em conjunto, nossos resultados enfatizam a importância em adotar uma perspectiva cognitiva dos polinizadores nas análises de interações inseto-planta. Nós demonstramos que entender interações ecológicas complexas, como a polinização por engano, pode ser possível

por meio da incorporação de perspectivas neurais e cognitivas baseando-se em performances de aprendizado e memória dos polinizadores. A integração dessas perspectivas com os estudos ecológicos e evolutivos devem nos levar a uma explicação neurocognitiva da polinização, que será mais rica e informativa que qualquer análise de abordagem única.

Agradecimentos

Agradecemos a Arodi P. Favaris pelo apoio técnico nas análises de CG-EM, assim como Patrícia A. Sanches pela participação ativa nas análises de fragrância floral e José Maurício S. Bento pela disponibilização dos materiais e do laboratório onde elas foram realizadas. Também agradecemos Maria Eugenia Villar e Paul Marchal pela ajuda com os experimentos de REP, Alexis Buatois e Natacha Rossi pela ajuda com as análises estatísticas, e Lucie Hotier pelo trabalho de apicultura realizado ao longo dos experimentos comportamentais.

Referências

- Ackerman, J. 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, 1(2), 108–113.
- Ackerman, J. D., Cuevas, A. A., & Hof, D. 2011. Are deception-pollinated species more variable than those offering a reward? *Plant Systematics and Evolution*, 293(1–4), 91–99. DOI: 10.1007/s00606-011-0430-6
- Aguiar, J. M. R. B. V., & Pansarin, E. R. 2019. Deceptive pollination of *Ionopsis utricularioides* (Oncidiinae: Orchidaceae). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 250, 72–78. DOI: 10.1016/j.flora.2018.11.018
- Aguiar, J. M. R. B. V., Roselino, A. C., Sazima, M., & Giurfa, M. 2018. Can honey bees discriminate between floral-fragrance isomers? *Journal of Experimental Biology*, 221, jeb180844. DOI: 10.1242/jeb.180844
- Backhaus, W. 1991. Color opponent coding in the visual system of the honeybee. *Vision Research*, 31(7–8), 1381–1397. DOI: 10.1016/0042-6989(91)90059-E
- Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., & Schäfer, S. 1983. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(2), 107–119. DOI: 10.1037//0735-7036.97.2.107
- Brembs, B., & Heisenberg, M. 2001. Conditioning with compound stimuli in *Drosophila melanogaster* in the flight simulator. *Journal of Experimental Biology*, 204, 2849–2859.
- Brito, V., Telles, F., & Lunau, K. 2014. Ecologia Cognitiva da Polinização. In: A. R. Rech, K.

- Agostini, P. E. Oliveira, & I. C. Machado (Eds.), *Biologia da Polinização*. pp. 417–438. Rio de Janeiro: Projeto Cultural.
- Chittka, L. 1992. The colour hexagon: a chromaticity diagram based on photoreceptor excitations as a generalized representation of colour opponency. *Journal of Comparative Physiology A*, 170(5), 533–543. DOI: 10.1007/BF00199331
- Chittka, L., & Thomson, J. D. 2001. *Cognitive ecology of pollination: animal behavior and floral evolution*. Cambridge University Press, 108, 287–288. DOI: 10.1046/j.1439-0310.2002.00774.x
- Cook, M., & Mineka, S. 1987. Second-order conditioning and overshadowing in the observational conditioning of fear in monkeys. *Behaviour Research and Therapy*, 25(5), 349–364. DOI: 10.1016/0005-7967(87)90013-1
- Deisig, N., Giurfa, M., Lachnit, H., & Sandoz, J. 2006. Neural representation of olfactory mixtures in the honeybee antennal lobe., 24, 1161–1174. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.04959.x
- Deisig, N., Giurfa, M., & Sandoz, J. C. 2010. Antennal lobe processing increases separability of odor mixture representations in the honeybee. *Journal of Neurophysiology*, 103(4), 2185–94. DOI: 10.1152/jn.00342.2009
- Derby, C. D., Hutson, M., Livermore, B. A., & Lynn, W. H. 1996. Generalization among related complex odorant mixtures and their components: Analysis of olfactory perception in the spiny lobster. *Physiology and Behavior*, 60(1), 87–95. DOI: 10.1016/0031-9384(95)02237-6
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusà, J., & Peñuelas, J. 2017. β -Ocimene, a key floral and foliar volatile involved in multiple interactions between plants and other organisms. *Molecules*, 22, 1148. DOI: 10.3390/molecules22071148
- Galizia, C. G., Kunze, J., Gumbert, A., Borg-Karlson, A. K., Sachse, S., Markl, C., & Menzel, R. 2005. Relationship of visual and olfactory signal parameters in a food-deceptive flower mimicry system. *Behavioral Ecology*, 16(1), 159–168. DOI: 10.1093/beheco/arh147
- Gigord, L. D. B., Macnair, M. R., & Smithson, A. 2002. Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6253–6255. DOI: 10.1073/pnas.111162598
- Giurfa, M. 2007. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: A taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology*,

- Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 193, 801-824. DOI: 10.1007/s00359-007-0235-9
- Giurfa, M., Fabre, E., Flaven-Pouchon, J., Groll, H., Oberwallner, B., Vergoz, V., Roussel, E., & Sandoz, J. C. 2009. Olfactory conditioning of the sting extension reflex in honeybees: Memory dependence on trial number, interstimulus interval, intertrial interval, and protein synthesis. *Learning and Memory*, 16(12), 761–765. DOI: 10.1101/lm.1603009
- Giurfa, M., & Sandoz, J.-C. 2012. Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & Memory*, 19(2), 54–66. DOI: 10.1101/lm.024711.111
- Guerrieri, F., Schubert, M., Sandoz, J. C., & Giurfa, M. 2005. Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biology*, 3(4), 0718–0732. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030060
- Haddad, R., Khan, R., Takahashi, Y. K., Mori, K., Harel, D., & Sobel, N. 2008. A metric for odorant comparison. *Nature Methods*, 5(5), 425–429. DOI: 10.1038/nmeth.1197
- Haehnel, M., Froese, A., & Menzel, R. 2009. In vivo Ca^{2+} - imaging of mushroom body neurons during olfactory learning in the honey bee. *Journal of Visualized Experiments*, 30, e1353. DOI: 10.3791/1353
- He, X. J., Zhang, X. C., Jiang, W. J., Barron, A. B., Zhang, J. H., & Zeng, Z. J. 2016. Starving honey bee (*Apis mellifera*) larvae signal pheromonally to worker bees. *Scientific Reports*, 6, 22359. DOI: 10.1038/srep22359
- Heinrich, B. 1975. Bee flowers: a hypothesis on flower variety and blooming times. *Evolution*, 29(2), 325–334. DOI: 10.2307/2407220
- Jersáková, J., Johnson, S. D., & Kindlmann, P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews*, 81, 219-235. DOI: 10.1017/S1464793105006986
- Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C. G., & Menzel, R. 1997. Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature*, 387(6630), 285–288. DOI: 10.1038/387285a0
- Johnson, S. D., & Schiestl, F. P. 2016. *Floral Mimicry*. Oxford University Press.
- Juillet, N., Salzman, C. C., & Scopece, G. 2011. Does facilitating pollinator learning impede deceptive orchid attractiveness? A multi-approach test of avoidance learning. *Plant Biology*, 13(4), 570–575. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00421.x
- Juillet, N., & Scopece, G. 2010. Does floral trait variability enhance reproductive success in

- deceptive orchids? Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 12, 317-322. DOI: 10.1016/j.ppees.2010.05.001
- Kagawa, K., & Takimoto, G. 2016. Inaccurate color discrimination by pollinators promotes evolution of discrete color polymorphism in food-deceptive flowers. *The American Naturalist*, 187(2), 194-204. DOI: 10.1086/684433
- Kamin, L. J. 1968. Attention-like processes In classical conditioning. In: *Miami Symposium On The Prediction Of Behavior*. pp. 9–33. .
- Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J., & Ståhl, B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review*, 72(1), 1–120. DOI: 10.1663/0006-8101(2006)72[1:dadofs]2.0.co;2
- Kosaki, Y., Austen, J. M., & McGregor, A. 2013. Overshadowing of geometry learning by discrete landmarks in the water maze: Effects of relative salience and relative validity of competing cues. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 39(2), 126–139. DOI: 10.1037/a0031199
- Leising, K. J., Garlick, D., & Blaisdell, A. P. 2011. Overshadowing between landmarks on the touchscreen and in ARENA with pigeons. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 37(4), 488–494. DOI: 10.1037/a0023914
- Maisonnasse, A., Lenoir, J. C., Beslay, D., Crauser, D., & Le Conte, Y. 2010. E- β -ocimene, a volatile brood pheromone involved in social regulation in the honey bee colony (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 5(10), e13531. DOI: 10.1371/journal.pone.0013531
- Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J. C., & Giurfa, M. 2012. Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: A step toward standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(1), 159–167. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.018
- Menzel, R. 1999. Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 185, 323-340. DOI: 10.1007/s003590050392
- Papadopulos, A. S. T., Powell, M. P., Pupulin, F., Warner, J., Hawkins, J. A., Salamin, N., Chittka, L., Williams, N. H., Whitten, W. M., Loader, D., Valente, L. M., Chase, M. W., & Savolainen, V. 2013. Convergent evolution of floral signals underlies the success of Neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1765), 20130960–20130960. DOI: 10.1098/rspb.2013.0960
- Pearce, J. M. 1987. A model for stimulus generalization in pavlovian conditioning. *Psychological Review*, 94(1), 61–73. DOI: 10.1037/0033-295X.94.1.61

- Pearce, J. M. 1994. Similarity and discrimination: a selective review and a connectionist model. *Psychological Review*, 101(4), 587–607.
- Pelz, C., Gerber, B., & Menzel, R. 1997. Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation. *Journal of Experimental Biology*, 200, 837–47.
- Prados, J. 2011. Blocking and overshadowing in human geometry learning. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 37(1), 121–126. DOI: 10.1037/a0020715
- Reinhard, J., Sinclair, M., Srinivasan, M. V., & Claudianos, C. 2010. Honeybees learn odour mixtures via a selection of key odorants. *PLoS ONE*, 5(2), e9110. DOI: 10.1371/journal.pone.0009110
- Rescorla, R. A. 1972. “Configural” conditioning in discrete-trial bar pressing. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 79(2), 307–317. DOI: 10.1037/h0032553
- Rescorla, R. A. 1973. Evidence for “unique stimulus” account of configural conditioning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 85(2), 331–338. DOI: 10.1037/h0035046
- Rescorla, R., & Wagner, A. 1972. A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In: *Classical conditioning: current research and theory*, Vol. 2. pp. 64–99. .
- Roussel, E., Carcaud, J., Combe, M., Giurfa, M., & Sandoz, J. C. 2014. Olfactory coding in the honeybee lateral horn. *Current Biology*, 24(5), 561–567. DOI: 10.1016/j.cub.2014.01.063
- Sachse, S., & Galizia, C. G. 2002. Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *Journal of Neurophysiology*, 87(2), 1106–17. DOI: 10.1152/jn.00325.2001
- Sachse, S., & Galizia, C. G. 2003. The coding of odour-intensity in the honeybee antennal lobe: Local computation optimizes odour representation. *European Journal of Neuroscience*, 18(8), 2119–2132. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2003.02931.x
- Sachse, S., Rappert, A., & Galizia, C. G. 1999. The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: Steps towards the olfactory code. *European Journal of Neuroscience*, 11(11), 3970–3982. DOI: 10.1046/j.1460-9568.1999.00826.x
- Salzmann, C. C., Nardella, A. M., Cozzolino, S., & Schiestl, F. P. 2007. Variability in floral scent in rewarding and deceptive orchids: The signature of pollinator-imposed selection? *Annals of Botany*, 100(4), 757–765. DOI: 10.1093/aob/mcm161

- Salzmann, C. C., & Schiestl, F. P. 2007. Odour and colour polymorphism in the food-deceptive orchid *Dactylorhiza romana*. *Plant Systematics and Evolution*, 267(1–4), 37–45. DOI: 10.1007/s00606-007-0560-z
- Sandoz, J. C. 2011. Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 98. DOI: 10.3389/fnsys.2011.00098
- Schubert, M., Sandoz, J. C., Galizia, G., & Giurfa, M. 2015. Odourant dominance in olfactory mixture processing: What makes a strong odourant? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1802), 20142562. DOI: 10.1098/rspb.2014.2562
- Smith, B. H. 1998. Analysis of interaction in binary odorant mixtures. *Physiology and Behavior*, 65(3), 397–407. DOI: 10.1016/S0031-9384(98)00142-5
- Szyszkka, P., Ditzen, M., Galkin, A., Galizia, C. G., & Menzel, R. 2005. Sparsening and temporal sharpening of olfactory representations in the honeybee mushroom bodies. *Journal of Neurophysiology*, 94(5), 3303–13. DOI: 10.1152/jn.00397.2005
- Szyszkka, P., Gerkin, R. C., Galizia, C. G., & Smith, B. H. 2014. High-speed odor transduction and pulse tracking by insect olfactory receptor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16925–16930. DOI: 10.1073/pnas.1412051111
- Tedjakumala, S. R., & Giurfa, M. 2013. Rules and mechanisms of punishment learning in honey bees: the aversive conditioning of the sting extension response. *Journal of Experimental Biology*, 216, 2985–97. DOI: 10.1242/jeb.086629
- Tennant, W. A., & Bitterman, M. E. 1975. Blocking and overshadowing in two species of fish. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 1(1), 22–29. DOI: 10.1037/0097-7403.1.1.22
- Vorobyev, M., Gumbert, A., Kunze, J., Giurfa, M., & Menzel, R. 1997. Flowers through insect eyes. *Israel Journal of Plant Sciences*, 45(2–3), 93–101. DOI: 10.1080/07929978.1997.10676676
- Vorobyev, M., & Osorio, D. 1998. Receptor noise as a determinant of receptor thresholds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1394), 351–358. DOI: 10.1098/rspb.1998.0302
- Wróblewska, A., Szczepaniak, L., Bajguz, A., Jędrzejczyk, I., Tałałaj, I., Ostrowiecka, B., Brzosko, E., Jermakowicz, E., & Mirski, P. 2019. Deceptive strategy in *Dactylorhiza* orchids: multidirectional evolution of floral chemistry. *Annals of Botany*, mcz003. DOI: 10.1093/aob/mcz003

