



---

**COMPORTAMIENTO DE FORRAJEO EN LA AVISPA SOCIAL**  
***Vespula germanica*:**

**USO DE CLAVES OLFATIVAS Y ROL DE LA EXPERIENCIA COMO**  
**MODULADOR DE LA RESPUESTA**

---

Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor/a en Biología  
de la Universidad Nacional de Comahue

Lic. María Belén Yossen



Equipo de Dirección:

Dra. Mariana Lozada y Dra. Micaela Buteler

Lugar de Trabajo:

Laboratorio Ecotono, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y  
Medioambiente (CONICET-UNComa)

San Carlos de Bariloche, Argentina, Año 2022

---

*Cuando alguien observa la naturaleza, se convierte en un admirador*

*Cuando un admirador estudia la naturaleza, se convierte en parte de ésta*

*Pero sólo cuando una persona se cuestiona sus propios conocimientos sobre la naturaleza, se puede sentir Biólogo.*

*Se puede sentir humano*

---

*U. Martínez*

## AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, Marian y Mica, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de compartir con ellas este fascinante mundo del comportamiento. Por haberme ayudado a crecer a nivel académico y personal. Por su paciencia infinita, ante todo. ¡Simplemente gracias!

A Andrés Arenas, Deborah Fischbein y José Crespo por su revisión y sus aportes valiosos a esta tesis.

A Sabri, mi hermana académica mayor, por ayuda y consejos durante todo este tiempo. A mi hermana académica menor, Cele, por sus charlas, salidas de campo, subidas a la montaña y por supuesto sus ñoquis caseros. A Nico F. y Mari. A, por su ayuda con el bendito R.

A mis compas, Sole, Ivón, Chichi, Meli, que tuve la suerte de conocer en el camino y que sin duda lo hicieron divertido.

Al laboratorio Ecotono, por abrirme sus puertas. Por sus charlas de pasillo, choripaneadas y seminarios tan enriquecedores (y por supuesto, ¡las meriendas!).

Al INIBIOMA y CONICET, por haber brindado el apoyo institucional para realizar esta Tesis

A la Universidad Pública, por brindar siempre educación de excelente calidad.

A mis papás, que sin terminar de entender en qué trabajaba, me apoyaron a la distancia.

A mis abuelos, Vento y Dora, y a mi querida profe Raquel que, aunque hoy ya no están, siempre van a ser un ejemplo de vida para mí.

A Uli, mi otra mitad, que además es compañero de campo, diseñador de experimentos, cocinero, conductor, ayudante de escritura, y un millón de cosas más. Por su apoyo constante en las buenas, en las malas y las muy malas. Sin duda no hubiese llegado hasta acá si no fuera por él.

Y a todos aquéllos con quiénes compartí este camino durante estos 6 años y que de alguna manera hicieron posible este trabajo.

## PUBLICACIONES RESULTANTES DE ESTA TESIS

**Yossen, M. B.**, Buteler, M., & Lozada, M. (2021). Context-dependent use of olfactory cues by foragers of *Vespula germanica* social wasps. *Animal cognition*, 1-11.

<https://doi.org/10.1007/s10071-021-01583-4>

**Yossen, M. B.**, Buteler, M., & Lozada, M. (2020). Foraging experience modulates response to aversive odour cues in social wasps. *Animal Behaviour*, 164, 113-122.

<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.04.007>

**Yossen, M. B.**, Lozada, M., Kuperman, M. N., González, S., Gastaldi, B., & Buteler, M. (2019). Essential oils as vespidae wasp repellents: Implications for their use as a management strategy. *Journal of Applied Entomology*, 143(6), 635-643. <https://doi.org/10.1111/jen.12631>

# INDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
CAPÍTULO 1: Introducción general.....	4
1. Importancia de claves olfativas durante el forrajeo en insectos.....	4
2. Rol de la experiencia en la respuesta a claves olfativas.....	9
3. Estímulos olfativos y plasticidad comportamental en el manejo de insectos plaga .....	11
4. La avispa <i>Vespula germanica</i> como modelo de estudio.....	14
5. Objetivo y estructura de la Tesis.....	26
CAPÍTULO 2: Respuesta a estímulos olfativos aversivos y su potencial para el manejo de <i>V. germanica</i> .....	28
Resumen.....	28
1. Introducción.....	29
2. Metodología.....	32
3. Resultados.....	40
4. Discusión.....	53
CAPÍTULO 3: Rol de la experiencia en la respuesta a olores: Aprendizaje asociativo de un olor aversivo.....	58
Resumen.....	58
1. Introducción.....	59
2. Metodología.....	62
3. Resultados.....	75
4. Discusión.....	86
CAPÍTULO 4: Rol de la experiencia en la respuesta a olores: Importancia del aprendizaje espacial en el uso de claves olfativas.....	92
Resumen.....	92
1. Introducción.....	93
2. Metodología.....	96
3. Resultados.....	107
4. Discusión.....	111
CAPÍTULO 5: Rol de la experiencia en la respuesta a olores: Rol de la primera experiencia en el aprendizaje asociativo de claves olfativas.....	116
Resumen.....	11

1. Introducción.....	117
2. Metodología.....	121
3. Resultados.....	135
4. Discusión.....	147
CAPÍTULO 6: Discusión general y Conclusiones.....	158
1. Aportes al conocimiento de la plasticidad comportamental de avispas eusociales.....	158
2. Implicancias para el manejo de esta especie exótica invasora.....	163
3. Importancia del estudio del comportamiento “en situación”: Ventajas, desafíos y problemas.....	166
4. Perspectivas de trabajo futuro.....	171
5. Conclusión final.....	173
Referencias bibliográficas.....	174
Anexo.....	189



## RESUMEN

Para los insectos sociales, el éxito en el forrajeo depende de su habilidad para localizar fuentes de alimento en un ambiente que es cambiante e impredecible, y las claves olfativas desempeñan un rol central en esta tarea. Sin embargo, cómo los individuos responden a estímulos olfativos como así también qué rol desempeñan los olores durante el forrajeo puede ser influenciada fuertemente por la experiencia previa. El rol del aprendizaje en la respuesta a olores ha sido estudiado con bastante profundidad en insectos sociales tales como abejas y hormigas, sin embargo, las avispas eusociales han recibido considerablemente menos atención. En esta tesis me propuse profundizar en la importancia de las claves olfativas durante el forrajeo y el rol que desempeña la experiencia en la respuesta a olores usando como modelo de estudio a *Vespula germanica*, una avispa eusocial con hábitos carroñeros que ha invadido diversas regiones del mundo y es considerada una plaga en la Patagonia. Demostré que las claves olfativas aversivas tienen potencial para ser empleados como herramienta de manejo de esta especie ya que la presencia de estos olores en las inmediaciones de un cebo proteico interfirió con el forrajeo y también provocó una disminución en la frecuencia de ataques a colmenas de *Apis mellifera* cuando se aplicaron en las cercanías de la piquera (capítulo 2). Posteriormente, encontré que la experiencia apetitiva puede modular radicalmente la respuesta a claves olfativas, conduciendo a que un olor que inicialmente desencadenaba respuestas aversivas se vuelva atractivo como resultado del aprendizaje asociativo (capítulo 3). A su vez, una sola visita de recolección fue suficiente para el establecimiento de la asociación entre el olor y el alimento, y que tres experiencias de recolección condujeron a una memoria olfativa de largo plazo. El olor aprendido no solo influyó las preferencias de las avispas, sino que también promovió el consumo de un recurso diferente y menos atractivo (solución de sacarosa). Por otro lado, también encontré que, si bien las claves olfativas desempeñan un rol importante guiando la búsqueda de nuevos recursos o de fuentes conocidas que han sido desplazadas de su sitio original, el olfato parece ser irrelevante durante la relocalización del recurso, cuando las claves visuales del contexto aparecen como el mecanismo de orientación primario (capítulo 4). Este hallazgo sugiere una jerarquía en el uso de claves, y también demuestra que la importancia de las claves olfativas durante el forrajeo de fuentes de carroña depende del contexto. Finalmente, también demostré que el aprendizaje de un estímulo olfativo no es contante a lo largo de las sucesivas visitas a una fuente, ya que la fuerza de la asociación entre el olor y el alimento varió considerablemente dependiendo del momento en el que el olor experimentado (e.g. primera visita vs. visitas posteriores) (capítulo 5). Encontré que la primera experiencia con la fuente de alimento interfirió con el subsecuente aprendizaje de un olor novedoso y que el primer encuentro de la avispa con el recurso fue decisivo en el posterior aprendizaje, curiosamente, aunque esta experiencia no haya involucrado la recolección exitosa del alimento. Esta tesis constituye un aporte valioso al conocimiento sobre el rol de los olores

durante el forrajeo de carroña en véspidos eusociales y los factores que modulan el aprendizaje olfativo en un contexto natural de forrajeo. También brinda información útil que podría ayudar a mejorar las estrategias de manejo empleadas actualmente para esta especie. Los hallazgos obtenidos demuestran que *V. germanica* tienen un comportamiento de forrajeo altamente especializado y una notable plasticidad comportamental, lo que la convierte en un modelo interesante para investigar el rol del aprendizaje y la memoria en ambientes cambiantes.

**PALABRAS CLAVE:** Comportamiento de forrajeo, plasticidad comportamental, repelentes, avispas eusociales, aprendizaje asociativo, manejo de plagas



## ABSTRACT

In social insects, foraging success depends on their ability to locate food sources in a changing and unpredictable environment, and olfactory cues play a central role in this task. However, the response to olfactory stimuli and their relevance during foraging can be influenced by previous experience. The role of learning in odour response has been studied quite extensively in social insects such as bees and ants, however, eusocial wasps have received considerably less attention. In this thesis I explored the importance of olfactory cues in foraging and the role of experience in odour response in *Vespula germanica*, a scavenger eusocial wasp that has successfully invaded several regions around the world and constitutes an important pest in Patagonia. I demonstrated that aversive olfactory cues have the potential to be employed as a management tool for this species as the presence of these odours interfered with foraging on protein baits and also led to a reduction in the frequency of attacks against *Apis mellifera* bees when applied in the vicinity of the hive entrance (Chapter 2). I subsequently found that appetitive experience can lead to an aversive odour becoming attractive as a result of associative learning (Chapter 3). I found that the odour-food association was established after a single collecting visit while more collecting events led to long-term memory of the odour. Learnt odour also guided wasp preferences and even promoted greater consumption of a different and less attractive resource (sucrose solution). On the other hand, I also showed that olfactory cues strongly guided the search for new resources and for known sources that have been displaced, however, olfaction appears to be irrelevant during resource relocalisation, when learnt spatial cues appear as the primary orientation mechanism (Chapter 4). This finding suggests a hierarchy in the use of cues and a context-dependent use of odour cues. Finally, I showed that the strength of the odour-food association depends on the timing of the odour experienced (Chapter 5). I observed that the first experience with the food source interfered with the subsequent learning of a novel odour and that the wasp's first encounter with the resource was decisive in subsequent learning, interestingly, even though this experience did not involve the successful collection of food. This thesis is a valuable contribution to our knowledge of the role of odours during carrion foraging in eusocial wasps, and the factors that modulate olfactory learning in a natural foraging context. It also provides useful information that could help improve management strategies currently employed for this species. The findings demonstrate that *V. germanica* have highly specialized foraging behaviour and remarkable behavioural plasticity, making it an interesting model for investigating the role of learning and memory in changing environments.

**KEY WORDS:** Foraging behaviour, behavioural plasticity, repellents, eusocial wasps, associative learning, pest management

# Capítulo 1

## Introducción general

---

### **1. Importancia de las claves olfativas durante el forrajeo en insectos**

La búsqueda de alimento es una actividad esencial en la vida de un animal y el éxito de esta tarea depende en gran medida de su habilidad para localizar fuentes de alimento en un ambiente que está en constante cambio. Particularmente, las claves olfativas tienen un rol central en el forrajeo ya que facilitan el hallazgo de nuevas fuentes de alimento a distancia (e.g. Raveret Richter 2000), ayudan a discriminar entre fuentes convenientes de aquéllas potencialmente nocivas (e.g. Wright et al. 2010) y están involucradas en la coordinación de las estrategias colectivas de forrajeo en insectos sociales (e.g. Ali y Morgan 1990; Overmyer y Jeanne 1998; Farina et al. 2005; Schueller et al. 2010). El estudio de estos comportamientos guiados por olores resulta relevante ya que permite comprender el forrajeo de los insectos, en particular de aquéllos que son relevantes por su rol ecológico y/o económico, como plagas, polinizadores o vectores de enfermedades.