Capítulo 4

Como treinar sua abelha: métodos aplicados à biologia cognitiva da polinização

Resumo

As abelhas são os principais vetores bióticos da polinização, fenômeno extremamente importante para a manutenção dos sistemas naturais e também para a produção de alimentos. Durante décadas, estudos mostraram como as abelhas são notáveis quanto às suas capacidades cognitivas através de protocolos desenvolvidos para entender o comportamento, aprendizado e memória desses insetos. O objetivo dessa revisão é apresentar de forma simples as bases dos experimentos de cognição em abelhas, descrevendo protocolos clássicos, novas abordagens e estudos empíricos mostrando como o treinamento de abelhas pode ser aplicado à diferentes questões na biologia da polinização.

Palavras-chave: percepção, aprendizado, memória, comportamento, cognição

Abstract

Bees are the major biotic pollination agents, an extremely important phenomenon for the maintenance of natural systems and food production. For decades, studies have shown the remarkable cognition system of bees, and several protocols were developed to understand behavior, learning and memory in these insects. The aim of this review is to present in a simple way the basis of cognitive experiments using bees as a model, describing classical protocols, new approaches and empiric studies showing how bee training can be applied to different questions on pollination biology.

Keywords: perception, learning, memory, behavior, cognition

Introdução

A polinização é um dos processos ecológicos mais importantes na natureza, consistindo na transferência de grãos de pólen (gametófitos masculinos) das anteras para o estigma das flores, dando início ao processo de fertilização dos óvulos (que portam os gametófitos femininos), e subsequente produção de frutos e sementes (Willmer 2011, Rech *et al.* 2014a). De maneira mais abrangente, a polinização consiste em um importante serviço ecossistêmico, uma vez que um terço dos principais produtos agrícolas consumidos depende em algum nível desse processo (Maués 2014), além de estar intrinsecamente ligada a manutenção dos sistemas naturais que proporcionam qualidade de vida.

O processo de transferência do pólen pode ocorrer de diversas maneiras, por meio de vetores abióticos, como o vento e a chuva (Rech *et al.* 2014b), ou, mais comumente, por vetores bióticos: animais que ao visitarem as flores em busca de recursos florais (e.g. néctar), coletam direta ou indiretamente os grãos de pólen, carregando-os até as próximas flores visitadas (Rech *et al.* 2014a). Dentre os vetores bióticos encontram-se diversos grupos de animais, como beija-flores, borboletas, vespas, moscas e abelhas (Rech *et al.* 2014a). Estima-se que 87% das plantas com flores do globo dependem desses animais para produção de sementes e nos trópicos esse número pode ser maior que 90% (Ollerton *et al.* 2011, Rech *et al.* 2016). Dentre os diferentes grupos, as abelhas merecem destaque como agentes bióticos de polinização, uma vez que a grande maioria se alimenta exclusivamente dos recursos florais. Essa dependência propiciou o surgimento de adaptações evolutivas, refletidas na morfologia e no comportamento desse grupo de insetos (Pinheiro *et al.* 2014).

As abelhas apresentam uma variedade de capacidades sensoriais e cognitivas nas quais a percepção, o aprendizado e a memória tem importante papel no processo de busca por alimento nas flores (Giurfa 2007, Melo *et al.* 2018). Esses insetos identificam as fontes de alimento utilizando os sinais emitidos pelas flores, chamados de atrativos florais, como cores e fragrâncias, e aprendem a associar tais sinais com a presença ou ausência de recurso (Giurfa 2007, Brito *et al.* 2014). Quando o recurso compensa o esforço da visita (distância percorrida entre recurso e ninho, tempo de manipulação da flor, etc.), as abelhas estabelecem uma rota de forrageamento para explorar o recurso, permanecendo assim até que a necessidade da prole (pólen e néctar) e/ou do indivíduo (néctar) seja saciada ou mesmo até o fim da florada (Chittka *et al.* 1999). Dada essa relação de dependência, as abelhas são interessantes modelos para entender o papel da sinalização floral e cognição animal no processo de polinização.

O entendimento da relação entre a capacidade sensorial e cognitiva das abelhas com os sinais e recursos florais começou há mais de um século, com o experimento pioneiro de Karl von Frisch (1914). Para demonstrar a capacidade visual e cognitiva em abelhas, Karl von Frisch treinou indivíduos de *Apis mellifera* para coletar uma solução açucarada associada a um estímulo colorido – um pedaço de cartolina azul. Através deste simples experimento associativo, von Frisch demonstrou que as abelhas eram capazes de (1) aprender a associar o estímulo com o recurso oferecido, (2) identificar o estímulo quando na presença de um conjunto de outros estímulos de mesmo tamanho, porém em vários tons de cinza (i.e. acromáticos), demonstrando de maneira inédita que elas selecionavam o estímulo baseadas em sinais visuais coloridos (pois selecionaram o único estímulo cromático disponível), independentemente da intensidade e posição espacial (Frisch 1914, Chittka *et al.* 2014). Esse

experimento permaneceu “esquecido” até meados do século XX, quando pesquisadores europeus reviveram o programa científico de entender os processos cognitivos em abelhas (Dyer *et al.* 2015). Ainda assim, muitos dos testes empregados para explorar aspectos cognitivos da relação entre flores e visitantes florais foram de fato modificações do projeto inicial de von Frisch (Chittka *et al.* 2014). Hoje, após décadas de experimentos e do estabelecimento das abelhas como um ótimo modelo de estudo de aprendizado e memória, sabemos que esses insetos possuem um diverso repertório cognitivo, sendo capazes de realizar tarefas que por muito tempo eram conhecidas apenas como realizáveis por vertebrados, incluindo humanos (Giurfa 2007).

As abelhas, especialmente as sociais, podem ser facilmente criadas em cativeiro e treinadas para experimentos de aprendizado e memória (Giurfa 2007). Ainda, há a vantagem de ser possível manipular tanto os estímulos como os recursos, pois ambos se encontram no mesmo alvo que as abelhas buscam: as flores. De fato, o treinamento de abelhas pode ser uma atividade simples podendo ser realizado por crianças em atividades escolares (Blackawton *et al.* 2011). Apesar de a maior parte desses estudos utilizar poucas espécies como modelo, principalmente abelhas sociais dos gêneros *Apis* e *Bombus* (Chittka & Thomson 2001, Weiss 2001), estudos recentes tem revelado que outras abelhas, como as do grupo das Meliponini, tem capacidades cognitivas interessantes e também podem ter seus indivíduos facilmente treinados em experimentos de comportamento (Henske *et al.* 2015, Koethe *et al.* 2016, Balamurali *et al.* 2018).

Nessa revisão, mostramos os conceitos básicos que devem ser considerados em estudos sensoriais e cognitivos com abelhas. Ainda, descrevemos como devem ser pensados e estruturados alguns dos principais experimentos no contexto da biologia da polinização, revelando como essa abordagem é importante para entender o processo de polinização pela perspectiva dos polinizadores e suas consequências para as plantas.

Material e métodos

Foi realizada uma pesquisa na literatura guiada pelo tema cognição e condicionamento de abelhas. Foram selecionados artigos teóricos e experimentais sobre o assunto, assim como livros texto, além de trabalhos sobre biologia da polinização com perguntas respondidas utilizando as metodologias de ecologia cognitiva e treinamento de abelhas. A pesquisa foi feita de forma não sistemática entre junho de 2018 e janeiro de 2019 em bases de dados online como *Web of Science* e *Google Scholar*.

Cores e fragrâncias: os principais sinais florais

O primeiro passo do pesquisador que deseja estudar a cognição das abelhas no contexto da polinização é entender que os sinais florais não evoluíram em resposta ao sistema sensorial e cognitivo dos humanos. Estes sinais são resultado da interação entre as flores e seus visitantes e, portanto, do sistema sensorial e cognitivo destes. A regra geral é que a relevância dada a cada atributo atuando como sinalizador pelas flores estará estruturado dentro de um contexto, no qual o interagente e o ambiente podem representar forças seletivas (Telles *et al.* 2017, Bergamo *et al.* 2018). Como os polinizadores não percebem os sinais florais da mesma forma que os humanos, é necessário considerar esse aspecto tanto na interpretação de observações de campo, como em experimentos cognitivos (Brito *et al.* 2014).

Existem muitos atrativos florais que atuam na comunicação entre flores e polinizadores, como a forma, a cor das estruturas florais, e a fragrância das flores (Wester & Lunau 2017, Melo *et al.* 2018). As cores das flores representam um dos sinais mais conspícuos para a maioria dos visitantes florais, uma vez que podem ser percebidas de forma rápida e à longa distância, permitindo que os animais obtenham informações sobre a fonte de alimento mesmo antes de visitarem as flores (Wester & Lunau 2017). O sistema visual das abelhas é composto por três ocelos, também chamados de olhos simples, responsáveis pela percepção de intensidade e direção da luz, e por seus olhos compostos, consistindo de centenas de pequenas unidades conhecidas como omatídeos que permitem a formação de imagens e a visão em cores (Stavenga 1992, Land & Nilsson 2002). A maioria das abelhas estudadas possui visão tricromática (ou seja, com três tipos de fotorreceptores), com picos de excitação nas faixas do ultravioleta, azul e verde (Briscoe & Chittka 2001).

Dado o volume de informação sobre a morfologia, fisiologia, comportamento e sistema neuronal para as espécies modelo de abelhas (*Apis mellifera* e *Bombus* spp.), foi possível o desenvolvimento de diferentes modelos matemáticos de visão para as abelhas. Estes modelos nos permitem inferir a maneira como as abelhas enxergam as cores/padrões das flores (Gawryszewski 2017). Se o pesquisador deseja utilizar a cor como principal estímulo em seus experimentos de aprendizado e memória, esses modelos são essenciais para, em uma análise prévia, determinar se o estímulo utilizado é compatível com a cor da flor na natureza. De modo geral, estes modelos necessitam de quatro inputs básicos: a refletância do objeto que se deseja modelar a cor, as sensibilidades espectrais da espécie da qual se deseja modelar a visão (de cada tipo de fotorreceptor), a refletância do plano fundo no qual o objeto está contrastado, e a iluminação do ambiente (Gawryszewski 2017).

Apesar dos modelos nos darem uma noção da percepção das cores pelas abelhas, é importante notar que a intensidade e forma de condicionamento podem também melhorar a discriminação de cores pelas abelhas (Giurfa 2004). Além disso, como cada tipo de modelo matemático diverge em suas premissas, o uso de um ou outro modelo deve ser cuidadosamente aplicado e justificado pelo pesquisador (Kemp *et al.* 2015, Gawryszewski 2017). Portanto, estes modelos servem como uma primeira aproximação das capacidades visuais dos polinizadores; além disso, seu uso também é interessante quando não é possível fazer experimentos comportamentais detalhados (e.g. quando se trabalha com um número elevado de espécies vegetais; Bergamo *et al.* 2018, Aguiar & Pansarin 2019).

Diferentemente dos sinais visuais que são percebidos de maneira mais direta a distâncias proximais consideráveis, a percepção da fragrância depende da dispersão pelo vento, podendo sofrer diluições e misturas com outras fragrâncias no ambiente até chegar ao polinizador (Wester & Lunau 2017). As fragrâncias são combinados de diversos compostos voláteis, que geralmente formam uma mistura única em cada espécie, a qual também pode variar entre indivíduos de uma população (Salzmann *et al.* 2007, Raguso 2008, Baldelomar *et al.* 2018). Por haver essa grande variação, a fragrância pode ser utilizada pelo polinizador como uma forma de identificar flores específicas (Raguso 2008). As abelhas percebem as fragrâncias por meio de sensores químicos nas antenas, que estão conectados ao lobo antenal, principal região codificadora das informações de olfato no cérebro desses insetos (Giurfa 2007). Não existe, ainda, um modelo de percepção de fragrâncias como os existentes para percepção de cores. No entanto, experimentos cognitivos mostram que as abelhas são capazes de discriminar compostos voláteis e até mesmo misturas de compostos que variam em proporções ou identidades de um ou mais componentes (Raguso 2008).