#### **1.1. Composición química de los estímulos olfativos**

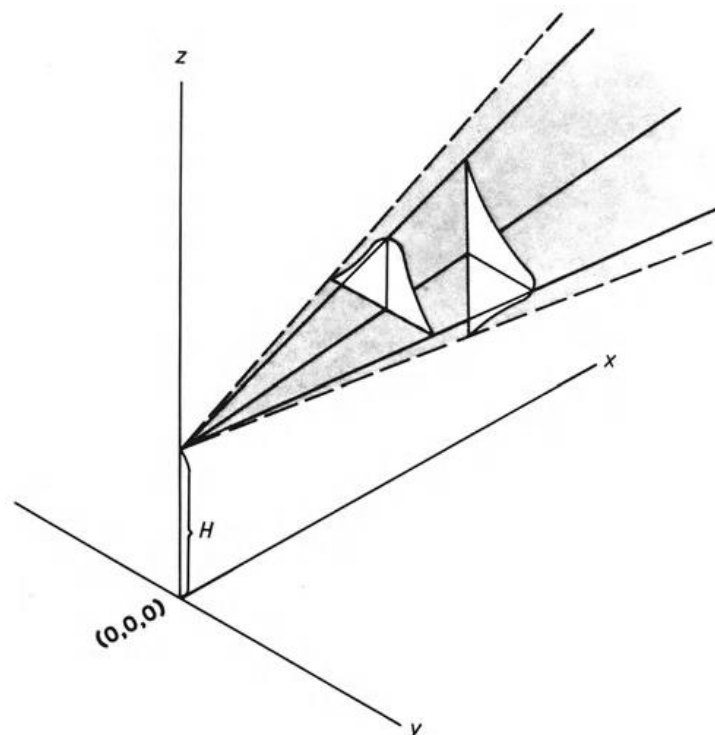
En la naturaleza, existe una gran cantidad de compuestos orgánicos volátiles que son detectados y reconocidos por los insectos. Estos estímulos olfativos, u olores, que provienen de fuentes de alimento, plantas o aquéllos involucrados en la comunicación se presentan en

formas de mezclas complejas (Pyrski y Zufall 2009). La percepción de una mezcla puede estar dominada por el componente saliente o puede adquirir propiedades particulares. Así, la percepción de una mezcla puede ser configurada, cuando la mezcla es cualitativamente diferente de sus componentes individuales aislados, o elemental, cuando los componentes individuales siguen siendo reconocidos (Renou 2014). Desde la perspectiva de la ecología química, hay consenso en que los insectos no necesitan evaluar todos los componentes individuales para reconocer una mezcla de olores (Riffell et al. 2009). Además, la generalización permite a los animales continuar reconociendo un estímulo olfativo complejo que es diferente pero similar en su composición (Shepard 1987; Ghirlanda y Enquist 2003). Es probable que los sistemas olfativos de los animales hayan sido favorecidos por la selección natural para utilizar características específicas de los estímulos olfativos complejos para su identificación. Este aspecto es esencial para comprender el comportamiento de forrajeo de los insectos, ya que los individuos pueden ser capaces de reconocer estímulos olfativos que caracterizan el mismo tipo de fuente de alimento pero que pueden diferir ligeramente de un encuentro a otro o con el tiempo (Pham-Delegue et al. 1993; Wright y Smith 2004).

### **1.3 Dispersión del olor**

Las partículas volátiles del olor se dispersan desde la fuente, por lo que la concentración del olor en el aire disminuye con la distancia (Elkinton y Cardé 1984). En la naturaleza, los estímulos olfativos tienen una conformación espacio-temporal que varía a medida que el olor se va propagando, lo que se conoce como pluma de olor. La capacidad de insectos voladores para seguir un estímulo olfativo discontinuo y localizar su fuente invisible se basa en una estrategia de búsqueda común que consiste en volar “viento cruzado” hasta detectar la pluma de olor y luego realizar vuelos en forma de “oleadas” o “zig-zag” a favor del viento hasta localizar la fuente del estímulo olfativo (Martin et al. 2011) (Fig. 1). La estructura espacio-temporal de la pluma de olor, que implica una variación en concentración a medida que el

olor se aleja de la fuente de liberación, es crucial para la orientación del insecto. Este aspecto es relevante, ya que el mismo compuesto químico puede desencadenar diferentes respuestas comportamentales dependiendo de la concentración (e.g., Rust 1976; Baker y Cardé 1984; Renou 2014). En condiciones de ausencia total de viento, la dispersión del olor ocurre de acuerdo a las leyes de dispersión molecular. No obstante, en condiciones de viento, la dispersión del olor en se produce en forma de pluma que se propaga a favor del viento. Por lo tanto, la concentración del olor es afectada por la velocidad del viento, dado a que, a mayor velocidad del viento, disminuye el espacio activo del olor (i.e. el volumen de aire en el cual la concentración del olor está por encima de la concentración mínima requerida para producir una respuesta en el organismo receptor) (Elkinton y Cardé 1984). La temperatura del aire también puede afectar la dispersión del olor, por ejemplo, al afectar la velocidad de liberación del olor (Elkinton y Cardé 1984).



**Figura 1.** Modelo de tipo Gaussiano de dispersión del olor en condiciones de viento. La concentración del olor disminuye con la distancia del punto de liberación (ilustración de Elkinton y Cardé 1984, in *Chemical Ecology of Insects*).

#### **1.4. Diversidad de estímulos olfativos**

Como se mencionó anteriormente, el animal está inmerso en un mundo de estímulos olfativos de diferente índole, por lo que debe ser capaz de reconocer estímulos relevantes y responder apropiadamente a ellos.

Según el tipo de respuesta comportamental que desencadena, pueden identificarse diferentes tipos de estímulos olfativos. Los *estímulos olfativos atrayentes* son aquéllos que conducen al receptor hacia la fuente de estimulación (Binder et al. 2009). Esta categoría incluye las feromonas de agregación, feromonas sexuales o la feromona de rastro de hormigas. También, olores emanados por el alimento u olores que se volvieron apetitivos al volverse asociados a una recompensa alimenticia por medio de aprendizaje asociativo. Por otra parte, los *estímulos olfativos aversivos* son aquéllos que provocan un deseo de evitación y que alejan al receptor de la fuente de estimulación (Binder et al. 2009). En esta categoría pueden incluirse los volátiles emitidos por la presa como mecanismo de defensa, metabolitos secundarios de plantas que actúan como repelentes de insectos fitófagos, o estímulos que se volvieron repelentes como resultado del condicionamiento aversivo (ver sección 2). Finalmente, también hay *estímulos olfativos neutros* que no desencadenan respuestas de atracción ni de repelencia, pero que son percibidos por el animal y eventualmente pueden adquirir un significado comportamental luego de experiencia apetitiva o aversiva con el olor (Giurfa et al. 2015).

Dependiendo de si están exclusivamente involucrados o no en la comunicación entre individuos, los estímulos olfativos también pueden ser categorizados como *claves* o *señales*. Si bien las claves pueden mediar procesos de transferencia social (Seeley 1995), estas

constituyen cualquier estímulo olfativo que guíe comportamiento del insecto como, por ejemplo, búsqueda de alimento, navegación, oviposición, entre otros. Por otra parte, se consideran señales a cualquier estructura comportamental, fisiológica o morfológica que ha sido moldeada por la selección natural para mediar la comunicación entre individuos, como por ejemplo, las feromonas (Otte 1974). Las feromonas son compuestos sintetizados por el individuo que participan en la comunicación entre individuos de una misma especie como, por ejemplo, la feromona de alarma en abejas o la feromona de rastro en hormigas (Mustaparta 1984; Ginzl 2010).

Aunque muchos olores pueden desencadenar respuestas comportamentales que parecen fijas o fuertemente determinadas, los insectos, y en particular los insectos sociales, la respuesta a olores puede ser modulada por varios factores. Se conocen diferentes factores que pueden influenciar la respuesta a un determinado estímulo olfativo. Como se mencionó en la sub-sección anterior (1.3 dispersión del olor), el nivel de respuesta y valencia (e.g., atracción o repelencia) puede depender de la *concentración del olor*. A su vez, creciente evidencia demuestra que el contexto de percepción puede influir en la respuesta a estímulos olfativos. Por ejemplo, estudios han demostrado que la valencia de un olor (atractivo o aversivo) en *Drosophila melanogaster* puede depender del contexto olfativo (Badel et al. 2016). Un reciente estudio en abejorros (*Bombus impatiens*) demuestra que la feromona de alarma emitida por la reina madura es capaz de inhibir la reproducción de las obreras sólo cuando esta acompañada de la presencia visual de la reina y de las crías que produce, es decir, cuando se presenta en un contexto complejo “realista” (Orlova y Amslam 2021). La respuesta a olores también puede ser modulada por el *estado interno* de un animal, como la edad, el estado de alimentación y de apareamiento, entre otros. Por ejemplo, se ha demostrado que la significancia de una feromona sexual puede cambiar de atracción a inhibición luego del apareamiento (Gadenne et al. 2001; Barrozo et al. 2010). Otro factor que también puede modular el comportamiento olfativo y que ha recibido creciente atención a lo largo de las últimas décadas es la experiencia (Renou et al. 2014).

## 2. Rol de la experiencia en la respuesta a claves olfativas

Durante el forrajeo, los animales lidian constantemente con escenarios cambiantes e impredecibles, y con fuentes de alimento que varían (e.g., su ubicación puede ser sumamente variable en tiempo y espacio). El aprendizaje, definido como un proceso cognitivo que involucra un cambio en el comportamiento como resultado de la experiencia, permite a los animales lidiar con cambios en las circunstancias de forrajeo (Papaj y Prokopy 1989, Shettleworth 2001). La plasticidad comportamental dependiente de la experiencia constituye un componente crucial en el comportamiento olfativo de los insectos y resulta de particular interés en la ecología cognitiva. Existen diferentes mecanismos que influyen en la respuesta de los insectos frente a estímulos olfativos. Algunas especies de insectos, como *D. melanogaster* o la abeja melífera (*Apis mellifera*), han sido utilizadas como modelos para estudios de habilidades cognitivas y sus correlatos neurales (Menzel y Müller 1996; Giurfa 2013, 2015). Existen varios procesos que pueden modular la respuesta a estímulos olfativos, siendo algunos de ellos:

- *Adaptación sensorial.* Los sistemas sensoriales están en continuo cambio en respuesta a los cambios del ambiente. La adaptación puede considerarse como una disminución en el nivel de respuesta de las neuronas a un determinado estímulo como resultado de la exposición sostenida a ese estímulo (Webster 2012). La adaptación sensorial puede considerarse como un cambio perceptual que es dependiente de la experiencia y que actúa previniendo la sobrecarga del sistema sensorial (Hewson y Tarrega 2017). Si bien no hay un mecanismo de aprendizaje involucrado, la adaptación sensorial juega un papel importante entre los factores que modulan la respuesta olfativa ya que puede disminuir el nivel de respuesta a un olor al menos durante algunas decenas de milisegundos o incluso algunos minutos (Kohn 2007).

- *Habitación y sensibilización.* A nivel comportamental, la habitación también provoca una disminución paulatina en el nivel de respuesta a un estímulo luego de la exposición repetida a ese estímulo. A diferencia de la adaptación sensorial, la habitación es

considerada un tipo de aprendizaje; además los efectos de la habituación son más prolongados en el tiempo (Papaj y Prokopy 1989). La sensibilización, por su parte, implica lo opuesto a la habituación, con un aumento gradual de la respuesta a un estímulo a medida que aumenta el número de exposiciones.

- *Aprendizaje asociativo.* Este aprendizaje involucra el establecimiento de una asociación entre dos estímulos (condicionamiento clásico) o entre un estímulo y una respuesta (condicionamiento operante). La asociación se produce como resultado de una contingencia temporal o espacial entre ambos estímulos o entre un estímulo y una respuesta (Papaj y Prokopy 1989). En consecuencia, el comportamiento resultante difiere del comportamiento observado antes la experiencia (Shettleworth 2010). El aprendizaje asociativo tiene la particularidad que involucra la presentación conjunta de dos estímulos: estímulo condicionado e incondicionado (apetitivo o aversivo), mientras que en la habituación y la sensibilización involucran ocurren en ausencia de refuerzo.

El aprendizaje asociativo es ampliamente distribuido en vertebrados e invertebrados y constituye un elemento central del comportamiento de forrajeo en insectos sociales, ya que les permite establecer relaciones predictivas entre eventos contingentes en el ambiente (Giurfa 2007, 2015). De esta manera, un animal puede aprender a asociar diferentes tipos de claves ambientales con la presencia de la recompensa. La fuerza de la asociación y el tipo de memoria resultante (e.g., corto o largo plazo) depende de variables tales como el valor de la recompensa (e.g. calidad/cantidad), la saliencia del estímulo condicionado, el número de experiencias recompensadas, entre otros factores (Hoedjes et al. 2011, 2014). En el contexto apropiado, los animales pueden evocar estas memorias que guiarán la búsqueda de alimento (Menzel 1999, 2009). De esta manera, el aprendizaje asociativo puede conducir a que un estímulo neutro adquiera una relevancia comportamental para el animal al volverse un predictor de la recompensa. Estos mecanismos asociativos también pueden otorgar un grado de flexibilidad en la respuesta de los insectos a estímulos que desencadenan respuestas que parecen fuertemente determinadas, como las ciertas feromonas (Hartlieb et al. 1999; Benelli



et al. 2014). Incluso, la valencia de un determinado estímulo (atractividad o aversión intrínseca) puede ser radicalmente modificada por medio de mecanismos asociativos (Benelli et al. 2014; Vinauger et al. 2014, 2016; Mengoni et al. 2017).

Los paradigmas empleados para el estudio del aprendizaje asociativo se basan en la observación de las respuestas comportamentales de un sujeto frente al olor antes y después de la experiencia. En el caso de los estímulos olfativos, estos estudios a menudo consisten en medir la habilidad del animal para percibir, discriminar, preferir o evitar olores que fueron presentados anteriormente (Gheusi 2009). Una metodología para evaluar el aprendizaje asociativo es la observación del repertorio comportamental exhibido por el animal frente a la presentación del estímulo solo (i.e. en ausencia de recompensa). Teniendo en cuenta que en el condicionamiento apetitivo se busca que el olor se vuelva un predictor de la recompensa, la sola presentación del estímulo condicionado (e.g. olor) debería desencadenar respuestas comportamentales similares a las que desencadena la recompensa (e.g., acercamientos, aterrizajes, consumo) (Shettleworth 2010). Las metodologías usadas dependen del tipo de insecto y los estímulos a evaluar, siendo algunas de ellas el uso de laberintos en forma de Y (útiles en el caso de insectos no voladores), las arenas de vuelo experimentales (Menzel y Giurfa 2001), o aquellas basadas en el reflejo de extensión de la probóscide (PER) que son ampliamente utilizadas en *A. mellifera* (Giurfa 2007).