O papel das preferências inatas na escolha dos estímulos

As abelhas, assim como outros animais, possuem preferências por certos estímulos que não foram aprendidas ao longo de sua vida, sendo chamadas de inatas. Essas preferências foram descobertas a partir de experimentos em que abelhas inexperientes (também chamadas de *naïve*), ou seja, que nunca tiveram contato com os estímulos a serem testados, exibiram respostas intensas não-aleatórias de preferência. Pela dificuldade de criar abelhas sem contato com estímulos olfativos, uma vez que a própria colônia é um ambiente de exposição a diversos odores, incluindo feromônios, experimentos de preferência inata são comumente realizados apenas com estímulos visuais. Por meio de experimentos de respostas inatas, foi descoberto por exemplo que *Apis mellifera* possui preferência por flores azul-ultravioleta e

verdes (Giurfa *et al.* 1995). É importante lembrar que o sistema visual das abelhas é diferente do nosso, então uma flor violeta para as abelhas não necessariamente representa o que conhecemos como violeta. De forma semelhante, foi descoberto que *Bombus terrestris* possui preferência inata por sinais visuais bilateralmente simétricos (Rodríguez *et al.* 2004). Além disso, as preferências inatas devem ser consideradas em experimentos de aprendizado e memória pois, apesar de poderem ser suprimidas pelo aprendizado, em alguns casos elas influenciam nas escolhas de abelhas experientes, isto é, que já passaram por algum processo de treinamento associativo (Gumbert 2000).

O papel do aprendizado e as bases do condicionamento

Existem diferentes protocolos de condicionamento de abelhas. Nesta revisão focaremos apenas no condicionamento apetitivo, pois a interação entre flores e polinizadores geralmente se dá por meio da busca de alimento pelos visitantes florais.

O aprendizado associativo é a capacidade dos animais em extrair e associar as informações do ambiente no qual estão inseridos, estabelecendo uma relação de predição (Giurfa 2007). Isso difere da preferência inata do polinizador em que não existe um aprendizado associativo e, portanto, não se estabelece uma predição. Por exemplo, o aprendizado associativo seria a capacidade cognitiva dos polinizadores em associar um atrativo floral (e.g. cor), com a presença de néctar e a partir disso prever que o sinal floral representa o recurso desejado. Existem duas formas de testar o aprendizado associativo: através do condicionamento clássico (Pavlov 1927), no qual o animal aprende a associar um determinado sinal (estímulo condicionado, EC) com uma recompensa (estímulo não condicionado, ENC), a partir de uma resposta inata; e através do condicionamento operante (Skinner 1938), em que a recompensa só é disponibilizada ao animal após uma mudança em seu comportamento. Essas duas formas de condicionamento podem ser atingidas em dois tipos de abordagens: o condicionamento absoluto, no qual o animal é treinado com apenas um estímulo condicionado (EC+) seguido de recompensa (ENC); e o condicionamento diferencial, no qual o animal é apresentado a dois estímulos, um associado a uma recompensa (EC+) e um sem a recompensa ou com uma punição, como solução de quinina, substância de sabor aversivo para as abelhas (EC-). A apresentação de punição ao animal pode melhorar o processo de discriminação entre estímulos, pois os custos de uma resposta errada são maiores (de Brito Sanchez *et al.* 2015). Assim, no condicionamento diferencial, o animal deve associar um sinal à recompensa enquanto que o outro sinal está associado a ausência de recompensa ou punição.

Qualquer experimento básico de aprendizado e memória em abelhas (seja clássico ou operante; absoluto ou diferencial) consiste em duas fases. Na primeira, denominada fase de aquisição ou treinamento, o animal é apresentado ao EC que é reforçado pelo ENC. O período de treinamento dependerá principalmente do estímulo (conspicuidade, atratividade) e/ou recompensa (quantidade, qualidade) (Menzel *et al.* 2001). Na segunda fase, a de teste, a abelha é novamente apresentada ao EC, mas também a outros cenários possíveis, dependendo do experimento. Em um deles, o EC agora estará desassociado do ENC. Nessa fase, a retirada da recompensa está associada com a eliminação de possíveis pistas, como por exemplo químicas (como odor do néctar, ou marcas deixadas pela própria abelha), restringindo a avaliação unicamente a associação estabelecida entre as variáveis de interesse durante o treinamento (Matsumoto *et al.* 2012). Em outro possível cenário, um novo estímulo pode ser apresentado em conjunto ao EC, para estudar as capacidades de discriminação, quando o animal responde de forma diferente a estímulos diferentes, ou então a generalização, quando o animal trata como equivalentes estímulos diferentes (Guerrieri *et al.* 2005, Aguiar *et al.* 2018). Ou ainda, pode-se remover do teste o EC no qual a abelha foi originalmente treinada e apresentar um novo estímulo, para se avaliar a transferência e a flexibilidade cognitiva das abelhas (Giurfa *et al.* 2001). Generalização e a transferência são fenômenos que promovem economia cognitiva, uma vez que permite uma resposta adaptativa a novos objetos no ambiente (Stach & Giurfa 2005). No caso da polinização, por exemplo, as abelhas podem usar estímulos aprendidos em uma visita à uma flor e transferir esse aprendizado para escolher outras flores semelhantes a serem visitadas no ambiente natural.

Diversos materiais podem ser usados como ECs. No caso de experimentos de visão, podem ser utilizados desde papéis coloridos (Giurfa *et al.* 2001, Blackawton *et al.* 2011) até fontes de luz controladas em seu pico de emissão espectral (Vieira *et al.* 2018). Em experimentos de condicionamento olfativo, geralmente são utilizados compostos comerciais puros (Matsumoto *et al.* 2012), mas também podem ser utilizados extratos de fragrância floral como EC (Locatelli *et al.* 2016). Já o ENC em condicionamento apetitivo deve ser um estímulo biologicamente relevante, que promova uma resposta inata de alimentação à abelha, sendo geralmente utilizada a solução de sacarose 50% (Matsumoto *et al.* 2012). Estudos recentes também têm utilizado pólen como ENC (Nicholls & Hempel de Ibarra 2017). A qualidade do ENC (concentração de sacarose na solução, por exemplo) também pode ser utilizada como variável no experimento para testar as capacidades cognitivas das abelhas. Gruter *et al.* (2011) mostraram que o aumento da qualidade do recurso aumenta a porcentagem de visitas corretas ao estímulo treinado. No entanto, é importante ressaltar que

utilizando solução de sacarose como ENC, concentrações muito diluídas (<15%) não são apropriadas, pois atrapalham a motivação apetitiva das abelhas, assim como soluções muito concentradas (>60%) aumentam a viscosidade da solução e dificultam a ingestão pelos animais (Matsumoto *et al.* 2012).

Como acessar aprendizado e memória nas abelhas

A grande vantagem ao se usar abelhas é a possibilidade de treiná-las individualmente em diversos desenhos experimentais. Isso é importante, uma vez que aprendizado e memória se dão a partir da experiência do indivíduo (Giurfa 2007). Outra premissa importante, principalmente nos experimentos nos quais as abelhas estão imobilizadas, é a restrição alimentar. Controlar a alimentação das abelhas antes do treinamento é de extrema importância para manter a abelha em boas condições, mas ao mesmo tempo com motivação apetitiva para completar o experimento (Matsumoto *et al.* 2012). Além disso, é importante lembrar que abelhas sociais possuem diferentes castas e, para estudos de polinização, devem ser usadas apenas abelhas forrageiras, que de fato visitam as flores em busca de alimento. Abelhas de outras castas, como as abelhas-guarda por exemplo, podem apresentar baixa motivação apetitiva e diferentes respostas nos experimentos (Ray & Ferneyhough 1999, Matsumoto *et al.* 2012).

Existe uma diversidade de variáveis resposta que podem ser mensuradas nos diferentes tipos de experimentos. Abelhas podem responder ao EC por aproximação ou pouso (medidas mais comuns de serem tomadas; Giurfa *et al.* 2001). Ou então, pode-se medir a antenação, isto é, quando a abelha toca o EC com as antenas antes de pousar (uma forma de reconhecimento do estímulo nestes insetos; Lunau *et al.* 2006). Ainda, há a vibração do tórax, que está relacionada à comunicação sobre a qualidade de alimento às outras abelhas da colônia (Hrncir *et al.* 2004), e a extensão da probóscide (que indica uma resposta apetitiva forte; Matsumoto *et al.* 2012). A seguir explicaremos as bases de dois protocolos de condicionamento apetitivo que são úteis em questões de polinização.

Resposta da Extensão da Probóscide

Quando se toca a antena de uma abelha com fome com uma solução de sacarose, ela demonstra uma resposta inata de extensão da probóscide para se alimentar do açúcar (Fig. 1A; Giurfa 2007). Baseado neste tipo de resposta, Takeda (1961) desenvolveu um protocolo de condicionamento clássico, denominado Resposta da Extensão da Probóscide (REP) (*Proboscis Extension Response*). Nesse protocolo a abelha aprende a associar um determinado

estímulo com a disponibilidade de alimento. Os estímulos químicos funcionam de maneira excelente no condicionamento olfativo (Matsumoto *et al.* 2012), mas também é possível realizar experimentos de REP com estímulos visuais (Vieira *et al.* 2018). No entanto, com estímulos visuais, a resposta das abelhas não é tão eficiente nesse protocolo, por diversos motivos (revisados em Avarguès-Weber & Mota 2016). O protocolo de REP também pode ser realizado utilizando uma mistura de canais sensoriais. Ruedenauer *et al.* (2018) mostraram que apenas com o canal olfativo, as abelhas não conseguem distinguir entre as fragrâncias dos grãos-de-pólen de flores de amendoeiras e macieiras. No entanto, quando o odor é apresentado ao mesmo tempo que se permite o toque no pólen com as antenas (canal quimiotátil), as abelhas foram capazes de diferenciar o pólen das duas plantas. O protocolo de condicionamento com a abelha imobilizada ainda permite investigar as bases neurais do aprendizado e da memória, pois dessa forma é possível o acesso ao cérebro do animal simultaneamente à apresentação do estímulo (Rath *et al.* 2011).

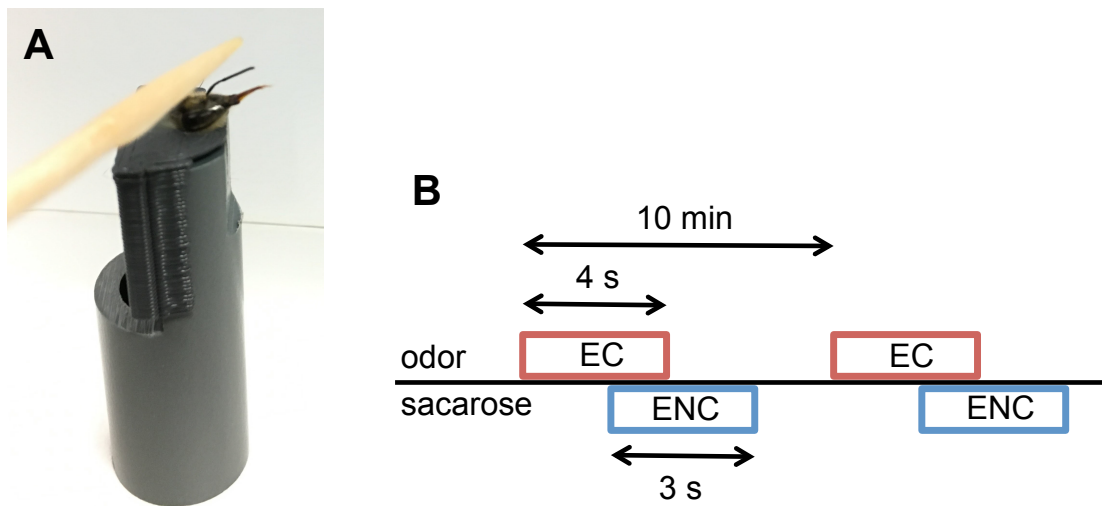


Fig. 1. Resposta da extensão de probóscide (REP). (A) Indivíduo de *Apis mellifera* imobilizado em tubo de plástico. Na figura vemos um palito de dente embebido em solução de sacarose tocando a antena da abelha, o que desencadeia a resposta inata da extensão da probóscide. (B) Esquema básico do condicionamento no protocolo REP. O condicionamento consiste no pareamento de quatro segundos de apresentação do estímulo condicionado (EC; odor; retângulos vermelhos) e a subsequente apresentação do estímulo não condicionado por três segundos (ENC; sacarose; retângulos azuis), com um segundo de sobreposição. Após dez minutos o mesmo indivíduo passa por um novo pareamento, e o processo pode ser repetido por quantas vezes o pesquisador achar necessário antes da fase de teste.

Usando como exemplo o condicionamento olfativo, um odor neutro apresentado sem a recompensa não desencadeia o reflexo da extensão de probóscide. No entanto, se o odor é apresentado imediatamente antes da disponibilização da recompensa, uma associação é

formada entre odor (EC) e a solução de sacarose (ENC). Isso permite que o odor sozinho possa desencadear a REP em um teste subsequente ao treinamento (Giurfa 2007, Matsumoto *et al.* 2012).

Para o bom funcionamento desse protocolo, as abelhas devem ser imobilizadas (Fig. 1A), de forma que possam mover apenas as antenas e as peças bucais (veja Matsumoto *et al.* 2012 para detalhes). As abelhas imobilizadas devem ser mantidas sem alimentação de duas a três horas antes do início do condicionamento para assegurar motivação apetitiva. Nesse período a abelha deve ser mantida em um local calmo, escuro e úmido, como uma estufa de temperatura controlada (Matsumoto *et al.* 2012).

Como controle, deve ser assegurada a ausência de respostas ao EC antes do condicionamento, confirmando que o estímulo é neutro à abelha. Também deve-se quantificar as respostas ao ENC antes e após o experimento, para assegurar que o animal possui a resposta não condicionada mesmo após a manipulação. Abelhas que não apresentem REP durante o teste controle ao ENC devem ser removidas do experimento, uma vez que podem gerar falsos negativos (Giurfa 2007).

No protocolo básico de condicionamento absoluto de REP, que pode ser adaptado de acordo com a pergunta ou com o animal modelo utilizado, a fase de aquisição ocorre da seguinte forma: a abelha imobilizada é mantida por 25 segundos para adaptação ao local do condicionamento, posicionada em frente de um exaustor que impede a acumulação de odores (tanto EC quanto feromônios que podem ser liberados pelo animal). Após esse período, é apresentado o EC ao animal por quatro segundos com a subsequente apresentação do ENC por três segundos (com um segundo de sobreposição) (Fig. 1B). Após o pareamento EC-ENC a abelha é mantida por mais 25 segundos no local do condicionamento. Todo o processo dura cerca de um minuto. Para um condicionamento de múltiplas repetições, é recomendado um intervalo entre repetições de dez minutos, ou seja, podem ser treinadas até dez abelhas por experimento utilizando esse protocolo (Matsumoto *et al.* 2012). Vale ressaltar, que o tempo de cada etapa é ajustável dependendo das condições do laboratório, as perguntas em questão e o modelo animal escolhido.

Na fase teste, o intervalo de duração após o condicionamento depende da pergunta do investigador, que pode testar memórias de curto prazo (teste imediatamente após o condicionamento), médio prazo (teste após uma hora do condicionamento, por exemplo) ou longo prazo (até 72 horas após o condicionamento). Para testes após longos intervalos, o investigador deve alimentar as abelhas para evitar a morte por inanição. O teste deve ser feito com o EC e ao menos mais um estímulo novo não condicionado anteriormente, apresentados

separadamente, funcionando como um controle se a abelha aprendeu a responder apenas ao EC (Matsumoto *et al.* 2012). Respostas ao estímulo novo podem, no entanto, fornecer interessantes resultados sobre a capacidade de generalização das abelhas (Guerrieri *et al.* 2005).

Para condicionamento diferencial usando esse protocolo, os EC+ e EC- devem ser apresentados um de cada vez, com a mesma quantidade de repetições, de forma randomizada. Para o EC-, pode ser utilizada a ausência de solução de sacarose no lugar do ENC, ou ainda, substâncias de gosto desagradável para as abelhas. Recomenda-se solução concentrada de cloreto de sódio (NaCl) nesses casos (de Brito Sanchez *et al.* 2015). A apresentação de EC às abelhas, no caso do condicionamento olfativo, pode ser feita de forma precisa, com aparelhos controlados por microcomputadores (Szyszka *et al.* 2014), o que permite um melhor controle experimental, mas também pode ser feita de forma mais simples e acessível e com resultados confiáveis, utilizando seringas contendo um pedaço de papel filtro embebido no odor (Matsumoto *et al.* 2012).

Abelhas em livre voo

Apesar do protocolo de REP mostrar resultados consistentes e robustos (Matsumoto *et al.* 2012), alguns pesquisadores argumentam que ele pode limitar as respostas comportamentais das abelhas, uma vez que o animal está imobilizado. Numa tentativa de contornar tal problema, experimentos com abelhas em livre voo podem ser realizados. No entanto, testes com estímulos voláteis, como odores, podem ser difíceis de serem apresentados nesse protocolo, pois podem se misturar no ambiente experimental. Além disso, experimentos em livre voo também possuem complicações, como a duração, podendo uma seção experimental ser bem mais longa em comparação ao protocolo de REP.

O experimento de livre voo é considerado essencialmente um condicionamento operante, já que a abelha deve alterar seu comportamento (visitar o estímulo correto) para obter a recompensa. No entanto, a associação entre EC e ENC nesse caso podem ser consideradas um misto de clássico e operante, pois a abelha pode vincular o EC diretamente ao ENC (condicionamento clássico) e simultaneamente modificar seu comportamento de escolha entre diferentes estímulos ao ENC (condicionamento operante) (Giurfa 2007).

Para o condicionamento em livre voo os indivíduos a serem testados devem ser individualizados, através de marcações como, por exemplo, um esquema de cores com tinta atóxica no tórax (Fig. 2B), ou *tags* plásticos numerados aderidos ao tórax, facilitando a identificação das respostas ao nível do indivíduo. O treinamento pode ter início de diversas

formas como, por exemplo, com o uso de um alimentador contendo solução de sacarose, posicionado próximo à colônia (Fig. 2A). A medida que as abelhas visitam o alimentador naturalmente, o investigador deve afastar pouco a pouco o alimentador até o local do experimento (Roselino *et al.* 2016). É importante ressaltar que o alimentador não pode conter estímulos semelhantes ao que serão testados, e no melhor nos casos, deve ser neutro quanto à sua coloração (transparente). Sugere-se utilizar um copo de vidro com solução de sacarose entornado sobre uma placa de acrílico com vincos, permitindo que a solução esteja ao alcance das abelhas de forma gradual (Fig. 2A). Durante o condicionamento, o intervalo entre repetições dependerá da distância do local do experimento até a entrada da colônia. Para uma distância de 100 metros, abelhas motivadas demoram de dois a dez minutos entre viagens (Giurfa 2007).

Pode-se realizar tanto condicionamento absoluto como o diferencial com abelhas em livre voo. No entanto, diferentemente do protocolo de REP no condicionamento diferencial com abelhas em livre voo, ambos EC+ e EC- são apresentados simultaneamente no teste. Já o número de repetições é relativo ao número de viagens da abelha, e não mais ao número de apresentações do EC como para o condicionamento de REP. Sugere-se dez repetições de treinamento, com a fase teste sendo realizada logo após o condicionamento. Diversos comportamentos podem ser utilizados como variável resposta, como antenação no alvo ou pouso do animal (Giurfa 2007).

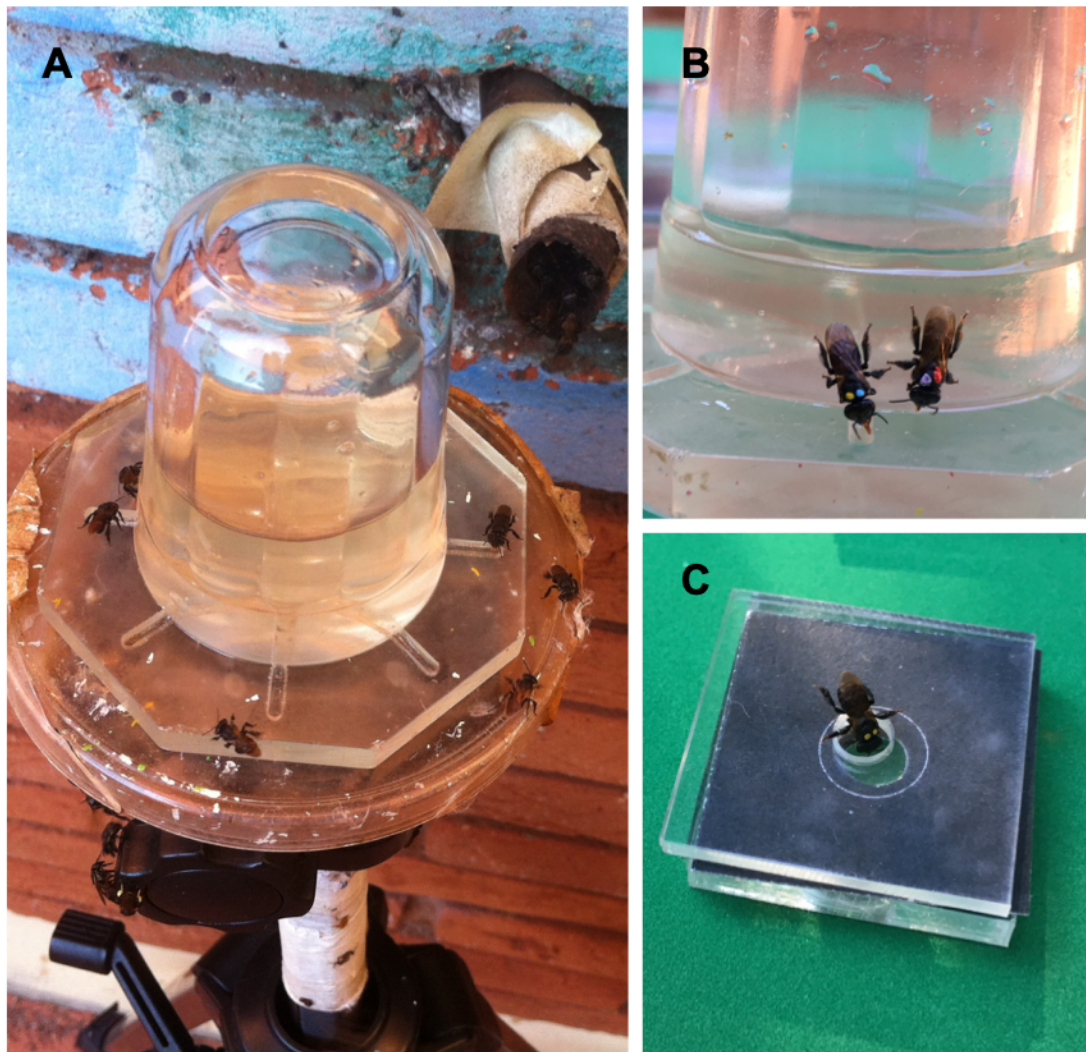


Fig. 2. Treinamento de abelhas em livre voo. (A) Alimentador de gravidade posicionado em frente à entrada de uma colônia de *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Meliponini). O alimentador consiste em um copo de vidro com solução de sacarose, sobre uma placa de acrílico com vincos por onde as abelhas podem acessar o alimento. (B) Abelhas, marcadas no tórax com tinta acrílica, no alimentador de gravidade. (C) Exemplo de uma flor artificial que pode ser utilizada em condicionamentos em livre voo. A flor consiste em uma base de acrílico com uma cavidade na qual é colocada a solução de sacarose. Sobre essa base, é posicionado o estímulo, no caso um quadrado de papel cinza, e sobre o estímulo é posicionada uma lâmina de acrílico perfurada. A lâmina deve ser trocada a cada visita e limpa após o experimento para evitar a influência de possíveis marcas de odor (feromônios) deixadas pela abelha.

A instalação experimental pode ser realizada de diversas maneiras (Lehrer *et al.* 1995, Stach & Giurfa 2005). Aqui explicaremos duas das várias formas de condicionamento visual existentes. A primeira consiste na utilização de flores artificiais que podem ser dispostas sobre o local do experimento. Uma flor artificial pode ser construída em base de acrílico com cavidade que permita o oferecimento de solução de sacarose. Sobre a base, se posiciona um papel colorido furado e sobre o papel se posiciona uma lâmina de acrílico perfurada (Roselino *et al.* 2016) (Fig. 2C). O propósito dessa lâmina de acrílico é evitar o acúmulo de possíveis marcas de feromônio deixadas pelas abelhas. Assim, a lâmina de acrílico deve ser trocada

após cada visita e toda a estrutura de acrílico da flor artificial deve ser limpa com álcool após o experimento (Roselino *et al.* 2016).

Outra forma de instalação experimental é o labirinto em Y (Fig. 3). Nesse caso, a abelha é treinada a entrar em uma câmara de dois braços unidos por um corredor. O material para confecção varia, podendo ser acrílico ou madeira. No corredor existe uma abertura à frente de uma porta deslizante, que é fechada após a passagem da abelha, permitindo o treinamento individual (Giurfa *et al.* 2001, Stach & Giurfa 2005). Geralmente, em apenas um dos braços está o estímulo com recompensa, enquanto que no outro braço, outro estímulo é apresentado mas nada é oferecido como recompensa (condicionamento diferencial). Ainda, para evitar o uso de possíveis pistas químicas provenientes do néctar ou pólen, na fase de teste, ambos braços, e, portanto, estímulos, podem estar desprovidos de recurso. O labirinto em Y permite controlar a distância do estímulo ao ponto de decisão da abelha (área de encontro do corredor com os dois braços onde a abelha enxerga simultaneamente os dois estímulos) (Giurfa *et al.* 1996). A um ângulo de visão menor (dada através da maior distância do animal ao estímulo), as abelhas utilizam apenas o fotorreceptor verde para identificar um objeto enquanto que, a uma distância menor, todos os fotorreceptores são ativados e as abelhas utilizam visão em cor para identificar um objeto (Giurfa *et al.* 1996). Essa relação tem implicações diretas em questões de biologia da polinização como será exposto na próxima seção.