### **3. Estímulos olfativos y plasticidad comportamental en el manejo de insectos plaga**

Un insecto es considerado una plaga cuando sus poblaciones generan algún impacto negativo sobre recursos de valor para los seres humanos o sobre la salud. En el contexto actual del siglo XXI, en el cual existe una presión por parte de los consumidores para abandonar el uso de insecticidas clásicos sintéticos, adquieren cada vez más relevancia las nociones de manejo integrado de plagas (Dara 2019). Teniendo en cuenta que la erradicación de las plagas exóticas puede resultar extremadamente costosa y en muchos casos imposible, la única

alternativa viable resulta la de aplicar un manejo integral de las plagas con la finalidad de reducir sus poblaciones a niveles que causen el menor daño posible y reducir los impactos negativos que estas provocan. Entre las diferentes estrategias para el manejo de plagas se incluyen el: manejo cultural, manejo comportamental, control biológico, control mecánico, control químico que incluye no sólo los tradicionales insecticidas sintéticos, sino también químicos de origen microbiano o botánico.

Si bien la apropiada aplicación de cualquiera de estas técnicas implica un conocimiento profundo sobre aspectos claves de la biología, ecología y comportamiento de las especies consideradas plaga, las estrategias de manejo basadas en la manipulación del comportamiento de la plaga requieren un conocimiento más detallado sobre el comportamiento que ocasiona los perjuicios (e.g., oviposición, forrajeo). Este método consiste en el manejo de insectos plagas por medio del uso de ciertos estímulos capaces de estimular o inhibir un comportamiento de interés. En general, los estímulos que predominan son los químicos, ya sea repelentes o atrayentes, que actúan en largas distancias o compuestos disuasivos o estimuladores que actúan más bien en un rango muy corto (Foster y Harris 1997). El *método de disrupción del comportamiento* se basa en el uso de compuestos químicos atrayentes o repelentes con el propósito de modificar el comportamiento de orientación de los insectos. Los compuestos *atrayentes* son usados con frecuencia en el método de disrupción sexual (por ejemplo, utilizado en lepidópteros) y tienen como finalidad evitar que los machos encuentren a las hembras (e.g., Rothschild 1981). Por otra parte, los *repelentes* son empleados con el fin de evitar que la plaga encuentre el recurso que se desea proteger. Los compuestos repelentes pueden ser de origen vegetal (Nerio et al. 2010; Maia y Moore 2011) o sintéticos como el DEET, un repelente ampliamente utilizado para evitar picaduras de insectos hematófagos como mosquitos (Rutledge et al. 1978). También hay compuestos *disuasivos* que actúan una vez que el insecto hace contacto con la fuente. Se aplican directamente sobre el recurso a proteger y tienen la función de prevenir/reducir la alimentación o la oviposición. Por otra parte, los estimulantes son compuestos que favorecen

la alimentación u oviposición, con el fin de incrementar la exposición a alguna sustancia tóxica que tiene la función de controlar al insecto. En ciertos casos, el uso combinado de los métodos mencionados anteriormente puede lograr un aumento de la eficacia individual, por ejemplo, por medio de estrategias “push-pull”. Esta estrategia consiste en hacer que el recurso a proteger sea poco atractivo o inadecuado para la plaga (“push”) mientras que la misma es conducida hacia algún recurso atractivo (“pull”) donde luego es removida. Los estímulos “push” son a menudo compuestos químicos que actúan como repelentes o disuasivos, mientras que los estímulos “pull” suelen ser compuestos químicos atrayentes altamente volátiles como feromonas sexuales, de agregación u otros semioquímicos. La ventaja de esta estrategia es que la combinación de estímulos permite mejorar la eficacia debido a efectos sinérgicos o aditivos (Cook et al. 2007).

Este método basado en la manipulación comportamental de la plaga mediante diferentes tipos de estímulos olfativos atrayentes y repelentes, es más susceptible de ser afectado por las habilidades de aprendizaje del insecto. Los mecanismos como la habituación y el aprendizaje asociativo enumerados en la sección anterior pueden modular la respuesta del insecto frente a estímulos olfativos (Prokopy y Lewis 1993). El aprendizaje asociativo podría afectar negativamente la eficacia de un repelente, por ej., cuando un olor que inicialmente desencadena una respuesta repelente luego se vuelve atractivo como resultado de la experiencia apetitiva con el olor, afectando su eficacia, como se ha demostrado en mosquitos (e.g., Vinauger et al. 2014). Por el contrario, el aprendizaje asociativo de un olor podría favorecer un método de manejo, por ej. al promover la formación de una memoria apetitiva del olor que luego favorezca el consumo de un recurso más valioso que el recurso a proteger o incluso al aumentar la ingesta de fuentes de alimento con insecticida.

La necesidad de integrar el aprendizaje al manejo de plagas adquiere una relevancia particular en el caso de los insectos sociales considerados plaga. Los insectos sociales en general se caracterizan por sus habilidades de aprendizaje individual y social. Ciertas especies de hormigas, como la hormiga argentina (*Linepithema humile*) (Human y Gordon 1996;

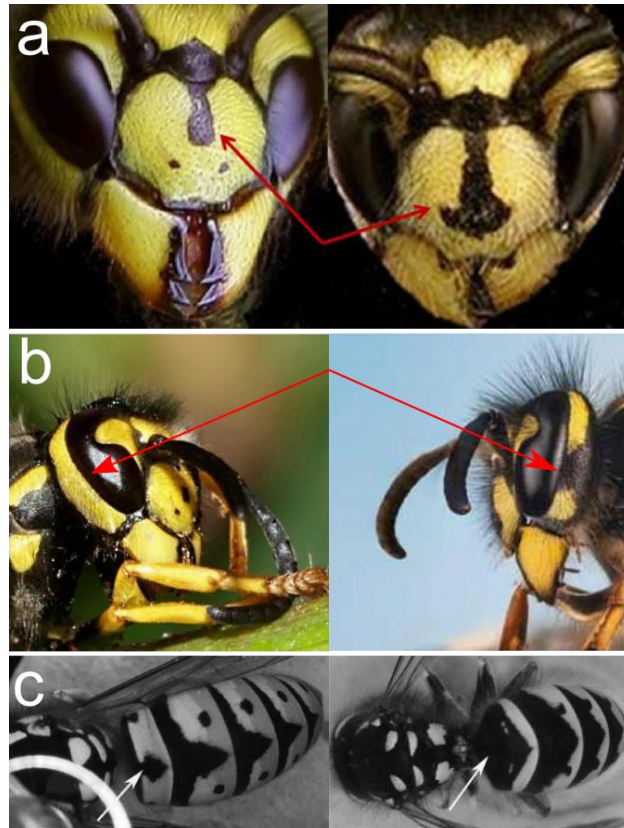
Touyama et al. 2003); avispas, como la chaqueta amarilla (*Vespula germanica* y *V. vulgaris*) (Bacandritsos et al. 2006; Beggs et al. 2011), avispones, como el avispon asiático gigante (*Vespa mandarinia* y *V. velutina*) (Monceau et al. 2014; Laurino et al. 2019; Alaniz et al. 2021), y abejorros (*B. terrestris*) (Kenta et al. 2007; Morales et al. 2013) se han vuelto importantes plagas urbanas y agrícolas que a su vez impactan en los ecosistemas donde han logrado establecerse y propagarse. En este contexto resulta sumamente valioso profundizar el conocimiento sobre cómo la respuesta a estímulos olfativos puede ser modulada por el aprendizaje y, a su vez, o así también cómo estos cambios impactan en la toma de decisiones en un contexto realista (natural).

#### **4. La avispa *Vespula germanica* como modelo de estudio**

##### **4.1. Una breve síntesis de su invasión**

El aumento del tráfico marítimo y terrestre durante los últimos 200 años ha favorecido la dispersión de numerosas especies alrededor del globo, impulsando procesos de invasión a escala global (Liebhold y Tobin 2008). Algunas especies no sólo lograron establecerse en las nuevas áreas, sino que además se expandieron considerablemente causando impactos negativos ecológicos o económicos, volviéndose especies invasoras (Simberloff et al. 2013). Este fue el caso de algunas especies pertenecientes a diferentes taxa de insectos sociales, como hormigas (e.g., la hormiga argentina, *L. humile* y la hormiga de fuego *Solenopsis invicta*) abejas y abejorros (e.g., los abejorros *B. terrestris* y *B. ruderatus*, la abeja africana *A. mellifera scutellata* y sus híbridos) y avispas (la avispa común y la avispa “chaqueta amarilla”, *V. vulgaris* y *V. germanica*; y el avispon asiático *V. mandarinia*). Dentro de este último grupo, la avispa *Vespula germanica*, cuya área de distribución nativa abarca Eurasia y norte de África, logró invadir diferentes regiones templadas tales como Nueva Zelanda,

Australia, Sudáfrica, Norteamérica, Argentina y Chile (Thomas 1960; Spradbery 1973; MacDonald et al. 1980; Archer 1988; Akre et al. 1989; Tribe y Richardson 1994). Algo similar ocurrió con la avispa común, *V. vulgaris*, y hoy en día ambas especies son simpátricas en muchas de estas áreas invadidas. En Argentina, el primer reporte de la presencia de *V. germanica* fue en el año 1980, en la localidad de Andacollo en la provincia de Neuquén (Willink 1980; Beggs et al. 2011). Actualmente, *V. germanica* se encuentra ampliamente distribuida en la región centro-sur del país, desde la provincia de Neuquén hasta Santa Cruz, principalmente abarcando el área de la provincia fitogeográfica subantártica que se caracteriza por su clima templado/frío y húmedo. No obstante, también es posible encontrarla en áreas más áridas como la costa atlántica patagónica y el sur de Mendoza (Masciocchi y Corley 2013). En el año 2010 se reportó por primera vez la presencia de *V. vulgaris* (Masciocchi et al. 2010). Los individuos de *V. germanica* y *V. vulgaris* pueden distinguirse relativamente fácil al observar la región frontal de la cabeza, donde *V. vulgaris* presenta una mancha negra con forma de “ancla” que no está presente en *V. germanica*. Desde una vista lateral de la cabeza, *V. vulgaris* posee una mancha negra al costado del ojo que tampoco está presente en *V. germanica*. Por último, si se observa dorsalmente el abdomen de ambas especies, el primer segmento del gáster de *V. germanica* tiene una mancha negra con forma de flecha, mientras que *V. vulgaris* tiene una mancha expandida basalmente (Masciocchi et al. 2010) (Fig. 2). Actualmente, estas especies de avispas sociales exóticas coexisten en nuestro país y representan una amenaza tangible sobre las comunidades de artrópodos de la región y sobre ciertas actividades económicas, como la fruticultura y la apicultura.



**Figura 2.** Principales diferencias morfológicas entre obreras de *Vespula germanica* (izquierda) y *V. vulgaris* (derecha). Mancha negra con forma de “ancla” en *V. vulgaris* que está ausente en *V. germanica* (a). Mancha negra al costado del ojo *V. vulgaris* que está ausente en *V. germanica* (b). Primer segmento del gáster de *V. germanica* tiene una mancha negra con forma de flecha, mientras que *V. vulgaris* tiene una mancha expandida basalmente (c). (Modificado de Masciocchi et al. 2010)

#### 4.2. Aspectos generales sobre su biología y alimentación

Dentro de la familia Vespidae, las especies que mayor éxito han tenido en volverse invasoras y a su vez las que generan mayores daños, comparten un rasgo en común: su eusocialidad.

Dentro de esta familia es posible encontrar especies solitarias y sociales, con diferentes grados de comportamiento social. Sin embargo, las especies que exhiben el más avanzado grado de organización social dentro del reino animal se agrupan dentro de la subfamilia Vespinae, que incluye a las avispa sociales (Géneros *Vespula* y *Dolichovespula*) y a los avispones (género *Vespa*). El hecho de que sean eusociales implica que los individuos viven

agrupados en colonias y donde existe superposición de dos o más generaciones. El número de individuos por colonia puede variar considerablemente entre especies o incluso dentro de la misma especie, y generalmente oscila entre los cientos a los miles de individuos, como por ejemplo en los géneros *Vespula* y *Vespa*. A su vez, existe división de labor entre los individuos de la colonia: la función de reproducción es exclusivamente llevada a cabo por los individuos reproductores (reina y zánganos), mientras que el resto de las tareas indispensables para el desarrollo y mantenimiento de la colonia (i.e., construcción del nido, cuidado de las crías, búsqueda de alimento y defensa) son efectuadas por las obreras (hembras estériles). Tal división del trabajo dentro de la colonia puede ir acompañada de diferencias morfológicas entre los individuos, dando origen a diferentes castas (i.e., polimorfismo). Por ejemplo, las reinas de *V. germanica* y *V. vulgaris* son similares a las obreras en su morfología, pero poseen un tamaño considerablemente mayor. Los zánganos también suelen ser más grandes que las obreras y además poseen antenas prominentes, un abdomen más largo y sin aguijón (Fig. 3). En las avispas, al igual que en abejas y hormigas, la determinación del sexo es por haplodiploidía: los huevos fecundados (i.e., diploides) dan origen a hembras que luego se diferenciarán en reinas y obreras, mientras que los huevos no fecundados (i.e., haploides) darán origen a los machos. La posterior diferenciación de castas está determinada por la cantidad de alimento que la larva recibe durante los primeros días de desarrollo, contrariamente a lo que ocurre en abejas, en las cuales la diferenciación está determinada por el tipo de alimento recibido (Edwards 1980).