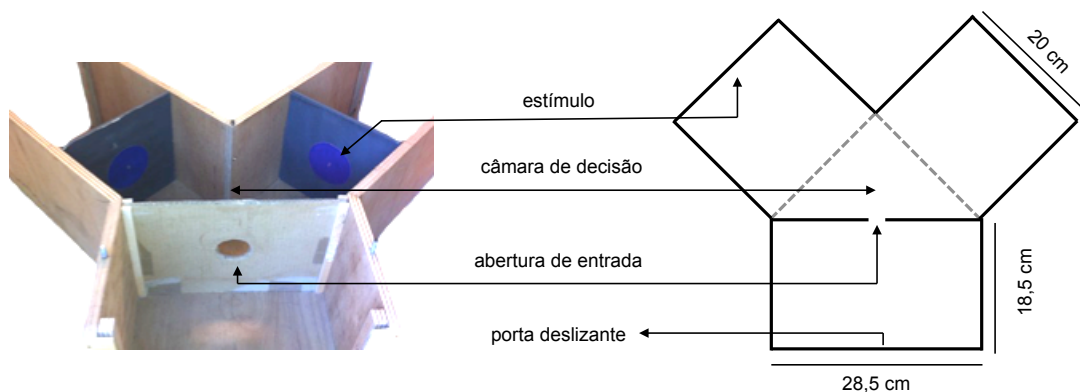


Fig. 3. Exemplo de um labirinto em Y para condicionamento em livre voo. A abelha pode ser treinada a entrar no labirinto no qual cada braço apresenta um estímulo na parede ao fundo. Geralmente, apenas um dos estímulos recebe a solução de sacarose. A distância entre os estímulos e a câmara de decisão pode variar, para avaliar o efeito do ângulo de visão do polinizador no condicionamento. Foto: Paul Marchal. Dimensões do esquema baseadas em Stach & Giurfa (2005).

Aplicações nos estudos de biologia da polinização

O caso dos isômeros das fragrâncias florais

A fragrância floral geralmente inclui vários compostos voláteis, com grande variação entre espécies e até entre indivíduos de uma mesma população. Por exemplo, muitas orquídeas polinizadas por engano de alimento apresentam variação intraespecífica destes compostos. Parte dessa variação é devido a presença de isômeros (Salzmann *et al.* 2007, Dormont *et al.* 2014), ou seja diferentes conformações estruturais ou espaciais de uma mesma molécula (IUPAC, <http://goldbook.iupac.org>). A hipótese de Heinrich (1975) postula que esta variação intraespecífica em flores polinizadas por engano seria uma estratégia adaptativa, pois seria mais difícil para os polinizadores aprenderem a associar os estímulos florais com a ausência de recursos quando a informação atrativa é altamente variável. Em outras palavras, os polinizadores demorariam mais para aprender a evitar essas flores, pois teriam que associar todos os estímulos possíveis à ausência de recurso. Por consequência, estas flores teriam maior taxa de visitação quando comparadas a outras flores de engano, mas que não apresentam variação. Dessa forma, apresentar diferentes isômeros na fragrância floral poderia atuar nessa interferência no aprendizado dos polinizadores. No entanto, o primeiro passo é saber se os polinizadores conseguem diferenciar tais isômeros.

Essa foi a pergunta central do estudo de Aguiar *et al.* (2018). Investigando a fragrância floral de *Ionopsis utricularioides*, uma orquídea muito comum no Brasil que é polinizada por engano de alimento Aguiar & Pansarin (2019), encontraram grande variação intraespecífica oriunda, também, pela presença de isômeros da mesma molécula. Assim, selecionaram quatro pares de isômeros presentes nas fragrâncias de várias orquídeas polinizadas por engano de alimento, incluindo *I. utricularioides* e, utilizando o protocolo de REP, testaram a capacidade de discriminação entre essas moléculas (que atuaram como EC) por *Apis mellifera*. Em condicionamento absoluto as abelhas não conseguiram diferenciar isômeros. Porém, em condicionamento diferencial (o qual promove melhor discriminação entre estímulos; Avarguès-Weber & Giurfa 2014), as abelhas diferenciaram alguns pares de isômeros. Porém, a taxa de generalização entre estímulos foi sempre muito alta. Ou seja, mesmo quando há diferenciação, as abelhas ainda respondem muito ao isômero treinado como EC-, sendo o ENC a ausência de solução de sacarose ou a presença de solução concentrada de NaCl.

Assim, Aguiar *et al.* (2018) mostraram que as abelhas conseguem discriminar pares de isômeros em algumas situações experimentais específicas, mas a tendência é que ocorra generalização entre essas moléculas. Num contexto de polinização em condições naturais, seria difícil para uma abelha discriminar tais compostos e utilizá-los como preditores de presença ou ausência de recurso. A hipótese de Heinrich (1975), no entanto, não pode ser refutada por esse trabalho. Outros atributos florais também variam em flores polinizadas por

engano de alimento (Jullet & Scopece 2010) e a cognição dos polinizadores frente à essas variações deve ser levada em consideração.

O caso da mudança de cor floral

Em muitas plantas ocorre mudança de cor da flor ao longo da antese associada a manutenção de flores velhas. Estas flores velhas geralmente estão desprovidas de recurso e não são visitadas pelos polinizadores. Existem duas principais hipóteses não excludentes e intrinsecamente associadas para explicar tal fenômeno (Weiss 1991): a hipótese de longa distância diz que a mudança de cor floral e a manutenção de flores velhas torna o display floral maior e mais atrativo visto de longe. Por outro lado, a hipótese de curta distância diz que, visto de perto, as diferentes cores direcionam os polinizadores para as flores mais novas, diminuindo as visitas supérfluas em flores velhas e não receptivas e otimizando o processo de polinização. Para que essas duas hipóteses sejam corroboradas, a mudança de cor entre flores não deve ser percebida de longe (pois as abelhas poderiam prever que o maior display não significa maior oferta de recurso) ao mesmo tempo que deve ser percebida e discriminada de perto.

Essa hipótese foi testada para as flores de *Tibouchina pulchra*, uma planta comum da Mata Atlântica que muda a cor da flor de branco para rosa, utilizando-se modelos de visão em cor e experimentos em laboratório (Brito *et al.* 2015). Os modelos mostraram que, independentemente da cor, as flores possuem alta saturação, um parâmetro importante para escolha a longas distâncias. Já a curtas distâncias elas são discrimináveis pelas abelhas. Em laboratório, utilizando-se labirinto em Y, demonstrou-se que à longas distâncias as abelhas *naïve* preferem árvores artificiais com retenção de flores velhas que árvores sem retenção de flores velhas. Situação semelhante ocorre a curtas distâncias: as abelhas preferem mais um display de flores com cores diferentes que flores com cores iguais, mas com variação intrafloral na cor. Assim, ficou demonstrado que as hipóteses de longa e curta distâncias podem explicar ao mesmo tempo um fenômeno que ocorre em mais de 250 gêneros de plantas (Weiss & Lamont 1997).

O caso dos estímulos complexos e sua relevância na percepção das abelhas

As flores geralmente apresentam atrativos complexos, seja por meio de sinais multimodais (por exemplo, cor e odor) ou sinais multicomponente (por exemplo, formato, tamanho e cor) (Melo *et al.* 2018). Porém, a dinâmica de forrageamento das abelhas quando na presença de atrativos complexos é pouco entendida. Será que determinadas combinações

(estímulo visualmente saliente + odor; estímulo menos saliente + odor, e assim por diante) são redundantes ou têm efeito aditivo sobre os visitantes florais durante a atividade de forrageamento?

A maioria dos estudos em ecologia sensorial se concentra apenas em modalidades sensoriais simples para compreender o papel da cognição dos polinizadores e prever o comportamento de forrageio. Mas, para entender como as abelhas lidam com situações de complexidade do sinal, o papel de sinais florais complexos deve se tornar parte do desenho experimental. Este foi um dos objetivos do estudo de Telles *et al.* (2017). Os pesquisadores exploraram o papel de sinais florais complexos, multimodais (cor + odor) e multicomponentes (cor + tamanho), no comportamento de forrageamento de um polinizador generalista (*Bombus terrestris*). Para tal, treinaram abelhas de diferentes colmeias em uma situação de livre voo: as abelhas eram condicionadas a forragear em uma caixa de voo (5m x 2.5m) em condições seminaturais, no que se refere à iluminação e a complexidade do plano de fundo onde os estímulos eram apresentados.

De todos os estímulos considerados no estudo (cor, odor e tamanho), a cor foi o que influenciou fortemente o comportamento das abelhas durante a atividade de forrageamento. Apesar da ideia geral de que o sistema sensorial dos polinizadores e os sinais florais funcionam sinergicamente para aumentar a detecção de estímulos e a constância de visitas, os indivíduos testados no estudo nem sempre fizeram uso dos sinais complexos. O desempenho das abelhas procurando por flores menos conspícuas (vermelhas UV-absorventes) melhorou na presença de odor, enquanto a frequência de visitas a flores conspícuas (azul) na presença de odor não diferiu do tratamento usando as mesmas flores na ausência desse atrativo, indicando que quando o estímulo é visualmente saliente, a presença de um segundo sinal sensorial (odor) se torna irrelevante (Telles *et al.* 2017).

Novas abordagens

As abordagens clássicas de condicionamento são eficientes para entendermos os processos cognitivos das abelhas. No entanto, variações dessas abordagens tem sido propostas recentemente para aprimorar os experimentos e sugerir novas opções considerando algumas limitações. Uma das maiores dificuldades para realizar o protocolo de REP é a aparelhagem necessária em laboratório, que pode ser custosa e ocupar grande espaço. Além disso, a necessidade de manter as abelhas em colônias reduz a diversidade de espécies que podem ser utilizadas nesses experimentos. Muth *et al.* (2018) propõem um novo paradigma experimental de condicionamento visual de REP de baixo custo e que pode ser realizado no campo com abelhas selvagens. Nesse trabalho, os investigadores coletaram as abelhas em seu ambiente

natural e, individualmente, as posicionaram dentro de um tubo de acrílico, onde podiam caminhar livremente. Nesse tubo uma tira de papel colorida (EC) foi inserida, embebida em solução de sacarose (ENC), e a abelha podia dirigir-se até a tira e estender a probóscide para provar a recompensa. Em condicionamento absoluto a abelha foi apresentada a cinco repetições e cinco minutos após a última repetição, foram inseridas duas tiras de cores diferentes sem ENC, sendo uma das cores o EC. Pode ser realizado também condicionamento diferencial em que EC+ e EC- são apresentados em repetições separadas, como comumente realizado em experimentos de REP. As abelhas escolheram preferencialmente o EC, sendo os resultados compatíveis com aqueles obtidos em laboratório com o protocolo clássico de REP.

Em condicionamento de livre voo, as abelhas conseguem realizar tarefas complexas de discriminação de estímulos visuais, porém não é possível realizar análises que exploram as bases neurofisiológicas como se faz em abelhas imobilizadas (Avarguès-Weber & Mota 2016). No entanto, abelhas imobilizadas não possuem boa performance de discriminação visual no protocolo clássico de REP (Avarguès-Weber & Mota 2016). Buscando encontrar uma forma de obter bons resultados de discriminação visual e, ao mesmo tempo, manter a abelha em condições de análises neurofisiológicas, Buatois *et al.* (2017) desenvolveram um equipamento e protocolo de condicionamento visual em que a abelha fica imersa em uma realidade virtual. Nesse protocolo, a abelha fica presa por um fio aderido ao seu tórax e é posicionada sobre uma esfera de isopor que é suspensa por um fluxo de ar. A abelha, então, pode andar livremente rolando a esfera e esse movimento é capturado por sensores conectados a um projetor de imagens que projeta sobre uma tela semicircular em frente da abelha os EC+ e EC-. Conforme a abelha anda sobre a esfera, os sensores atualizam a posição dos estímulos na tela, criando um ambiente imersivo. Se as abelhas andam em direção ao EC+ até que ele fique no centro da tela, elas recebem a solução de sacarose. Utilizando esse protocolo, os pesquisadores conseguiram boa performance de discriminação visual em abelhas parcialmente imobilizadas que, assim, podem ser utilizadas em análises neurofisiológicas. Os resultados desses experimentos foram semelhantes aos obtidos utilizando o labirinto em Y (Buatois *et al.* 2018), mostrando que o novo protocolo de realidade virtual é tão eficiente quanto a abordagem clássica.