**Figura 3.** Diferencias morfológicas generales entre las diferentes castas de *V. germanica*

En cuanto a su desarrollo, las colonias de avispas eusociales típicamente tienen un ciclo de vida anual que comienza durante la primavera y culmina a fines del otoño con la muerte de las últimas obreras. A comienzos/mediados de la primavera, las reinas fecundadas emergen de su estado de hibernación y abandonan su sitio de resguardo en busca de un sitio apropiado para la construcción de las primeras celdas. En *Vespula* spp., los nidos son en su mayoría subterráneos (Fig. 4), aunque en algunos casos pueden ser construidos dentro de paredes de viviendas o en lugares cerrados y oscuros. Tanto las celdas como su envoltura son construidas a partir de una pasta a base de fibras de celulosa y saliva. Durante este periodo de inicio del nido, la reina fundadora lleva a cabo la totalidad de las tareas necesarias para el cuidado de las crías y el mantenimiento del nido hasta el nacimiento de las primeras obreras, las cuales pasarán a desempeñar esas tareas. En avispas sociales, al igual que en otros himenópteros eusociales como *A. mellifera*, las actividades desempeñadas por las obreras durante su vida varían de acuerdo a su edad: al comienzo actúan como nodrizas, luego abandonan la colonia para cumplir una función como forrajeras (ya sea de agua, pulpa de celulosa, proteínas o sustancias azucaradas) y al final de su vida se dedican a la protección del nido. Durante comienzos del verano, la colonia experimenta un periodo de rápido crecimiento hasta que alcanza su máximo tamaño a finales del verano. Durante esta época, la actividad de las forrajeras es máxima y comienza la producción de los individuos reproductivos que dará origen a las nuevas reinas vírgenes y zánganos que luego abandonan el nido para copular. Una vez producida la cópula, las hembras inseminadas buscarán un sitio con las condiciones adecuadas para protegerse hasta la primavera siguiente, cuando salen de su estado de diapausa y el ciclo inicia nuevamente. La antigua reina, junto con las obreras y los zánganos, mueren a finales del otoño.





**Figura 4.** Nido subterráneo de *V. germanica*

Las avispas sociales del género *Vespula* son predadoras oportunistas y carroñeras. Su dieta se basa en recursos ricos en carbohidratos y en proteínas, que pueden obtener de maneras muy variadas y de fuentes de origen natural y/o antrópico. Las sustancias azucaradas son la fuente primaria de alimento para los adultos y son obtenidas del néctar, la pulpa de frutos, miel, exudados de áfidos o incluso de alimentos humanos o basura. Por otra parte, las proteínas constituyen el principal recurso para las crías en desarrollo y, en especies como *V. germanica* y *V. vulgaris*, pueden ser obtenidos de dos formas: por medio de la caza de artrópodos pequeños o de la carroña. Además de alimento, las forrajeras también recolectan agua y pulpa de madera que se emplea para la construcción del nido y para la refrigeración del mismo durante días calurosos.

Una vez que el alimento es ingresado al nido por las forrajeras, es distribuido a las larvas, la reina y demás obreras por las nodrizas. El alimento sólido es previamente masticado y luego distribuido a las larvas. No obstante, el intercambio también ocurre en dirección contraria por medio de un mecanismo conocido como trofalaxia. A cambio de alimento, las obreras nodrizas obtienen de las larvas una gota de líquido rico en carbohidratos (Edwards 1980). La trofalaxia también ocurre entre adultos (e.g., entre obreras, de obrera a reina o de

obrero a zánganos). Este mecanismo, que también ocurre en abejas y hormigas, es esencial para el mantenimiento de la colonia como unidad y además sirve como vía de transferencia de información (e.g., feromonas y otras claves relacionadas al alimento) (Farina et al. 2005; Provecho y Josens 2009).

Si bien tanto los hidratos de carbono como las proteínas son requeridos durante todo el ciclo de vida de la colonia, se ha demostrado que la motivación de las forrajeras por cada tipo de recurso varía considerablemente de acuerdo a la fenología de la colonia. Por ejemplo, estudios llevados a cabo en Patagonia argentina con poblaciones de *V. germanica* demostraron que el número de avispas forrajeando recursos proteicos (carne vacuna) alcanzó su pico máximo a mediados de marzo (Sackmann y Corley 2007). Esta mayor actividad de forrajeo en proteínas coincide con el momento en que inicia la producción de las futuras reinas y machos.

#### 4.3. Comportamiento de forrajeo y plasticidad comportamental

Dada su eusocialidad, el forrajeo en *Vespula germanica* es una tarea que se realiza a dos niveles: el colectivo y el individual. Las avispas eusociales poseen mecanismos de comunicación social que le permiten incrementar la eficiencia en la explotación de recursos transitorios. A pesar de que los véspidos carecen de sistemas de comunicación complejos similares a los observados en abejas sociales y hormigas, se ha demostrado comunicación en el nido en varias especies de la familia (e.g., Overmyer y Jeanne 1998; Schueller et al. 2010; Taylor et al. 2010; Wilson-Rankin 2014; Santoro et al. 2015; Lozada et al. 2016). Se ha demostrado que claves olfativas relacionadas al alimento y adquiridas durante la trofalaxia motivan a conespecíficas a abandonar el nido en búsqueda de la fuente de alimento (Overmyer y Jeanne 1998; Jandt y Jeanne 2005). Por otra parte, también se ha encontrado que especies como *V. germanica* y *Polybia occidentalis* incrementan su eficiencia de forrajeo mediante incremento local (“local enhancement”) (Thorpe 1956), un tipo de reclutamiento

que ocurre en el campo y que es mediado por claves visuales y olfativas de las conoespecíficas (Raveret Richter y Tisch 1999; D'Adamo et al. 2000, 2001, 2003, 2004; D'Adamo y Lozada 2005; Hrnčir et al. 2007; Jeanne y Taylor 2009). El componente individual del comportamiento de forrajeo en avispas eusociales es muy fuerte debido a que las proteínas necesarias para el desarrollo de las larvas son obtenidas mediante la caza de pequeños artrópodos y también de la carroña, cuya aparición puede considerarse un evento impredecible. Diversos estudios han demostrado que el comportamiento de forrajeo en *V. germanica* es guiado fuertemente de la experiencia previa y que las forrajeras exhiben notables habilidades de aprendizaje y memoria que les permiten incrementar el éxito en la explotación de recursos (Raveret Richter 2000; Lozada y D'Adamo 2014).

La mayor parte de la investigación sobre las habilidades de aprendizaje y memoria a nivel individual en *V. germanica* se ha llevado a cabo durante el forrajeo de carroña. La carroña típicamente es un recurso impredecible, pero, una vez localizado, se comporta como una fuente de alimento relativamente estacionaria desde el punto de vista espacial temporal. Por lo tanto, las avispas deben ser capaces de retornar reiteradas veces a la fuente para recolectar las proteínas necesarias para el desarrollo de las larvas (Takagi et al. 1980, Raveret Richter y Jeanne 1985; Raveret Richter 2000). Este comportamiento de relocalización de fuentes abundantes de proteínas no solo constituye un componente esencial del comportamiento de forrajeo de *Vespula* spp., sino que también es bastante singular en relación otros insectos sociales, lo que lo convierte en un escenario interesante para el estudio de la plasticidad comportamental.

El comportamiento de relocalización de fuentes de carroña de *V. germanica* ha sido objeto de estudio de numerosas investigaciones (e.g., D'Adamo y Lozada 2007, 2008, 2009, 2011; Lozada y D'Adamo 2006, 2009, 2011, 2014; Moreyra et al. 2007, 2012, 2014; Buteler et al. 2016) como así también en otras especies de véspidos (Jeanne y Taylor 2009), los cuales demostraron que existen complejos mecanismos cognitivos implicados en la relocalización de una fuente abundante de carroña donde la experiencia juega un papel central en la toma de

decisiones. La mayoría de estos estudios se han enfocado en claves visuales/espaciales. Cuando las avispas abandonan la fuente de alimento por primera vez, realizan una serie de vuelos especializados a través de los cuales aprenden claves visuales/espaciales asociadas a la ubicación espacial del alimento (Collett y Baron 1995; Zeil et al. 1996; Collett y Rees 1997). Un estudio reciente en *V. germanica* observó que la frecuencia de vuelos de aprendizaje decrece luego de la primera visita de recolección, pero que se incrementan luego de una modificación en la configuración espacial de las claves asociadas a la fuente de alimento (e.g., desplazamiento del alimento), sugiriendo que estos vuelos están involucrados en el aprendizaje espacial y que son fundamentales para el retorno de la avispa a la fuente (Moreyra et al. 2012). Las forrajeras de *V. germanica* son capaces de recordar el micro-sitio aprendido con gran precisión (D'Adamo y Lozada 2011, 2014; Lozada y D'Adamo 2014), incluso luego de 24 horas (Moreyra et al. 2017).

Una característica del comportamiento de forrajeo de *V. germanica* durante la explotación de carroña es el peso de la primera experiencia de recolección. Durante la primera visita de recolección es cuando ocurre el aprendizaje de las claves visuales/contextuales relevantes que luego guiarán el retorno de la avispa al recurso. Se ha demostrado que una sola visita de recolección es suficiente para que las avispas identifiquen el lugar aprendido con gran precisión (e.g., Lozada y D'Adamo 2014). También se ha visto que una simple visita de recolección puede influenciar fuertemente las preferencias de alimento en la visita posterior (Moreyra et al. 2018). Recientemente, en un estudio se demostró que el primer episodio de aprendizaje puede interferir negativamente con el subsecuente aprendizaje de una nueva clave contextual (Moreyra et al. 2020).

Varios estudios también han demostrado que las decisiones de forrajeo en *V. germanica* son guiadas fuertemente por su experiencia previa (Moreyra et al. 2014, 2016; Moreyra y Lozada 2018). Al analizar la respuesta de las avispas frente a un desplazamiento de la fuente de alimento, se observó que las forrajeras de *V. germanica* retornaron al micro-sitio aprendido y desplegaron una búsqueda sistemática sobre el lugar aprendido hasta que

finalmente encontraron la fuente. Interesantemente, el tiempo que demoraron en localizar nuevamente la fuente desplazada fue mayor en avispas con mayor nivel de experiencia, sugiriendo que la experiencia previa puede retrasar la detección de nuevas fuentes de alimento (Lozada y D'Adamo 2011). Un patrón similar se observó cuando las avispas retornaron al lugar y encontraron que el alimento había sido removido. En este caso, las autoras notaron que la duración de la respuesta de búsqueda fue mayor en avispas con mayor nivel de experiencia, y sugirieron que esta habilidad de extinguir diferencialmente la memoria de una asociación estaría relacionada al grado de la incertidumbre del recurso que están explotando (Lozada y D'Adamo 2006). El impacto de la experiencia también fue evaluado en relación a la toma de decisiones. Por ejemplo, se ha demostrado que, ante dos fuentes de alimento idénticas, las avispas tienden a preferir aquélla situada en el micro-sitio aprendido (e.g., Moreyra et al. 2014, 2017; Moreyra y Lozada 2018). Interesantemente, en otro estudio en el que se analizó la preferencia por dos fuentes de alimento que diferían entre sí en términos de cantidad alimento, se observó que las avispas experimentadas prefirieron en mayor medida la fuente pequeña de alimento cuando ésta estuvo localizada en el sitio aprendido, un patrón opuesto al de las avispas sin experiencia, las cuales mostraron una fuerte preferencia por la fuente de mayor tamaño (Moreyra y Lozada 2018).

Si bien la plasticidad comportamental de *V. germanica* ha sido bastante explorada en relación a claves visuales/espaciales, las claves olfativas han recibido considerablemente menos atención. Los olores desempeñan un rol primario en la detección de nuevas fuentes de alimento a distancia. Asimismo, permiten la discriminación de fuentes apropiadas de aquéllas potencialmente nocivas y también están involucrados en los mecanismos de reclutamiento en el nido o en procesos de atracción intraespecífica como el incremento local. En comparación con otros insectos sociales como abejas y hormigas, muy pocos son los estudios que han evaluado el aprendizaje de estímulos olfativos en vespídos. Se ha demostrado que las avispas de papel son capaces de formar asociaciones apetitivas entre olores y una recompensa basada en carbohidratos (McPheron y Mills 2007; Elmquist y Landolt 2018). El aprendizaje

asociativo de olores también fue demostrado en *Vespula* spp. (El-Sayed et al. 2018) y posteriormente en *V. velutina*, que además posee la habilidad de formar memorias olfativas de largo plazo (Gong et al. 2019). A pesar del rol que desempeñan las avispas eusociales en los ecosistemas y su relevancia como especies plaga en muchas áreas invadidas, su plasticidad comportamental en relación a estímulos olfativos se mantiene como un campo relativamente inexplorado.

#### 4.4 Estrategias actuales de manejo

La avispa *V. germanica* posee una picadura dolorosa para los humanos y puede interferir durante las actividades al aire libre debido a que son atraídas por la comida (Clapperton et al. 1989). Cuando están presentes en altas densidades, estas avispas también pueden ocasionar un impacto negativo en ciertas actividades productivas como la apicultura (Bacandritsos et al. 2006; Beggs et al. 2011). Las estrategias de manejo más empleadas hoy día para el control de *Vespula* spp. se basan fuertemente en su comportamiento de forrajeo. Los métodos de control más utilizados en la actualidad son las trampas cebadas y los cebos tóxicos a base de insecticidas no detectables (Beggs et al. 2011). Las trampas caseras que utilizan carne como cebo varían en eficacia y deben ser reemplazadas cada dos o tres días. Por otra parte, aunque los cebos tóxicos a base de fipronil han sido evaluado con éxito para el control vespídidos plaga (Harris y Etheridge 2001; Sackmann et al. 2001; Hanna et al. 2012), estos insecticidas sintéticos resultan tóxicos para el ser humano y para organismos no-blanco como aves de presa, organismos acuáticos e insectos benéficos (Balança y Del Visscher 1997; Mohamed et al. 2004; Gunasekara et al. 2007).

Recientemente, han surgido diversos estudios que plantean el uso de repelentes a base de compuestos vegetales como una potencial herramienta para el manejo de avispas invasoras (Zhang et al. 2013; Boevé et al. 2014; Buteler et al. 2016). Por su comportamiento de

forrajeo, las avispas de *V. germanica* interfieren con diversas actividades humanas al aire libre al verse atraídas por la comida y restos de basura. De este modo, el uso de repelentes que mantengan alejadas a las avispas de hogares y áreas recreacionales podría contribuir a disminuir notablemente las molestias ocasionadas por este insecto (Buteler et al. 2016).

Ciertos compuestos derivados de plantas, como los aceites esenciales, contienen metabolitos secundarios que están involucrados en la defensa de las plantas contra insectos fitófagos, pudiendo actuar como repelentes, disuasivos de la alimentación incluso contra insectos predadores (Maia y Moore 2011). Se ha encontrado que diversos aceites esenciales actúan como repelentes contra véspidos al promover respuestas aversivas hacia cebos tratados con estos productos (Boevé et al. 2014; Buteler et al. 2016). Buteler y colaboradores (2016) reportaron el efecto repelente de cinco aceites esenciales en *V. germanica* y analizaron su influencia sobre la relocalización de la fuente de alimento. Estos investigadores encontraron que las avispas con experiencia previa de forrajeo evitaron aterrizar sobre los cebos cuando éstos habían sido tratados con aceites esenciales. Inclusive, en aquellos casos en los cuales las avispas lograron aterrizar, el tiempo de manipulación se incrementó notablemente y en ocasiones abandonaron la fuente sin recolectar alimento.

El uso de repelentes a base de aceites esenciales parece ser una estrategia de manejo prometedora que podría contribuir a disminuir los perjuicios causados por las avispas. Sin embargo, para estimar su potencial y modo de uso en estrategias de manejo de las avispas plaga, un aspecto esencial es conocer de qué manera la plasticidad comportamental de las avispas puede interferir con la respuesta a estos olores aversivos. El primer paso para ello es ampliar nuestro conocimiento sobre el rol del aprendizaje en la respuesta a estímulos olfativos en general.

## 5. Objetivos y estructura de la tesis

En esta tesis me propuse profundizar el conocimiento sobre la importancia de claves olfativas en el forrajeo de *V. germanica*, con énfasis en los olores aversivos dado su potencial como herramienta de manejo, y al mismo tiempo analizar el rol de la experiencia en la respuesta a olores en general.

En el **capítulo 2** evalué cómo la presencia de un olor aversivo en las inmediaciones de una fuente de alimento interfiere con el comportamiento de forrajeo de las avispas a fin de evaluar su potencial como herramienta de manejo. Para esto, llevé a cabo un enfoque a dos niveles. Primero, analicé la respuesta de las avispas a nivel individual y colectivo, frente a un cebo proteico tratado con un repelente novedoso proveniente de una planta nativa de Sudamérica (*Dysphania multifida*, “paico”) bajo escenarios de elección y no-elección. Posteriormente, analicé la eficacia de un repelente (aceite esencial de *Lavandula angustifolia*) en la prevención de los ataques de avispas a colmenas de *A. mellifera* en apiarios de la Patagonia.

En el **capítulo 3** analicé si el aprendizaje asociativo puede modular la respuesta de las avispas a un olor aversivo (aceite esencial de lavanda) y cuál es el impacto en las decisiones de forrajeo a fin de saber cómo el efecto repelente puede ser modulado por la experiencia. Por un lado, evalué si la experiencia de forrajeo en presencia de olor puede conducir en un cambio en la subsecuente respuesta al olor. Luego analicé la persistencia de dichos cambios en la respuesta al evaluar la robustez de la memoria resultante de dicha asociación en avispas con diferente nivel de experiencia (i.e., número de visitas) con el olor. Al mismo tiempo, exploré cómo los cambios en la respuesta al olor impactan en las decisiones de forrajeo de las avispas en términos de preferencia y de decisiones de consumo.

En el **capítulo 4** analicé si el uso de claves olfativas para la búsqueda del alimento depende de si las avispas están localizando o relocalizando la fuente de alimento, en otras palabras, investigué si la memoria espacial puede interferir con el uso de olores. Usando



olores con diferente relevancia comportamental, analicé el rol del olor en la respuesta de orientación de las avispas bajo tres escenarios: localización del alimento por avispas sin experiencia, localización de una fuente estacionaria y localización de una fuente que ha sido desplazada del lugar previamente aprendido.

En el **capítulo 5** profundicé en los factores que modulan el aprendizaje asociativo de olores al analizar el rol de la primera experiencia con la fuente en el aprendizaje de un olor a lo largo de las sucesivas visitas de recolección. Los experimentos consistieron en evaluar la fuerza de la memoria asociativa que resultó de la adición de un estímulo olfativo neutro (vainilla) en diferentes momentos del forrajeo. Primero, analicé la fuerza de la asociación de un olor que fue agregado en diferentes visitas, con el propósito de estudiar si la primera experiencia de recolección puede interferir con el posterior aprendizaje de un olor novedoso. En una segunda instancia, centrándome sólo en la primera visita, analicé la importancia del primer encuentro de la avispa con la fuente en el establecimiento de la asociación. Por último, evalué si un primer encuentro aislado con la fuente es suficiente para modular el posterior aprendizaje de un olor, aunque éste no haya involucrado la recolección de alimento.

Finalmente, en el **capítulo 6** desarrollo una discusión de los principales hallazgos obtenidos a lo largo de los diferentes capítulos, sobre los beneficios del estudio de comportamiento en contextos naturales y sus desafíos metodológicos, como así también la relevancia de los resultados desde una perspectiva del manejo de esta especie plaga.

# Capítulo 2

## Respuesta a estímulos olfativos aversivos y su potencial para el manejo de *V. germanica*<sup>1</sup>

---

### Resumen

Recientemente, los repelentes a base de compuestos vegetales han sido propuestos como una potencial alternativa a los pesticidas clásicos para el manejo de avispa plagas en ciertos escenarios. En este capítulo evalué el efecto de los repelentes a través de dos enfoques. Primero, examiné la respuesta de las avispas al aceite esencial de *Dysphania multifida* y de uno de sus componentes mayoritarios (alfa-terpineno) a nivel individual y colectiva al incluir los efectos de la comunicación social. Posteriormente, evalué el potencial del aceite esencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*) en la protección de colmenas de *A. mellifera* contra los ataques de avispas. Se encontró que la presencia del aceite esencial o del alfa-terpineno provocó una marcada disminución de las visitas a la fuente e incrementó considerablemente el tiempo de arribo de la primera avispa. A su vez, la tasa de arribo a cebos tratados fue aproximadamente 7 veces menor en promedio que en los cebos no tratados. El número de arribos a cebos tratados se mantuvo constante a lo largo de la temporada, a pesar de que la densidad y motivación de las avispas por el recurso proteico se incrementó progresivamente. La aplicación del aceite esencial de lavanda en la piquera de las colmenas redujo significativamente la frecuencia de ataques. Estos hallazgos muestran que los aceites esenciales tienen potencial para ser empleados en el manejo de avispas plaga.

---

<sup>1</sup> Yossen, M. B., Lozada, M., Kuperman, M. N., González, S., Gastaldi, B., & Buteler, M. (2019). Essential oils as vespid wasp repellents: Implications for their use as a management strategy. *Journal of Applied Entomology*, 143(6), 635-643. <https://doi.org/10.1111/jen.12631>

**PALABRAS CLAVE:** *Dysphania multifida*, aceite esencial, comportamiento de forrajeo, repelentes, comunicación social, paico, alfa-terpineno.

## 1. Introducción

La avispa *V. germanica* constituye una especie exótica invasora en Patagonia que puede ocasionar daños tangibles en varias actividades económicas, como la apicultura (Bacandritsos et al. 2006; Beggs et al. 2011). En las colmenas, las avispas encuentran una fuente de alimento abundante en carbohidratos, como miel, y proteínas, como larvas y adultos (Edwards 1980). Un reciente estudio en el que se evaluaron interacciones agonísticas entre avispas de *V. germanica* y *A. mellifera carnica* en apiarios de la Patagonia se demostró que estas avispas provocan un impacto negativo en las colmenas y que el nivel de daño estaría directamente asociado a la abundancia local de avispas y a la debilidad de la colmena (Buteler et al. 2021). Estas autoras también observaron que el patrón de ataque se modificó con el avance de la temporada. Al comienzo de la temporada los ataques ocurrieron principalmente a nivel del suelo, mientras que a final de la temporada la frecuencia de ataques en la piquera fue similar a la observada a nivel del suelo. Ante este escenario, el desarrollo de herramientas de manejo de baja toxicidad y compatibles con prácticas de producción orgánica resulta de gran importancia para mitigar el daño de estas avispas en los apiarios.

Recientemente, se ha propuesto que el uso de repelentes a base de compuestos vegetales podría constituir una potencial alternativa a los pesticidas clásicos usados para el manejo de avispas plagas, bajo ciertos escenarios (Boevé et al. 2014; Buteler et al. 2016; Zhang et al. 2013). Estos estudios demostraron el efecto repelente de numerosos aceites esenciales y de algunos de sus constituyentes sintéticos contra chaquetas amarillas y avispas de papel, *Polistes dominula*. Si bien la evidencia indica que la repelencia es típicamente mejorada por efectos sinérgicos o aditivos entre los componentes de la mezcla (Zhang et al.,

2013), los aceites esenciales tienen la limitación de que su producción es costosa, sobre todo cuando no hay plantaciones comerciales disponibles para tal fin. Desde una perspectiva aplicada, el uso de estándares químicos de los componentes activos en lugar de aceites esenciales no solo sería una opción más rentable, sino que además cuenta con la ventaja de tener una composición química constante y de ser más fácil de registrar como pesticidas (Isman 2006; Maia y Moore 2011). Por lo tanto, evaluar la efectividad de compuestos individuales podría ser útil para determinar si su uso es viable como una herramienta de manejo.

El carácter eusocial de *Vespula* spp. sumado a su gran plasticidad comportamental durante el forrajeo hacen de su control un desafío. Si bien el uso de repelentes podría ayudar a reducir el daño causado por las avispas plaga, por ejemplo, mediante su combinación con trampas atractivas en el marco de estrategias “push-pull”, se necesita un mayor entendimiento de cómo estos olores aversivos interfieren con el comportamiento de forrajeo de las avispas. Las avispas de *Vespula* spp. exhiben una variedad de mecanismos comportamentales para localizar y explotar rápidamente recursos efímeros como la carroña. Se ha demostrado que las forrajeras son capaces de asociar diversas claves contextuales con la ubicación del alimento, lo cual les permite retornar repetidamente al sitio preciso donde el alimento fue recolectado (D'Adamo y Lozada 2008, 2009, 2011; Lozada y D'Adamo 2014; Moreyra et al. 2007, 2012). Además, las avispas poseen mecanismos de comunicación social, como el incremento local (o “local enhancement”) y el reclutamiento en el nido, que guían a nuevas avispas hacia un recurso específico (ver capítulo 1, subsección 4.3), lo cual reduce el tiempo de búsqueda y promueve una rápida explotación de recursos efímeros (Overmyer y Jeanne 1998; D'Adamo et al. 2000; D'Adamo et al. 2003; Santoro et al. 2015; Lozada et al. 2016). Un estudio en el que se analizó la distribución de arribos a un cebo proteico durante 30 minutos encontró que cuando la comunicación con el nido y el incremento local son interrumpidos, el patrón de arribo cambió de exponencial a lineal y la tasa de arribo disminuyó aproximadamente un

80%, lo que demuestra la relevancia de ambos mecanismos durante la explotación de recursos en *V. germanica* (Lozada et al. 2016).

Hasta el momento, el efecto de los repelentes en avispas sociales ha sido principalmente evaluado en términos de la respuesta de avispas sin experiencia o frecuencia de captura mediante el uso de trampas cebadas (Zhang et al. 2013; Boevé et al. 2014). Sin embargo, un estudio en el que se evaluó el rol del aprendizaje individual en la respuesta a un olor aversivo, encontró que el efecto repelente fue menor en las avispas que habían tenido experiencia previa con la fuente de alimento que en aquéllas sin experiencia previa (Buteler et al. 2016). Por esta razón, estudiar la respuesta de las avispas a los repelentes en un contexto natural de forrajeo es esencial para obtener una estimación más realista del potencial de los repelentes como herramienta de manejo.