Conclusão

As abelhas são capazes de realizar tarefas complexas, importantes no reconhecimento e aprendizado de fontes confiáveis de alimento em seu ambiente natural (Giurfa 2007). Devido às facilidades de treinamento, foi possível desenvolver diversos protocolos e

equipamentos para o estudo das capacidades cognitivas importantes para o processo de polinização realizado por esses insetos (Giurfa 2007). Cada protocolo tem suas particularidades, vantagens e desvantagens, e estão sendo constantemente aprimorados com o surgimento de novas tecnologias e informações a respeito do processo cognitivo das abelhas. Nessa revisão, buscamos trazer conceitos básicos dos estudos cognitivos usando esses insetos como modelos, como uma primeira leitura para que o pesquisador entre em contato com esse campo em plena expansão. Quando tratamos de biologia da polinização, é importante ter em mente que os polinizadores não percebem as flores como os humanos. Assim, os experimentos cognitivos são a melhor maneira de entender como um polinizador percebe, aprende, memoriza e usa essa informação para tomar suas decisões. Dessa forma, é importante que o pesquisador aprenda a treinar a sua abelha e, portanto, entenda o processo de polinização pelos “olhos e narizes” do polinizador.

Agradecimentos

Essa revisão foi submetida para publicação ao periódico *Oecologia Australis*. Agradeço aos demais autores desse trabalho: Francismeire J. Telles, Pedro J. Bergamo, Vinícius L. G. de Brito e Marlies Sazima, pelas suas importantes contribuições. Os autores agradecem à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de Doutorado concedida à João M. R. B. V. Aguiar (processo 2015/05919-8) e à Pedro J. Bergamo (processo 2016/06434-0). À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio à pesquisa a Vinícius L. G. Brito (processo APQ-02497-16). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e pela bolsa PNPd (CAPES-1659767) no Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) concedida à Francismeire J. Telles. Marlies Sazima agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 302781/2016-1). Os autores também agradecem Paul Marchal (CRCA, *Université Paul Sabatier – Toulouse III*) por gentilmente ceder a foto do labirinto em Y utilizada na Figura 3.

Referências

- Aguiar, J. M. R. B. V., & Pansarin, E. R. 2019. Deceptive pollination of *Ionopsis utricularioides* (Oncidiinae: Orchidaceae). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 250 (November), 72–78. DOI: 10.1016/j.flora.2018.11.018
- Aguiar, J. M. R. B. V., Roselino, A. C., Sazima, M., & Giurfa, M. 2018. Can honey bees

- discriminate between floral-fragrance isomers? *Journal of Experimental Biology*, 221, jeb180844. DOI: 10.1242/jeb.180844
- Avarguès-Weber, A., & Giurfa, M. 2014. Cognitive components of color vision in honey bees: How conditioning variables modulate color learning and discrimination. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. DOI: 10.1007/s00359-014-0909-z
- Avarguès-Weber, A., & Mota, T. 2016. Advances and limitations of visual conditioning protocols in harnessed bees. *Journal of Physiology Paris*. DOI: 10.1016/j.jphysparis.2016.12.006
- Balamurali, G. S., Nicholls, E., Somanathan, H., & Hempel de Ibarra, N. 2018. A comparative analysis of colour preferences in temperate and tropical social bees. *Science of Nature*, 105(1–2). DOI: 10.1007/s00114-017-1531-z
- Baldelomar, M., Viana, M. L., & Telles, F. J. 2018. Interacciones planta-insecto, 22(4), 348–361.
- Bergamo, P. J., Telles, F. J., Arnold, S. E. J., & Brito, V. L. G. 2018. Flower colour within communities shifts from overdispersed to clustered along an alpine altitudinal gradient. *Oecologia*, 188(1), 223–235. DOI: 10.1007/s00442-018-4204-5
- Blackawton, P. S., Airzee, S., Allen, A., Baker, S., Berrow, A., Blair, C., Churchill, M., Coles, J., Cumming, R. F. J., Fraquelli, L., Hackford, C., Hinton Mellor, A., Hutchcroft, M., Ireland, B., Jewsbury, D., Littlejohns, A., Littlejohns, G., Lotto, M., McKeown, J., O’Toole, A., Richards, H., Robbins-Davey, L., Roblyn, S., Rodwell-Lyn, H., Schenck, D., Springer, J., WishyA., Rodwell-Lynn, T., Strudwick, D., & Lotto, R. B. 2011. Blackawton bees. *Biology Letters*, 7(2), 168–172. DOI: 10.1098/rsbl.2010.1056
- Briscoe, A. D., & Chittka, L. 2001. The evolution of color vision in insects. *Annual Review of Entomology*, 46, 471–510.
- Brilo, V. L. G., Weynans, K., Sazima, M., & Lunau, K. 2015. Trees as huge flowers and flowers as oversized floral guides: the role of floral color change and retention of old flowers in *Tibouchina pulchra*. *Frontiers in Plant Science*, 6. DOI: 10.3389/fpls.2015.00362
- Brilo, V., Telles, F., & Lunau, K. 2014. Ecologia Cognitiva da Polinização. In: A. R. Rech, K. Agostini, P. E. Oliveira, & I. C. Machado (Eds.), *Biologia da Polinização*. pp. 417–438. Rio de Janeiro: Projeto Cultural.
- Buatois, A., Flumian, C., Schultheiss, P., Avarguès-Weber, A., & Giurfa, M. 2018. Transfer of visual learning between a virtual and a real environment in honey bees: the role of

- active vision. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00139
- Buatois, A., Pichot, C., Schultheiss, P., Sandoz, J. C., Lazzari, C. R., Chittka, L., Avarguès-Weber, A., & Giurfa, M. 2017. Associative visual learning by tethered bees in a controlled visual environment. *Scientific Reports*, 7(1). DOI: 10.1038/s41598-017-12631-w
- Chittka, L., Faruq, S., Skorupski, P., & Werner, A. 2014. Colour constancy in insects. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 200(6), 435–448. DOI: 10.1007/s00359-014-0897-z
- Chittka, L., & Thomson, J. D. 2001. Cognitive ecology of pollination: animal behavior and floral evolution. Cambridge University Press, 108, 287–288. DOI: 10.1046/j.1439-0310.2002.00774.x
- Chittka, L., Thomson, J. D., & Waser, N. M. 1999. Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften*. DOI: 10.1007/s001140050636
- de Brito Sanchez, M. G., Serre, M., Avargues-Weber, A., Dyer, A. G., & Giurfa, M. 2015. Learning context modulates aversive taste strength in honey bees. *Journal of Experimental Biology*, 218(6), 949–959. DOI: 10.1242/jeb.117333
- Dormont, L., Delle-Vedove, R., Bessière, J. M., & Schatz, B. 2014. Floral scent emitted by white and coloured morphs in orchids. *Phytochemistry*, 100, 51–59. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.01.009
- Dyer, A. G., Garcia, J. E., Shrestha, M., & Lunau, K. 2015. Seeing in colour: a hundred years of studies on bee vision since the work of the Nobel laureate Karl von Frisch. *Proceedings of the Royal Society of Victoria*, 127(1), 66. DOI: 10.1071/RS15006
- Frisch, K. von. 1914. Der Farbensinn und Formensinn der Biene. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere*, 35(1), 1–182.
- Gawryszewski, F. M. 2017. Colour vision models: a practical guide, some simulations, and colourvision R package. bioRxiv, 103754. DOI: 10.1101/103754
- Giurfa, M. 2004. Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften*, 91(5), 228–231. DOI: 10.1007/s00114-004-0530-z
- Giurfa, M. 2007. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: A taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. DOI: 10.1007/s00359-007-0235-9
- Giurfa, M., Núñez, J., Chittka, L., & Menzel, R. 1995. Colour preferences of flower-naive honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, 177(3), 247–259. DOI: 10.1007/BF00192415

- Giurfa, M., Vorobyev, M., Kevan, P., & Menzel, R. 1996. Detection of coloured stimuli by honeybees: Minimum visual angles and receptor specific contrasts. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 178(5), 699–709. DOI: 10.1007/BF00227381
- Giurfa, M., Zhang, S., Jenett, A., Menzel, R., & Srinivasan, M. V. 2001. The concepts of “sameness” and “difference” in an insect. *Nature*. DOI: 10.1038/35073582
- Gruter, C., Moore, H., Firmin, N., Helantera, H., & Ratnieks, F. L. W. 2011. Flower constancy in honey bee workers (*Apis mellifera*) depends on ecologically realistic rewards. *Journal of Experimental Biology*, 214(8), 1397–1402. DOI: 10.1242/jeb.050583
- Guerrieri, F., Lachnit, H., Gerber, B., & Giurfa, M. 2005. Olfactory blocking and odorant similarity in the honeybee. *Learning and Memory*, 12(2), 86–95. DOI: 10.1101/lm.79305
- Gumbert, A. 2000. Color choices by bumble bees (*Bombus terrestris*): Innate preferences and generalization after learning. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 48(1), 36–43. DOI: 10.1007/s002650000213
- Heinrich, B. 1975. Bee Flowers: A Hypothesis on flower variety and blooming times. *Evolution*, 29(2), 325–334. DOI: 10.2307/2407220
- Henske, J., Krausa, K., Hager, F. A., Nkoba, K., & Kirchner, W. H. 2015. Olfactory associative learning in two African stingless bee species (*Meliponula ferruginea* and *M. bocandei*, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 62(4), 507–516. DOI: 10.1007/s00040-015-0430-6
- Hrcncir, M., Jarau, S., Zucchi, R., & Barth, F. G. 2004. Thorax vibrations of a stingless bee (*Melipona seminigra*). II. Dependence on sugar concentration. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 190(7), 549–560. DOI: 10.1007/s00359-004-0515-6
- Juillet, N., & Scopece, G. 2010. Does floral trait variability enhance reproductive success in deceptive orchids? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. DOI: 10.1016/j.ppees.2010.05.001
- Kemp, D. J., Herberstein, M. E., Fleishman, L. J., Endler, J. A., Bennett, A. T. D., Dyer, A. G., Hart, N. S., Marshall, J., & Whiting, M. J. 2015. An integrative framework for the appraisal of coloration in nature. *The American Naturalist*, 185(6), 000–000. DOI: 10.1086/681021
- Koethe, S., Bossems, J., Dyer, A. G., & Lunau, K. 2016. Colour is more than hue: preferences for compiled colour traits in the stingless bees *Melipona mondury* and *M. quadrifasciata*.

- Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 202(9–10), 615–627. DOI: 10.1007/s00359-016-1115-y
- Land, M. F., & Nilsson, D.-E. 2002. *Animal Eyes*. Oxford University Press: p. 221.
- Lehrer, M., Horridge, G. A., Zhang, S. W., & Gadagkar, R. 1995. Shape vision in bees: innate preference for flower-like patterns. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 347(1320), 123–137. DOI: 10.1098/rstb.1995.0017
- Locatelli, F. F., Fernandez, P. C., & Smith, B. H. 2016. Learning about natural variation of odor mixtures enhances categorization in early olfactory processing. *The Journal of Experimental Biology*, 219(17), 2752–2762. DOI: 10.1242/jeb.141465
- Lunau, K., Fieselmann, G., Heuschen, B., & Van De Loo, A. 2006. Visual targeting of components of floral colour patterns in flower-naïve bumblebees (*Bombus terrestris*; Apidae). *Naturwissenschaften*, 93(7), 325–328. DOI: 10.1007/s00114-006-0105-2
- Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J. C., & Giurfa, M. 2012. Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: A step toward standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(1), 159–167. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.018
- Maues, M. M. 2014. Economia e polinização: custos, ameaças e alternativas. In: *Biologia da polinização*. p. p: 461-481. .
- Melo, L. R. F., Guimarães, B. M. da C., Barônio, G. J., Oliveira, L. C. de, Cardoso, R. K. de O. A., Araújo, T. N., & Telles, F. J. 2018. Como as abelhas percebem as flores e por que isto é importante? *Oecologia Australis*, 22(4), 362–389. DOI: 10.4257/oeco.2018.2204.03
- Menzel, R., Manz, G., Menzel, R., & Greggers, U. 2001. Massed and spaced learning in honeybees: The role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learning and Memory*, 8(4), 198–208. DOI: 10.1101/lm.40001
- Muth, F., Cooper, T. R., Bonilla, R. F., & Leonard, A. S. 2018. A novel protocol for studying bee cognition in the wild. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(1), 78–87. DOI: 10.1111/2041-210X.12852
- Nicholls, E., & Hempel de Ibarra, N. 2017. Assessment of pollen rewards by foraging bees. *Functional Ecology*. DOI: 10.1111/1365-2435.12778
- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3), 321–326. DOI: 10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x
- Pavlov, I. P. 1927. *Conditioned Reflexes*. Oxford University Press. Vol. 17p. 448. DOI: 10.2307/1134737