Si bien al menos 17 aceites esenciales ya han sido reportados como repelentes eficaces con avispas sociales, la búsqueda de nuevos productos naturales como fuentes de nuevos agentes de control permanece activa. La mayoría de los aceites esenciales que exhiben actividad repelente provienen de plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae, las cuales presentan una amplia distribución a nivel global (Zhang et al. 2013; Boevé et al. 2014; Buteler et al. 2016). No obstante, aún se desconoce el potencial de plantas nativas de Sudamérica como proveedoras de bio-repelentes para avispas. Por ejemplo, el paico (*Dysphania multifida*, L.) es una planta herbácea perteneciente a la familia Chenopodiaceae, presenta una amplia distribución en Argentina y Chile y cuyas propiedades aromáticas sugieren que podría exhibir actividad repelente. Hay evidencia de que pobladores locales colgaban partes aéreas de la planta dentro de la vivienda para mantener alejados de sus viviendas a los insectos (González et al. 2009). También se ha reportado que los extractos obtenidos de las partes aéreas exhiben actividad insecticida (Broussalis et al. 1999). Al analizar la composición del aceite esencial, se puede notar que algunos de sus componentes están presentes en otros aceites esenciales previamente reportados como repelentes para

avispas, como el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (i.e., alfa-terpineno y p-cimeno) (Buteler et al. 2016).

En este capítulo me propuse dos objetivos. En primer lugar, me propuse evaluar el efecto repelente del aceite esencial de *D. multifida* y de uno de sus componentes mayoritarios, el alfa-terpineno, en el comportamiento de forrajeo de *Vespula germanica*. Por medio de experimentos a campo evalúe el comportamiento de forrajeo de avispas sin experiencia expuestas a una fuente de alimento tratada con aceite esencial o alfa-terpineno. Al observar el comportamiento de forrajeo a lo largo de 30 minutos, analicé cómo el repelente interfiere con los mecanismos de forrajeo, que incluye la relocalización de la fuente, el incremento local y la comunicación con el nido. Finalmente analicé el efecto repelente a lo largo de la temporada a fin de determinar si la efectividad de los repelentes es afectada por un aumento en la abundancia de obreras y/o mayor motivación por el recurso proteico. El otro objetivo que me propuse fue evaluar el potencial de los aceites esenciales como estrategia de manejo a pequeña escala y a corto plazo en la prevención de ataques a colmenas de *Apis mellifera*. En este caso, usé el aceite esencial de lavanda debido a que está disponible comercialmente en grandes cantidades. Llevé a cabo ensayos en los que se evaluó el efecto en el comportamiento a corto plazo de las avispas luego de la aplicación del aceite esencial de lavanda en cercanías de la piquera. La respuesta de las avispas fue evaluada en términos de la frecuencia de comportamientos de acercamiento y de comportamientos agonísticos entre ambas especies.

## **2. Metodología**

### **2.1. Evaluación del efecto repelente mediante el uso de cebos proteicos**

#### **2.1.1. Aceite esencial de *D. multifida* y alfa-Terpineno**

El material vegetal de *D. multifida* fue recolectado de tres áreas diferentes cercanas a la ciudad de Esquel, Chubut. El material obtenido fue secado al aire durante 3 horas antes de la

extracción. La fracción volátil de cada muestra fue aislada por medio de hidrodestilación usando un aparato Clavenger. Los rendimientos fueron calculados en ml de aceites esencial obtenido/kg de material seco.

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de la composición química de la muestra de aceite esencial obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)<sup>2</sup>.

El estándar químico de alfa-terpineno (número CAS 99-86-5) ( $\geq 95.0\%$ ), segundo componente mayoritario del aceite esencial de *D. multifida*, fue obtenido de Sigma-Aldrich®. Este compuesto fue elegido debido a que está disponible comercialmente, posee una fragancia agradable para potenciales usuarios y además presenta menor toxicidad que el ascaridol, el componente principal del aceite esencial de paico.

### 2.1.2 Área de estudio y avispas

Para evaluar la actividad repelente del aceite esencial de *D. multifida* y del alfa-terpineno contra las avispas de *V. germanica*, llevé a cabo experimentos a campo en áreas suburbanas de la ciudad de San Carlos de Bariloche (41°S, 71°O), Argentina. Los ensayos fueron llevados a cabo usando avispas provenientes de colonias silvestres cercanas a las costas de los lagos Gutiérrez y Moreno durante el periodo de mayor actividad de forrajeo (febrero-marzo) de 2016. El trabajo fue llevado a cabo en el área de la costa de los lagos, a no más de 8 m de la línea del agua, entre las 10:00 a 17:00 horas. Los experimentos se realizaron bajo condiciones meteorológicas relativamente similares, en las que la temperatura ambiente osciló entre 15-25°C y la velocidad de viento fue inferior a 7 km/h de acuerdo a la página web windguru (<https://www.windguru.cz/>). Cada réplica fue llevada a cabo en diferentes sitios,

---

<sup>2</sup> La recolección del material vegetal, la extracción del aceite esencial y el posterior análisis de su composición fue llevado a cabo por el grupo de trabajo de la Dra. Silvia González perteneciente al Laboratorio de Investigación en Plantas Aromáticas y Medicinales (LIPAM), Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Esquel, Argentina.

separados al menos por 200 metros a fin trabajar con diferentes avispas y maximizar el número de colonias muestreadas (Buteler et al. 2016).



**Figura 1.** Alimentador usado durante el tratamiento control (crédito: M.B. Yossen)

### 2.1.3 Ensayos de elección

Para evaluar la respuesta comportamental de las avispas sin experiencia hacia el aceite esencial o el alfa-terpineno, primero llevé a cabo ensayos de preferencia. Se ofrecieron dos fuentes de alimento de manera simultánea, una tratada (con aceite esencial o alfa-terpineno) y otra sin tratar, de acuerdo a los procedimientos delineados por Buteler y colaboradores (2015). Como cebo proteico se utilizó carne vacuna, ya que estudios previos llevados a cabo en Patagonia demostraron que ésta constituye el cebo más atractivo para las avispas de *V. germanica* a lo largo de toda la temporada (Sackmann et al. 2001). En alimentador consistió en un pequeño contenedor plástico (4 cm de diámetro) con 15 g de carne vacuna triturada. A su vez, el contenedor fue situado sobre un plato de plástico de color blanco (9,5 cm de



diámetro) (Fig. 1). En el caso del alimentador tratado, también se colocó un papel filtro (Whatman N°1) entre el contenedor con carne y el plato. El aceite esencial (100 µl) (o alfa-terpineno, dependiendo del tratamiento), fueron distribuidos de manera homogénea sobre el papel filtro; de esta manera las avispas fueron expuestas a los volátiles sin entrar en contacto directo con los productos. Ambos alimentadores fueron simultáneamente situados en el suelo a 50 cm de distancia uno del otro. El experimento comenzó cuando una avispa arribó espontáneamente al área experimental y aterrizó sobre uno de los alimentadores y se registró el número de avispas que aterrizó en cada cebo durante los siguientes 10 minutos. Con el fin de evitar efectos de incremento local, cada avispa que aterrizó fue removida rápidamente con un aspirador de insectos manual (Lozada et al. 2016). La posición relativa de cada alimentador fue determinada al azar entre los experimentos. Los ensayos fueron replicados 15 veces con cada tratamiento.

#### 2.1.4 Experimentos de no-elección

Los experimentos de no elección fueron llevados a cabo con el propósito de evaluar la respuesta de las avispas al repelente cuando había una única fuente de alimento disponible, ya sea tratada (con aceite esencial o alfa-terpineno) o no tratada. Se evaluaron tres tratamientos: aceite esencial de *D. multifida*, alfa-terpineno y control (i.e., cebo sin tratar). Los cebos tratados y no tratados fueron preparados de acuerdo al mismo procedimiento descrito previamente para los ensayos de elección. Una vez colocados sobre el suelo, el experimento consistió en registrar el tiempo de arribo de cada avispa que aterrizó en el alimentador durante un periodo de 30 minutos. En este caso, ninguna avispa fue removida y a todas ellas se les permitió aterrizar, manipular y recolectar alimento. De esta manera, se permitió que los procesos de transferencia social, como el incremento local y reclutamiento en nido, ocurrieran. Cada tratamiento fue replicado 15 veces en diferentes sitios separados al menos por 200 m. A su vez, los experimentos fueron replicados a lo largo de la temporada, desde el

15/02/2016 al 11/03/2016, con el fin de explorar si el efecto repelente del aceite esencial de *D. multifida* y del alfa-terpineno se mantuvo a lo largo de la temporada.

## 2.2 Evaluación del efecto repelente en colmenas de *A. mellifera*<sup>3</sup>

Luego de haber evaluado el efecto repelente de un aceite esencial utilizando una fuente de carroña de pequeño tamaño, exploré su efecto al aplicarlo en colmenas de *Apis mellifera* con el propósito de explorar el potencial de estos productos en la prevención de los ataques en apiarios de la Patagonia.

### 2.2.1. Colmenas

Los ensayos se llevaron a cabo en 5 apiarios de *A. mellifera carnica* pertenecientes a pequeños productores de la ciudad de San Carlos de Bariloche.

### 2.2.2 Aceite esencial de lavanda

El aceite esencial seleccionado para su evaluación en colmenas fue el de lavanda (*Lavandula angustifolia*). Este aceite fue elegido en base a que se ha demostrado que presenta una marcada respuesta repelente en avispas sociales según estudios previos (Zhang et al. 2013) y además puede ser obtenido comercialmente en grandes cantidades. El aceite esencial empleado en este estudio fue adquirido de EUMA S.A.I.C.I Y F. (Villa Adelina, Buenos Aires).

### 2.2.3 Experimentos

---

<sup>3</sup> La evaluación del efecto repelente del aceite esencial de lavanda aplicado a colmenas de *A. mellifera* se llevó a cabo en el marco del proyecto sobre interacciones agonísticas entre *V. germanica* y *A. mellifera* en apiarios de la Patagonia y en el cual también colaboraron las Dras. Mariana Lozada y Marina Alma.

Los ensayos fueron llevados a cabo durante el periodo de alta actividad de las forrajeras de ambas especies (14/3/2019 - 20/3/2019), entre las 11 a 15 hs., en días soleados en los que la temperatura osciló entre 15 y 25°C de acuerdo al sitio web windguru (<https://www.windguru.cz/>). El aceite esencial puro de lavanda (1 ml) fue disuelto en vaselina, cuya función fue contribuir a la liberación controlada del olor. Luego, la vaselina junto con el aceite fueron aplicados sobre un rectángulo de cartón (32 x 4 cm), cubriendo la totalidad de la superficie de una de sus caras. Luego, la faja de cartón fue cuidadosamente sujeta debajo de la piquera con la ayuda de cinta scotch (Fig. 2).

El experimento consistió en la observación del comportamiento de ambas especies antes y después de la aplicación del repelente, con una duración de 15 minutos cada observación. Durante ese periodo, se registró la frecuencia total de diversos comportamientos agonísticos entre ambas especies de acuerdo al etograma propuesto por Pusceddu et al. (2017). Estos comportamientos que se describen a continuación comprenden:

- *Acercamientos*: la avispa se acerca a la entrada de la colmena sin entrar en contacto con la piquera ni con ninguna abeja.
- *Contacto*: la avispa toca a una abeja (ya sea con sus antenas o mandíbulas) sin que luego esto derive en una pelea.
- *Aterrizaje*: la avispa hace contacto con la parte inferior de la piquera, sin entrar a la colmena ni involucrar contacto con una abeja.
- *Pelear*: encuentro físico entre la avispa y la abeja que implica la antenación y puede derivar en el abandono de la avispa, en mordeduras y en movimientos giratorios sobre alguna superficie.
- *Depredación*: la avispa agarra a la abeja y la lanza al suelo donde continúan peleando o bien la abeja logra liberarse.
- *Entradas a la colmena*: la avispa ingresa al interior de la colmena, ya sea sin resistencia por parte de las abejas o luego de algún contacto previo o pelea.

Los comportamientos fueron registrados mediante observación y requirieron de la presencia de dos observadores: uno observó el comportamiento mientras el otro realizó las anotaciones. Se evaluó un total de 20 colmenas.

Adicionalmente, se llevó a cabo un tratamiento control en el que se utilizaron 4 colmenas. En este caso, se colocó el cartón sin el aceite esencial y se realizaron dos observaciones consecutivas de 15 minutos, al mismo tiempo que fueron realizadas las observaciones en las colmenas tratadas. Estas colmenas fueron seleccionadas de un colmenar nuevo (es decir, que nunca fueron tratadas con el aceite esencial). Estos controles sirvieron para evaluar si el ataque de las avispas disminuye debido a la hora del día o al tratamiento.



**Figura 2.** Fotografía de una colmena tratada con repelente. En la parte inferior de la piquera se observa la faja de cartón con vaselina impregnada con el aceite esencial de lavanda (crédito: M. B. Yossen).

### 2.3. Análisis estadístico

En los experimentos de elección, primero analicé la distribución de avispas en cada tipo de cebo usando el test Chi-cuadrado de bondad de ajuste, a fin de determinar si la frecuencia de avispas en cada fuente difirió de la frecuencia aleatoria esperada del 50% en cada uno. Luego, por medio del test de Chi-cuadrado de independencia, comparé la frecuencia de avispas en cada cebo entre tratamientos (aceite esencial de *D. multifida* y alfa-terpineno).

En el caso de los experimentos de no-elección, se analizaron dos variables respuesta: el tiempo de arribo de la primera avispa (i.e., tiempo transcurrido desde la colocación de la fuente hasta el aterrizaje de la primera avispa) y el número total de arribos a la fuente durante 30 minutos. Ambas variables respuesta fueron comparadas entre los tres tratamientos (aceite esencial, alfa-terpineno y control) por medio del test de Kruskal-Wallis. Las comparaciones múltiples fueron realizadas usando el test de Dunn con valores p ajustados por el método de Sidák. También se analizaron las series de tiempo resultantes de los tiempos de arribo de cada avispa al cebo tratado y control. Las series de tiempo fueron caracterizadas al ajustarlas con funciones lineales y no lineales de acuerdo al patrón exhibido, usando un esquema de cuadrados mínimos. Cada serie de tiempo consistió en un pequeño número de eventos, por lo que se realizó un análisis de varias series. A pesar del patrón no lineal de los datos provenientes de los experimentos control, se encontró que un ajuste lineal fue suficiente para establecer las diferencias en el patrón de arribo entre los tratamientos. Teniendo en cuenta que la tasa de arribos aumentó a lo largo del tiempo como consecuencia de los efectos de incremento local o comunicación en el nido (Lozada et al. 2016), se midió la tasa de arribo durante el comienzo del experimento, que fue la más baja observada en cada réplica de los experimentos con cebos no tratados. El ajuste permitió la estimación de una tasa de arribo que sirvió como un indicador de las diferencias entre los tratamientos. Con el fin de evitar los efectos de las variaciones diarias en los experimentos, primero se compararon los datos provenientes de un mismo día de muestreo. A partir de los tiempos de arribo obtenidos en un mismo día, se calculó la media de arribos al ajustarlos mediante un cálculo de mínimos

cuadrados<sup>4</sup>. Adicionalmente, para cada tratamiento, también se llevó a cabo un análisis de correlación por medio del coeficiente *rho* de Spearman, a fin de examinar si existía una asociación entre la frecuencia total de avispas en cada cebo y el tiempo de arribo.

En cuanto a los datos del tratamiento con repelente en colmenas, se utilizó el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar el número de eventos de cada tipo de comportamiento antes y después de la aplicación del aceite esencial. Este test estadístico también fue usado para comparar el número de eventos de cada comportamiento en las dos mediciones consecutivas realizadas en el tratamiento control (sin aplicación de aceite esencial).

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando el software R versión 3.5.0 (R Development Core Team, 2018).

### **3. Resultados**

#### **3.1. Composición química del aceite esencial de *D. multifida***

Se encontraron 13 componentes en el aceite esencial extraído de las partes aéreas del paico, los cuales representaron el 99.7% de su composición. Los componentes principales fueron el ascaridol (61.1%), el alfa-terpineno (18.5%) y el p-cimeno (12.7%) (Tabla 1).

---

<sup>4</sup> Los modelos estadísticos de las líneas temporales fueron realizados por el Dr. Marcelo Kuperman como parte de una colaboración con nuestro grupo de trabajo. El Dr. Kuperman del Grupo de Física Estadística e Interdisciplinaria del Centro Atómico Bariloche (CNEA) e Instituto Balseiro, Bariloche, Río Negro, Argentina

**Tabla 1.** Composición química del aceite esencial extraído de las partes aéreas de *Dysphania multifida*

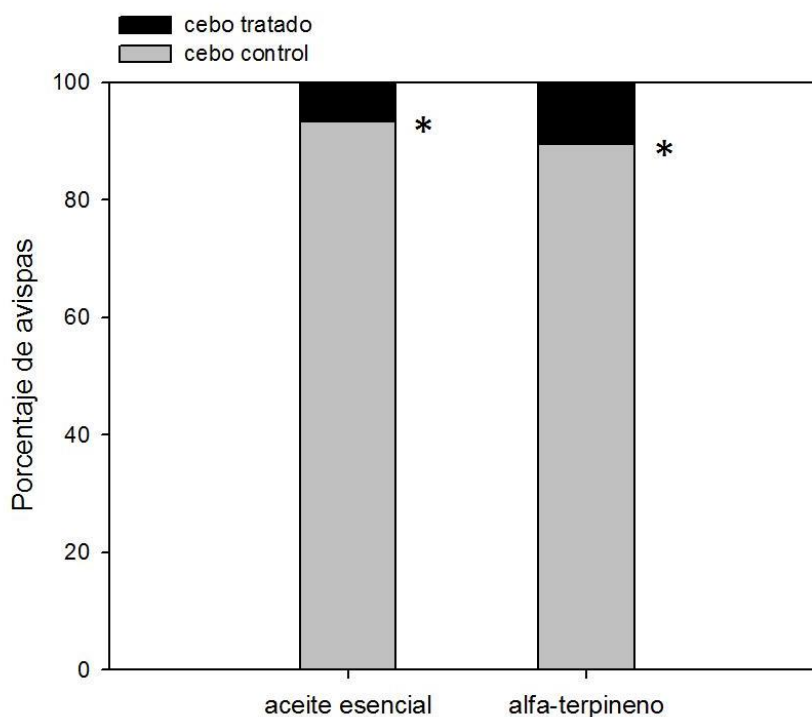
Nº DE PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN (tR)	AREA (%)	COMPONENTE
1	9797	0,1	DELTA-2-CARENO
2	10283	18,5	ALFA-TERPINENO
3	10283	12,7	P-CIMENO
4	10581	0,2	LIMONENO
5	11352	0,2	GAMMA-TERPINENO
6	13915	0,1	3-METIL-1,2-CICLOHEXANODIOL
7	13949	0,1	DEHIDROLINALOOL
8	15392	0,1	CIS-P-MENTA-2,8-DIEN-1-OL
9	18128	61,1	ASCARIDOL
10	18200	0,5	ASCARIDOL EPÓXIDO
11	18491	0,1	7-OXABICICLO[4.1.0]HEPTAN-2-ONA,3-METIL-6-(1-METILETIL)
12	20005	0,1	CARVACROL
13	20435	6,1	CIS-PIPERITONA EPÓXIDO (EPÓXIDO VS. IPP)

### 3.2 Experimentos de elección

En ambos tratamientos se observó una fuerte respuesta de evitación hacia la fuente tratada, ya sea con aceite esencial ( $\chi^2 = 70,04$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,0001$ ) o con alfa-terpineno ( $\chi^2 = 63,43$ ;  $df = 1$ ,  $p < 0,0001$ ). En el tratamiento con aceite esencial, sólo el 7,6% del total de las avispas evaluadas eligieron la fuente tratada. En el tratamiento con alfa-terpineno, el porcentaje de avispas que aterrizaron en el alimentador tratado fue del 11,1% (Tabla 2). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el efecto repelente entre el aceite esencial y el alfa-terpineno ( $\chi^2 = 0,95$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,32$ ) (Fig. 3).

**Tabla 2.** Número de avispas (media y error estándar) en el alimentador tratado (ya sea con aceite esencial de *D. multifida* o alfa-terpineno) y sin tratar durante los ensayos de elección (n=15)

Tratamiento	Cebo tratado		Cebo control	
	Media	Error estándar	Media	Error estándar
Aceite esencial	0,47	0,16	5,93	0,8
alfa-Terpineno	0,8	0,2	6,27	0,5



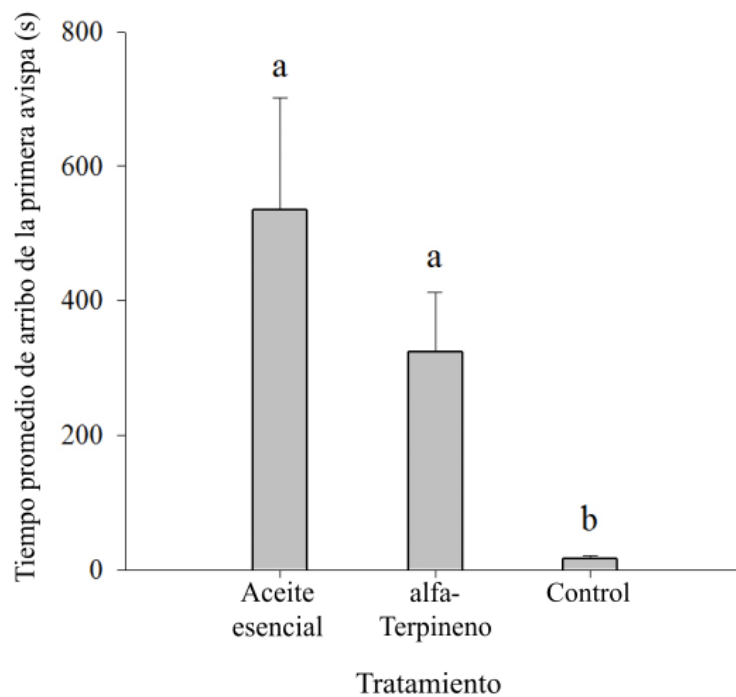
**Figura 3.** Porcentaje de avispas que aterrizaron en el cebo tratado y el cebo control durante los ensayos de elección, para ambos tratamientos (aceite esencial de *D. multifida* y alfa-terpineno). \* indica que la frecuencia de avispas observada en cada tipo de cebo difirió de la esperada del 50%.  $\alpha = 0,05$ ; n = 15

### 3.3 Experimentos de no-elección

#### 3.3.1 Tiempo de arribo de la primera avispa



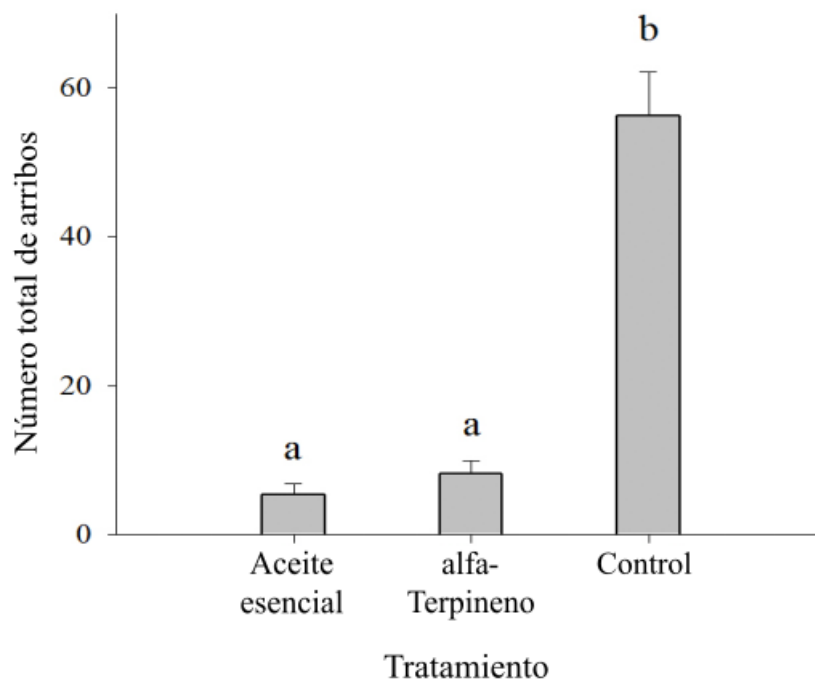
El tiempo que demoró la primera avispa en aterrizar sobre la fuente varió significativamente de acuerdo al tratamiento (aceite esencial, alfa-terpineno o control) ( $\chi^2 = 19,4$ ;  $df = 2$ ,  $p < 0,0001$ ). Encontré que las avispas demoraron considerablemente más tiempo en arribar a los cebos tratados, ya sea con aceite esencial de *D. multifida* ( $p < 0,001$ ) o alfa-terpineno ( $p < 0,01$ ), que a cebos no tratados (control). El tiempo promedio transcurrido desde la colocación del alimentador sobre el suelo y el aterrizaje de la primera avispa fue de  $15,6 \pm 5,1$  s en cebos no tratados, de  $535,1 \pm 166,4$  en cebos tratados con aceite esencial y de  $324,5 \pm 88,1$  s en cebos tratados con alfa-terpineno (Fig. 4). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el tiempo de arribo entre el tratamiento con aceite esencial y el tratamiento con alfa-terpineno ( $p = 0,69$ ). Además, en el 26,6% y 6,7% de los ensayos con aceite esencial y alfa-terpineno, respectivamente, no se registró ningún aterrizaje de avispas en lo que duró el experimento (30 min), mientras que en caso del tratamiento control, en todos los ensayos se registraron aterrizajes de avispas.



**Figura 4.** Tiempo (media  $\pm$  error estándar) transcurrido hasta el aterrizaje de la primera avispa en un cebo tratado con aceite esencial de *D. multifida*, alfa-terpineno o sin tratar (control), en experimentos de no-elección. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos,  $\alpha = 0,05$ ;  $n = 15$ .

### 3.3.2 Número total de arribos durante 30 minutos

El número total de avispas que aterrizaron en el alimentador durante el lapso de 30 min difirió de acuerdo al tratamiento (aceite esencial, alfa-terpineno y control) ( $\chi^2 = 25,2$ ;  $p < 0,0001$ ). Encontré que la frecuencia de aterrizajes en los cebos tratados (ya sea con aceite esencial o con alfa-terpineno) fue considerablemente menor que en el cebo control (aceite esencial-control:  $p < 0,0001$ , alfa-terpineno-control:  $p < 0,001$ ). El promedio (media  $\pm$  error estándar) de aterrizajes por ensayo fue  $56,2 \pm 5,9$  en cebos control,  $5,4 \pm 1,4$  en cebos tratados con aceite esencial y  $8,2 \pm 1,7$  en cebos con alfa-terpineno (Fig. 5). No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de aterrizajes entre los tratamientos con aceite esencial y alfa-terpineno ( $p = 0,91$ ).