- Pinheiro, M., Gaglianone, M. C., Nunes, C. E. P., Sigrist, M. R., & Santos, I. A. dos. 2014. Polinização por Abelhas. In: *Biologia da Polinização*. pp. 205–233. .
- Raguso, R. A. 2008. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1), 549–569. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601
- Rath, L., Giovanni Galizia, C., & Szyszka, P. 2011. Multiple memory traces after associative learning in the honey bee antennal lobe. *European Journal of Neuroscience*, 34(2), 352–360. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2011.07753.x
- Ray, S., & Ferneyhough, B. 1999. Behavioral development and olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Developmental Psychobiology*, 34(1), 21–27. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2302(199901)34:1<21::AID-DEV4>3.0.CO;2-K
- Rech, A. R., Agostini, K., Oliveira, P. E., & Machado, I. C. 2014a. *Biologia da Polinização*. Rio de Janeiro: Projeto Cultural.
- Rech, A. R., Bergamo, P. J., & de Figueiredo, R. A. 2014b. Polinização Abiótica. In: *Biologia da Polinização*. pp. 183–204. .
- Rech, A. R., Dalsgaard, B., Sandel, B., Sonne, J., Svenning, J. C., Holmes, N., & Ollerton, J. 2016. The macroecology of animal versus wind pollination: ecological factors are more important than historical climate stability. *Plant Ecology and Diversity*, 9(3), 253–262. DOI: 10.1080/17550874.2016.1207722
- Rodríguez, I., Gumbert, A., De Ibarra, N. H., Kunze, J., & Giurfa, M. 2004. Symmetry is in the eye of the “beeholder”: Innate preference for bilateral symmetry in flower-naïve bumblebees. *Naturwissenschaften*, 91(8), 374–377. DOI: 10.1007/s00114-004-0537-5
- Roselino, A. C., Rodrigues, A. V., & Hrncir, M. 2016. Stingless bees (*Melipona scutellaris*) learn to associate footprint cues at food sources with a specific reward context. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 202(9–10), 657–666. DOI: 10.1007/s00359-016-1104-1
- Ruedenauer, F. A., Wohrle, C., Spaethe, J., & Leonhardt, S. D. 2018. Do honeybees (*Apis mellifera*) differentiate between different pollen types? *PLoS ONE*, 13(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0205821
- Salzmann, C. C., Nardella, A. M., Cozzolino, S., & Schiestl, F. P. 2007. Variability in floral scent in rewarding and deceptive orchids: The signature of pollinator-imposed selection? *Annals of Botany*, 100(4), 757–765. DOI: 10.1093/aob/mcm161
- Skinner, B. F. 1938. *The Behavior of Organisms*. Appleton Appleton ed. New York.
- Stach, S., & Giurfa, M. 2005. The influence of training length on generalization of visual

- feature assemblies in honeybees. *Behavioural Brain Research*, 161(1), 8–17. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.02.008
- Stavenga, D. G. 1992. Eye regionalization and spectral tuning of retinal pigments in insects. *Trends in Neurosciences*, 15(6), 213–8.
- Szyszkka, P., Gerkin, R. C., Galizia, C. G., & Smith, B. H. 2014. High-speed odor transduction and pulse tracking by insect olfactory receptor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16925–16930. DOI: 10.1073/pnas.1412051111
- Takeda, K. 1961. Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 6(3), 168–179. DOI: 10.1016/0022-1910(61)90060-9
- Telles, F. J., Corcobado, G., Trillo, A., & Rodríguez-Gironés, M. A. 2017. Multimodal cues provide redundant information for bumblebees when the stimulus is visually salient, but facilitate red target detection in a naturalistic background. *PLoS ONE*, 12(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0184760
- Vieira, A. R., Salles, N., Borges, M., & Mota, T. 2018. Visual discrimination transfer and modulation by biogenic amines in honeybees. *The Journal of Experimental Biology*, 221(9), jeb178830. DOI: 10.1242/jeb.178830
- Weiss, M. R. 1991. Floral colour changes as cues for pollinators. *Nature*, 354(6350), 227–229. DOI: 10.1038/354227a0
- Weiss, M. R. 2001. Vision and learning in some neglected pollinators: beetles, flies, moths, and butterflies. In: L. Chittka & J. D. Thomson (Eds.), *Cognitive Ecology of Pollination: Animal Behaviour and Floral Evolution*. pp. 171–190. Cambridge: Cambridge University Press.
- Weiss, M. R., & Lamont, B. B. 1997. Floral color change and insect pollination: A dynamic relationship. *Israel Journal of Plant Sciences*, 45(2–3), 185–199. DOI: 10.1080/07929978.1997.10676683
- Wester, P., & Lunau, K. 2017. Plant–pollinator communication. *Advances in Botanical Research*, 82, 225–257. DOI: 10.1016/bs.abr.2016.10.004
- Willmer, P. 2011. Pollination and floral ecology. *57(4)*, 1–778. DOI: 10.5860/CHOICE.49-2063

Considerações Finais

Os estudos de biologia da polinização por muitas vezes investigam respostas das plantas em relação aos seus mecanismos de reprodução, levando em consideração a biologia floral e reprodutiva, e a interação com os polinizadores. Apesar de poucos os estudos que levam em consideração a perspectiva dos polinizadores, i.e. as capacidades cognitivas desses animais em face aos atributos e recursos florais, existe um ramo crescente de pesquisa denominado Ecologia Cognitiva da Polinização que busca elucidar questões nesse sentido (Chittka & Thomson 2001, Brito *et al.* 2014). Nessa tese investigamos um problema que vem intrigando os pesquisadores a décadas (Heinrich 1975, Juillet & Scopece 2010): a variação dos atributos florais em plantas polinizadas por engano. A partir de uma perspectiva dos visitantes florais, revelamos como as capacidades cognitivas dos polinizadores estão intrinsecamente relacionadas a esse mecanismo de polinização.

De fato, no primeiro capítulo mostramos que a variação na cor floral é percebida pelos visitantes florais, que tem o seu processo de aprendizado associativo perturbado por esses sinais florais variáveis. Mostramos que os polinizadores são capazes de aprender a evitar um estímulo sem recompensa e que preferem visitar um novo estímulo ao invés dele. Surge a dúvida, no entanto, se as abelhas escolhem a nova cor apenas pelo seu caráter de novidade, como no fenômeno da neofilia conhecido para vertebrados (Greenberg & Mettke-hofmann 2011) e abelhas *Bombus* (Muller *et al.* 2010), ou se estão usando alguma forma de raciocínio lógico para escolher uma nova flor. Em outras palavras, seriam as abelhas capazes de realizar inferências sobre a qualidade de uma flor não conhecida a partir de experiências prévias negativas? Ainda no primeiro capítulo trazemos de forma robusta resultados que suportam a hipótese de Heinrich (1975), mostrando que no momento da escolha das flores pelos polinizadores a presença de variabilidade floral faz com que eles visitem mais flores e demorem mais tempo para aprender a evitar todos os estímulos sem recompensa.

Nos Capítulos 2 e 3 investigamos outra modalidade sensorial, o olfato, para entender como a variação na fragrância atua na polinização por engano. Geralmente o papel da fragrância na polinização é estudado a partir de descrições qualitativas e quantitativas dos compostos voláteis produzidos pelas flores, a partir de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Com essa metodologia, vários compostos já foram descobertos nas fragrâncias florais (Knudsen *et al.* 1993) e essa informação proveniente das plantas é utilizada para fazer inferências sobre o tipo de polinizador e o mecanismo de polinização a partir de estudos empíricos que mostram a preferência de flores com

determinadas fragrâncias por diferentes grupos de polinizadores (Raguso 2008, Varassin & Amaral-Neto 2014). No entanto, apesar da alta diversidade dos compostos do bouquet floral, não é possível saber, apenas por essas descrições, se os polinizadores de fato percebem e aprendem a usar esses sinais na polinização, e ainda quais compostos são mais relevantes, independentemente da sua abundância na fragrância.

No segundo capítulo, por exemplo, mostramos que apesar da presença de isômeros da mesma molécula ser comum em fragrâncias de orquídeas polinizadas por engano, as abelhas conseguem discriminar entre esses compostos extremamente similares apenas em condições específicas, como no condicionamento diferencial na presença de substância aversiva. Dessa forma, a diversidade promovida pela presença de isômeros nas análises de descrição da fragrância não correspondem à diversidade ao nível cognitivo. Nesse estudo, no entanto, usamos a resposta binária de presença ou ausência de extensão de probóscide, uma variável discreta. Novos estudos usando respostas mais acuradas, como a latência (i.e., tempo entre a apresentação do estímulo e a extensão da probóscide) e a duração da resposta (e.g. Locatelli *et al.* 2016) poderiam melhorar a visualização de discriminação em alguns casos.

Continuamos a investigar o papel da variação na fragrância floral no terceiro capítulo. Utilizamos uma análise multidimensional, que levou em consideração a caracterização química da fragrância e respostas comportamentais e neuronais das abelhas. Revelamos que um fenômeno cognitivo, denominado *overshadowing* (Schubert *et al.* 2015), faz com que os compostos minoritários e mais variáveis da fragrância dominem esse sinal, sendo melhor aprendidos pelas abelhas. Dessa forma, mostramos mais uma vez que apenas a descrição da composição da fragrância não é suficiente para entender como as abelhas escolhem as flores. Se levássemos em conta apenas nossos resultados de CG-EM, poderíamos inferir que β -ocimeno era o composto mais saliente no processo de polinização, devido a sua abundância e alta frequência entre indivíduos. No entanto, ao encontrar que outros os compostos são mais salientes, revelamos que a variação na fragrância floral pode ser importante no mecanismo de polinização por engano, como sugerido por Heinrich (1975).

Nessa tese, escolhemos por desvincular os sinais florais de *I. utricularioides*, separando cor e fragrância nos nossos experimentos. No entanto, esses sinais podem atuar em conjunto de forma multimodal. Dessa maneira, um próximo passo seria entender se as variações de cor e fragrância estão correlacionadas e como os sinais florais emitidos pela flor como um todo atuam na percepção e memória dos polinizadores, e por consequência no processo do engano. Vale lembrar, ainda, que nessa tese usamos apenas uma interação ecológica como modelo e, mesmo assim, obtivemos um volume expressivo de dados e novas

informações. Com o crescente uso dos métodos de análise de atributos florais e de cognição dos polinizadores, podemos entender melhor outros modelos ecológicos e encontrar respostas fascinantes. Por fim, concluímos que ao utilizarmos métodos de cognição animal, como os revisados no Capítulo 4 dessa tese, podemos entender melhor questões complexas em biologia da polinização. Dessa forma, reforçamos que é de extrema importância levar em consideração a perspectiva do polinizador nesses processos ecológicos, avaliando não só o papel das características florais, mas também o papel das habilidades cognitivas dos animais na reprodução das plantas.

Referências

- Ackerman, J. 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, 1(2), 108–113.
- Ackerman, J. D., Cuevas, A. A., & Hof, D. 2011. Are deception-pollinated species more variable than those offering a reward? *Plant Systematics and Evolution*, 293(1–4), 91–99. DOI: 10.1007/s00606-011-0430-6
- Aguiar, J. M. R. B. V. 2014. *Biologia Reprodutiva das Ionopsis Kunth (Orchidaceae) do Brasil*. University of São Paulo.
- Aguiar, J. M. R. B. V., & Pansarin, E. R. 2019. Deceptive pollination of *Ionopsis utricularioides* (Oncidiinae: Orchidaceae). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 250(November), 72–78. DOI: 10.1016/j.flora.2018.11.018
- Brito, V., Telles, F., & Lunau, K. 2014. Ecologia Cognitiva da Polinização. In: A. R. Rech, K. Agostini, P. E. Oliveira, & I. C. Machado (Eds.), *Biologia da Polinização*. pp. 417–438. Rio de Janeiro: Projeto Cultural.
- Chittka, L., & Thomson, J. D. 2001. Cognitive ecology of pollination: animal behavior and floral evolution. Cambridge University Press, 108, 287–288. DOI: 10.1046/j.1439-0310.2002.00774.x
- Darwin, C. 1877. On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects. John Murray. p. 300.
- Frisch, K. von. 1914. Der farbensinn und Formensinn der Biene. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung Für Allgemeine Zoologie Und Physiologie Der Tiere*, 35(1), 1–182.
- Galizia, C. G., Kunze, J., Gumbert, A., Borg-karlson, A., Sachse, S., Markl, C., & Menzel, R. 2017. Relationship of visual and olfactory signal parameters in a food-deceptive flower mimicry system., 16(1), 159–168. DOI: 10.1093/beheco/arh147
- Gaskett, A. C. 2011. Orchid pollination by sexual deception: Pollinator perspectives. *Biological Reviews*, 86(1), 33–75. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2010.00134.x
- Gawryszewski, F. M. 2017. Colour vision models: a practical guide, some simulations, and colourvision R package. bioRxiv, 103754. DOI: 10.1101/103754
- Gigord, L. D. B., Macnair, M. R., & Smithson, A. 2002. Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6253–6255. DOI: 10.1073/pnas.111162598
- Giurfa, M. 2007. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: A

- taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 193, 801-824. DOI: 10.1007/s00359-007-0235-9
- Greenberg, R., & Mettke-hofmann, C. 2011. Ecological aspects of neophobia and neophilia in birds. *Current Ornithology*, 16, 119–178. .
- Heinrich, B. 1975. Bee flowers: a hypothesis on flower variety and blooming times. *Evolution*, 29(2), 325–334. DOI: 10.2307/2407220
- Jersáková, J., Johnson, S. D., & Kindlmann, P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews*, 81, 219-235. DOI: 10.1017/S1464793105006986
- Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C. G., & Menzel, R. 1997. Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature*, 387(6630), 285–288. DOI: 10.1038/387285a0
- Johnson, S. D., & Schiestl, F. P. 2016. *Floral Mimicry*. Oxford University Press.
- Juillet, N., & Scopece, G. 2010. Does floral trait variability enhance reproductive success in deceptive orchids? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 12, 317-322. DOI: 10.1016/j.ppees.2010.05.001
- Knudsen, J. T., Tollsten, L., & Bergström, L. G. 1993. Floral scents-a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, 33, 253-280. DOI: 10.1016/0031-9422(93)85502-I
- Locatelli, F. F., Fernandez, P. C., & Smith, B. H. 2016. Learning about natural variation of odor mixtures enhances categorization in early olfactory processing. *Journal of Experimental Biology*, 219(17), 2752–2762. DOI: 10.1242/jeb.141465
- Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J. C., & Giurfa, M. 2012. Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: A step toward standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(1), 159–167. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.018
- Muller, H., Grossmann, H., & Chittka, L. 2010. “Personality” in bumblebees: Individual consistency in responses to novel colours? *Animal Behaviour*, 80(6), 1065–1074. DOI: 10.1016/j.anbehav.2010.09.016
- Papadopulos, A. S. T., Powell, M. P., Pupulin, F., Warner, J., Hawkins, J. A., Salamin, N., Chittka, L., Williams, N. H., Whitten, W. M., Loader, D., Valente, L. M., Chase, M. W., & Savolainen, V. 2013. Convergent evolution of floral signals underlies the success of Neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*,

- 280(1765), 20130960–20130960. DOI: 10.1098/rspb.2013.0960
- Pavlov, I. P. 1927. *Conditioned Reflexes*. Oxford University Press. Vol. 17. p. 448. DOI: 10.2307/1134737
- Raguso, R. A. 2008. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1), 549–569. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601
- Salzmann, C. C., Cozzolino, S., & Schiestl, F. P. 2007. Floral scent in food-deceptive orchids: species specificity and sources of variability. *Plant Biology*, 9(6), 720–729. DOI: 10.1055/s-2007-965614
- Salzmann, C. C., Nardella, A. M., Cozzolino, S., & Schiestl, F. P. 2007. Variability in floral scent in rewarding and deceptive orchids: The signature of pollinator-imposed selection? *Annals of Botany*, 100(4), 757–765. DOI: 10.1093/aob/mcm161
- Salzmann, C. C., & Schiestl, F. P. 2007. Odour and colour polymorphism in the food-deceptive orchid *Dactylorhiza romana*. *Plant Systematics and Evolution*, 267(1–4), 37–45. DOI: 10.1007/s00606-007-0560-z
- Schubert, M., Sandoz, J. C., Galizia, G., & Giurfa, M. 2015. Odourant dominance in olfactory mixture processing: What makes a strong odourant? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1802), 20142562. DOI: 10.1098/rspb.2014.2562
- Scopece, G., Cozzolino, S., & Dafni, A. (2014). Darwin on the pollination of *Orchis* - what he taught us and what we can tell him today. In: R. Edens-Meier & P. Bernhardt (Eds.), *Darwin's Orchids: then and Now*. pp. 23-46. Chicago: The University of Chicago Press.
- Skinner, B. F. 1938. *The Behavior of Organisms*. Appleton Appleton ed. New York.
- Smithson, A., Juillet, N., Macnair, M. R., & Gigord, L. D. B. 2007. Do rewardless orchids show a positive relationship between phenotypic diversity and reproductive success? *Ecology*, 88(2), 434–442. DOI: 10.1890/05-1445
- Varassin, I. G., & Amaral-Neto, L. P. 2014. Atrativos. In: A. R. Rech, K. Agostini, P. E. Oliveira, & I. C. Machado (Eds.), *Biologia da Polinização*. pp. 151–171. Rio de Janeiro: Projeto Cultural.

Resumo: A variação nos atributos florais está relacionada à polinização por engano em orquídeas?

A polinização por engano, uma estratégia comum em orquídeas (Orchidaceae), ocorre quando as flores não apresentam recurso aos polinizadores, mas os atraem, mesmo assim, pelos seus sinais conspícuos e atrativos, como cor e fragrância. Possuir sinais atrativos variáveis pode melhorar a eficiência do engano ao atrapalhar no estabelecimento de previsões sobre a ausência de recurso. Essa ideia foi desenvolvida por Heinrich (1975) que argumentou que quanto mais diferentes as flores sem recurso de uma espécie, mais tempo os polinizadores levariam para evitá-la. A variação nos sinais atrapalharia, então, na generalização entre experiências sem recompensa. Nessa tese, testamos essa hipótese focando na interação entre uma orquídea tropical (*Ionopsis utricularioides*) e seus visitantes florais. Nós elaboramos uma série de experimentos cognitivos para abordar a questão do que os polinizadores percebem e aprendem quando se deparam com sinais florais variáveis. Primeiro, focamos na informação visual e caracterizamos a variação intraespecífica de cor floral dessa orquídea. Nós então treinamos abelhas sem ferrão *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Meliponini) a visitar flores artificiais que foram manipuladas quanto à cor e presença de recompensa de açúcar, simulando as flores polimórficas de engano. Encontramos que a variação na cor floral perturba o processo de aprendizagem, resultando em um aumento no número de flores visitadas até aprenderem que todas as flores não possuíam recompensa. Nós também focamos na informação olfativa e caracterizamos a variação intraespecífica na fragrância floral dessa orquídea. Usamos compostos do perfil de odores das flores e realizamos experimentos de condicionamento olfativo em *Apis mellifera*, um modelo para o estudo de aprendizado e memória. Utilizando o protocolo de condicionamento olfativo de Resposta de Extensão da Probóscide (REP), estudamos se abelhas conseguem discriminar entre isômeros, que são comuns na fragrância de várias espécies de orquídeas polinizadas por engano. Encontramos que as abelhas discriminam os isômeros sob condições específicas, mas tendem a generalizar entre eles na maioria dos casos. Dessa forma, num contexto de polinização, esses sinais dificilmente seriam usados como pistas preditivas para a presença ou ausência de alimento. Nós também estudamos se compostos abundantes da fragrância floral dominam compostos minoritários, em um fenômeno cognitivo chamado *overshadowing*. Se esse fosse o caso, os compostos mais abundantes da fragrância da orquídea poderiam ser usados como pistas salientes a serem aprendidas em associação com presença ou ausência de recurso. Encontramos que o composto majoritário da fragrância foi dominado pelos minoritários, que variam nas flores entre indivíduos. A dominância é mantida mesmo quando a concentração do composto abundante

foi aumentada em relação a dos outros compostos na mistura. Dessa forma, as abelhas não conseguem aprender o valor preditivo do composto mais abundante da fragrância da orquídea, o que ajudaria a manter a polinização por engano. Tomadas em conjunto, nossas descobertas revelam que a variabilidade olfativa e visual em orquídeas polinizadas por engano contribui para esse mecanismo ao perturbar no aprendizado associativo da ausência de recurso. Além disso, elas indicam que avaliar a polinização pela perspectiva da cognição do polinizador pode nos levar a um entendimento mais completo das interações inseto-planta e a uma análise compreensiva de problemas complexos em estudos de polinização.

Palavras-chave: percepção, aprendizado, orquídeas, abelhas, visão, olfato, polinização por engano

Abstract: Is floral-trait variation related to pollination in deceptive orchids?

Deceptive pollination, a strategy common among orchids (Orchidaceae) occurs when flowers offer no reward to pollinators and draw them, nevertheless, by means of conspicuous and attractive signals, such as color and fragrance. Having variable attracting signals may improve the efficiency of deception by hindering the establishment of predictions about the absence of reward. This idea was developed by Heinrich (1975), who argued that the more dissimilar are the non-rewarding flowers of a given species, the longer it should take pollinators to learn avoiding that species. Signal variability would thus impair generalization between non-rewarding experiences. In this thesis, we tested this hypothesis by focusing on the interaction between a tropical orchid species (*Ionopsis utricularioides*) and its floral visitors. We designed a series of cognitive experiments to address the question of what do pollinators perceive and learn when they face variable floral signals. First, we focused on visual information and characterized the intraspecific flower color variation of the orchid. We then trained stingless bees *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Meliponini) to visit a setup of artificial flowers that were manipulated in color and presence of sugar reward to simulate the deceptive polymorphic flowers. We found that color variability disrupted the learning process, thus resulting in an increase of the number of flowers visited until learning that all flowers lacked reward. We also focused on olfactory information and characterized the intraspecific variation of flower fragrance in the orchid. We used components of the flower odorant profile and performed olfactory conditioning experiments with the honey bee *Apis mellifera*, a model for the study of learning and memory. Taking advantage of the olfactory conditioning of the Proboscis Extension Response (PER), we studied if bees discriminate between floral fragrance isomers, which are common in the fragrance of many food deceptive orchids. We found that honey bees discriminate isomers under specific conditions but tend to generalize between them in most of the cases. Thus, in a pollination context, these odor signals could seldom be used as predictive cues for the presence or absence of food. We also studied if abundant components within a floral bouquet dominate minor components, a cognitive phenomenon called overshadowing. If this were the case, the more abundant odors within an orchid fragrance could be used as salient cues to be learned in association with reward or absence of reward. We found that the major component of the orchid fragrance, was overshadowed by minor components that vary between individual flowers. Overshadowing was maintained even when the concentration of the abundant component was increased relative to those of the other odorants in the mixture. Thus, bees cannot learn the predictive value of the most abundant component of the orchid fragrance, a fact that could help

maintaining deceptive pollination. Taken together, our findings show that olfactory and visual variability in deceptive orchids contributes to deceptive pollination by impairing associative learning of the absence of reward. Moreover, they indicate that evaluating pollination from the perspective of pollinator cognition can lead us to a more complete understanding of insect-flower interactions, and to comprehensive analyses of complex problems in pollination studies.

Keywords: perception, learning, bees, orchids, vision, olfaction, deceptive pollination

Résumé: La variation des attributs floraux est-elle liée à la pollinisation des orchidées trompeuses?

La pollinisation dite ‘trompeuse’ consiste en l’attrait des pollinisateurs par des espèces florales qui présentent des attributs attirants tels que la couleur ou le parfum mais qui n’offrent pas de récompense en échange des services de pollinisation. Cette stratégie, fréquemment observée chez les orchidées (Orchidaceae), a été analysée par Heinrich en 1975 qui a proposé l’idée que la variabilité des fleurs d’une espèce trompeuse contribue à maintenir les visites des pollinisateurs en les empêchant d’apprendre des traits floraux réguliers associables à l’absence de récompense. La variabilité des signaux floraux empêcherait ainsi la généralisation entre expériences négatives. Dans cette thèse, nous avons testé cette hypothèse à partir de l’étude de l’interaction entre une orchidée tropicale (*Ionopsis utricularioides*) et ses pollinisateurs. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la variation intraspécifique de la couleur des orchidées. Par la suite, des abeilles Meliponini (*Scaptotrigona aff. depilis*) ont été entraînées à visiter des fleurs artificielles de couleur variable en présence ou absence de récompense sucrée simulant ainsi des fleurs polymorphes trompeuses. Nous avons constaté qu’en l’absence de récompense, la variabilité de couleur a empêché le processus d’apprentissage, se traduisant par une augmentation du nombre de fleurs visitées. Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé la variabilité intraspécifique du parfum des orchidées. A partir des informations obtenues dans ce domaine, nous avons mis en place des expériences de conditionnement olfactif de l’extension du proboscis chez l’abeille *Apis mellifera*, un insecte modèle pour l’étude de l’apprentissage et la mémoire. Nous avons ainsi étudié la capacité des abeilles à discriminer des isomères fréquents dans le bouquet floral de nombreuses orchidées. Nos résultats ont montré que les abeilles sont capables de discriminer certains de ces isomères dans certaines conditions, mais que dans la plupart des cas elles généralisent entre eux. Ces signaux olfactifs seraient donc difficilement utilisables en tant que prédicteurs spécifiques de la présence ou de l’absence de récompense chez les orchidées trompeuses. Par ailleurs, nous avons également étudié si les odeurs abondantes d’un bouquet floral dominant les odeurs mineures, phénomène perceptif connu sous le nom d’*overshadowing*. Si ceci était le cas, les odeurs abondantes du parfum de l’orchidée pourraient servir en tant qu’indicatifs saillants anticipant la présence ou absence de récompense. Nous avons constaté que la composante plus abondante du parfum d’orchidée, commune à la plupart des fleurs des individus, était masquée par des composantes mineures qui varient d’une fleur à l’autre. Ce masquage est maintenu en dépit de l’augmentation de la concentration de la composante abondante en relation à celle des autres composantes du

mélange. Les abeilles ne peuvent donc pas apprendre à discriminer des fleurs à partir de la composante majoritaire du parfum de l'orchidée, fait qui pourrait servir au maintien de la pollinisation trompeuse. Les résultats de cette thèse montrent que la variabilité des signaux visuels et olfactifs des orchidées trompeuses rend difficile l'apprentissage associatif de l'absence de récompense, favorisant ainsi la pollinisation trompeuse. Plus généralement, les résultats obtenus montrent que l'étude de la pollinisation à partir de la perspective de la cognition des pollinisateurs permet une compréhension intégrale des interactions insecte-fleur et facilite l'analyse de problèmes complexes dans le domaine de la pollinisation.

Mots clés : perception, apprentissage, abeilles, orchidées, vision, olfaction, pollinisation trompeuse