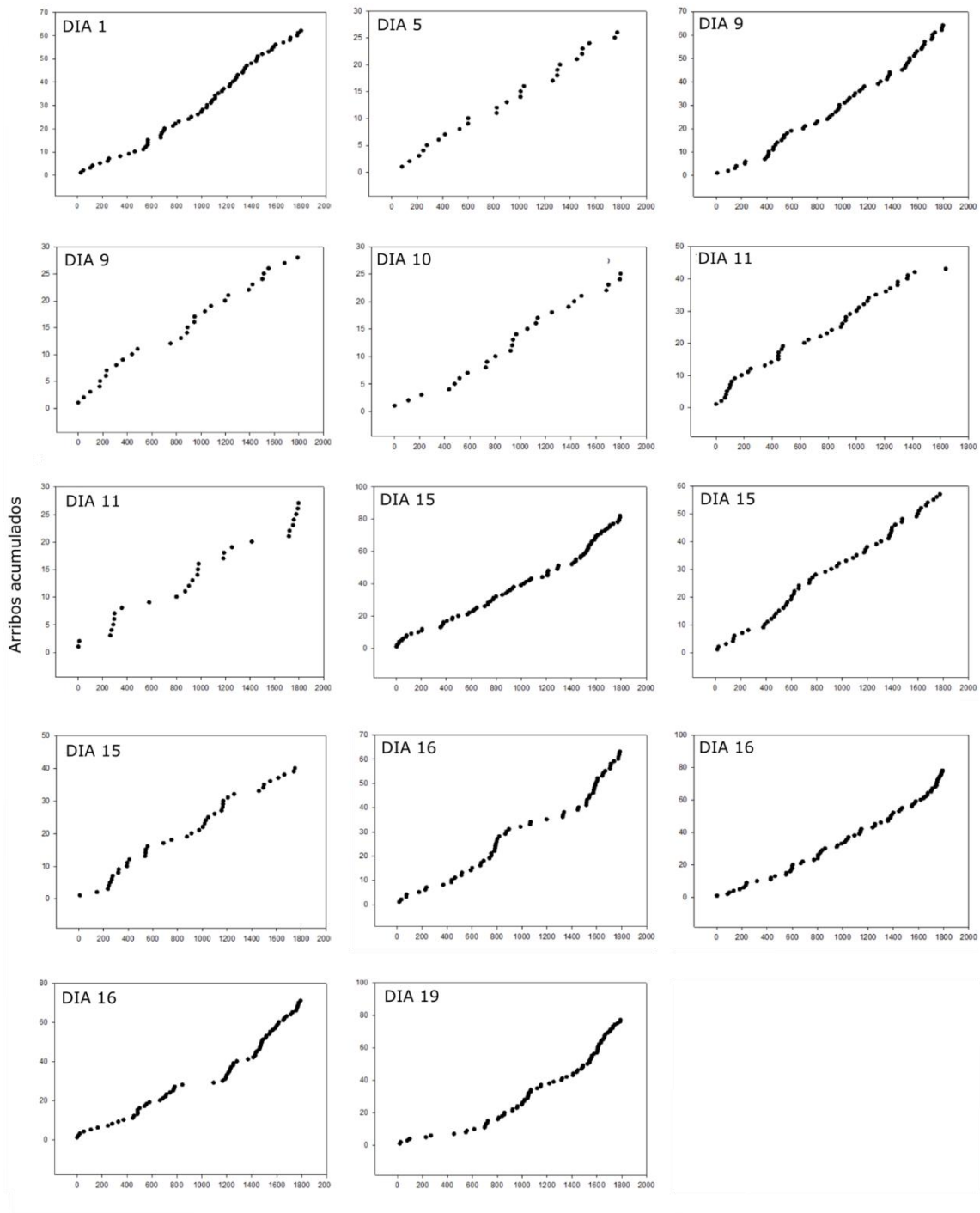


**Figura 5.** Número de avispas (media  $\pm$  error estándar) que aterrizaron sobre un alimentador tratado con aceite esencial, tratado con alfa-terpineno o sin tratar (control) durante un intervalo de 30 min en los experimentos de no-elección. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos,  $\alpha = 0,05$ ;  $n = 15$

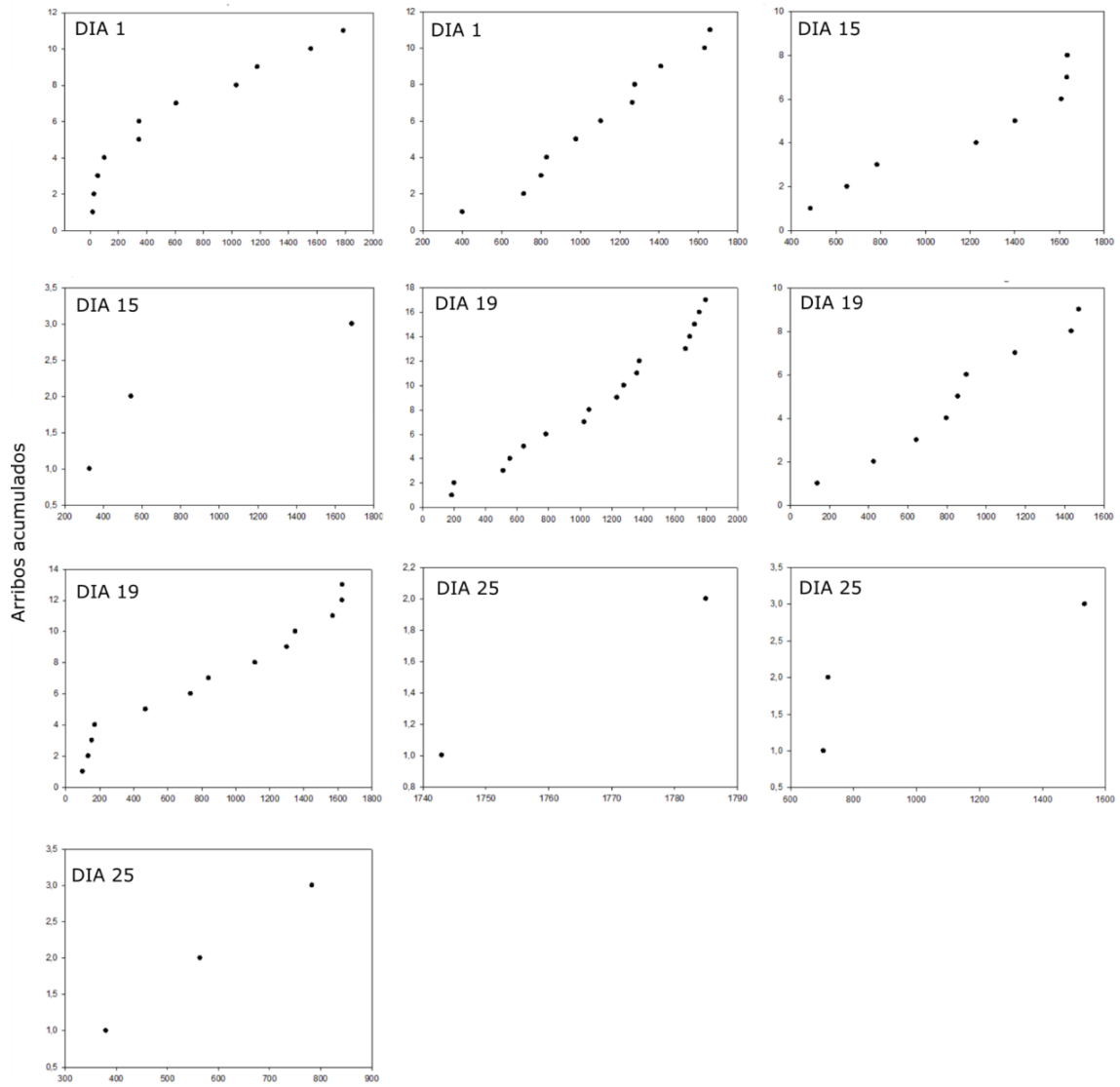
### 3.3.3 Patrones de arribo

El patrón de arribo de las avispas a una fuente de alimento varió significativamente dependiendo de si el alimentador estuvo tratado, ya sea con aceite esencial o alfa-terpineno, o estuvo no tratado (control). Las figuras 6-8 ilustran la distribución de los arribos a lo largo del tiempo (1800 s) en los tres tratamientos (aceite esencial, alfa-terpineno y control). En la figura 9 también se ilustran los patrones de arribos observados en un mismo día de muestreo para los diferentes tratamientos. En todos los casos, se observan diferencias notables en cuanto a la tasa de arribos a la fuente. Cuando se examinó la distribución de los arribos durante todo el periodo que duró el experimento (30 min), se encontró que el patrón general de arribos se ajustó a una distribución cuadrática/exponencial, con datos ajustados por medio del algoritmo de Levenberg–Marquardt. No obstante, cuando el alimentador estuvo tratado, ya sea con aceite esencial o alfa-terpineno, el patrón de arribos se ajustó a una distribución lineal. Se observó que la tasa (media) de arribo al alimentador sin tratar fue de 0,0427 avispas/s, al alimentador con aceite esencial fue de 0,006 avispas/s y al alimentador con alfa-terpineno fue de 0,005 avispas/s (Tabla 3). Esto implica que la tasa de arribo al alimentador con aceite esencial fue 6,16 veces menor en el control, mientras que en el tratamiento con alfa-terpineno, la tasa de arribo fue 7,41 veces menor. En los tres casos, el coeficiente de Pearson se mantuvo entre los siguientes intervalos: cebo control (0,977–0,995), aceite esencial (0,975–0,989) y alfa-terpineno (0,991–0,961). En cada uno de los dos últimos casos, observamos una serie de datos, correspondientes al mismo día, que no pudieron ajustarse bien, probablemente debido a que el número total de avispas era menor ese día. El coeficiente correspondiente fue de 0,912 y 0,8973 para el aceite esencial y el alfa-terpineno, respectivamente. Cabe recordar que, para calcular la tasa de arribo en el caso de los cebos tratados, los datos se obtuvieron a partir de

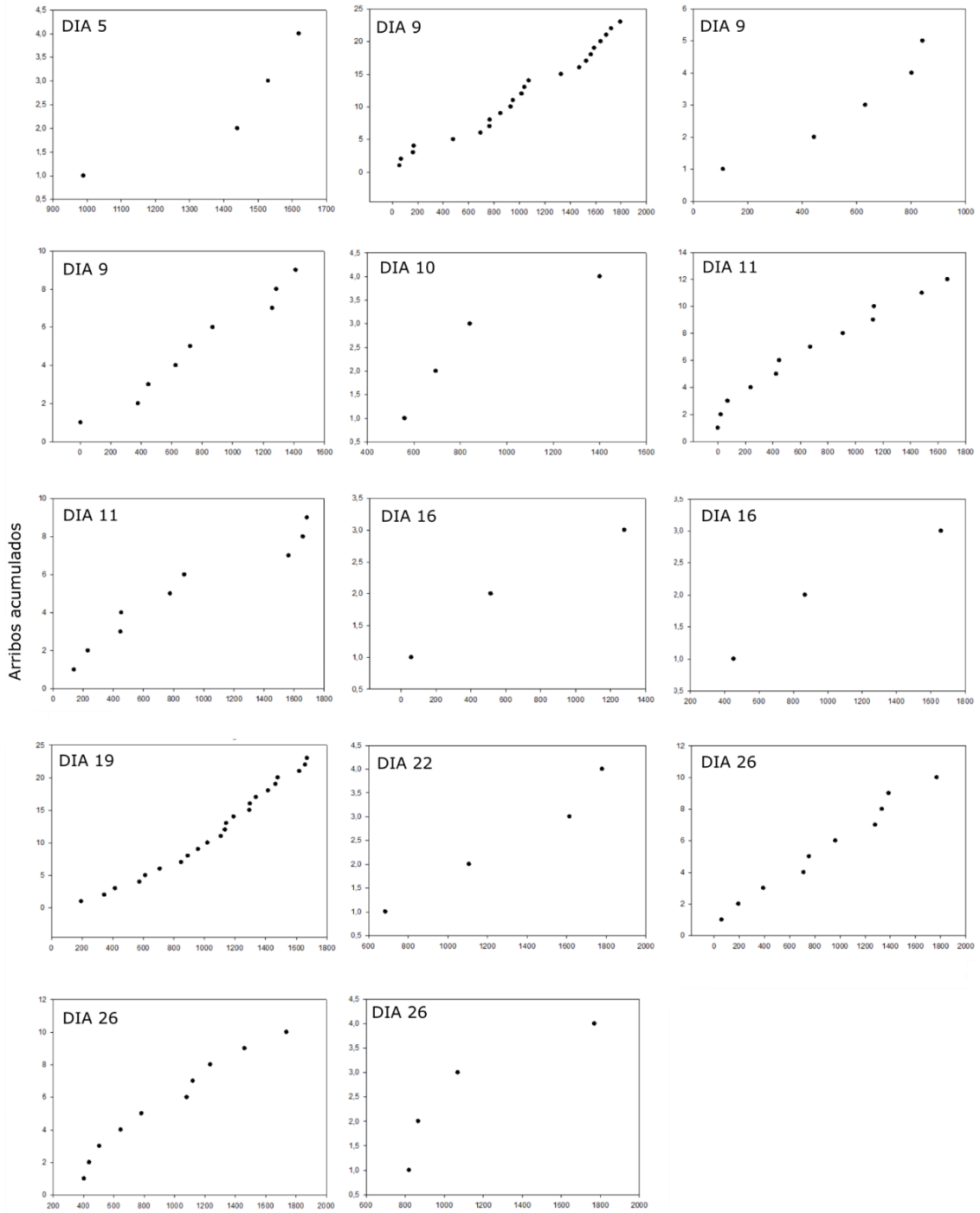
un ajuste lineal de toda la serie, mientras que el caso del tratamiento control los valores corresponden a la tasa de llegada más baja, registrada siempre como un ajuste lineal de los datos correspondientes a los primeros 10 minutos de cada experimento. Como los lapsos correspondientes a cada experimento sólo duraban 30 minutos, una estimación de la tasa de llegada media mediante ajustes lineales fue lo suficientemente precisa para todos los casos como para establecer las diferencias.



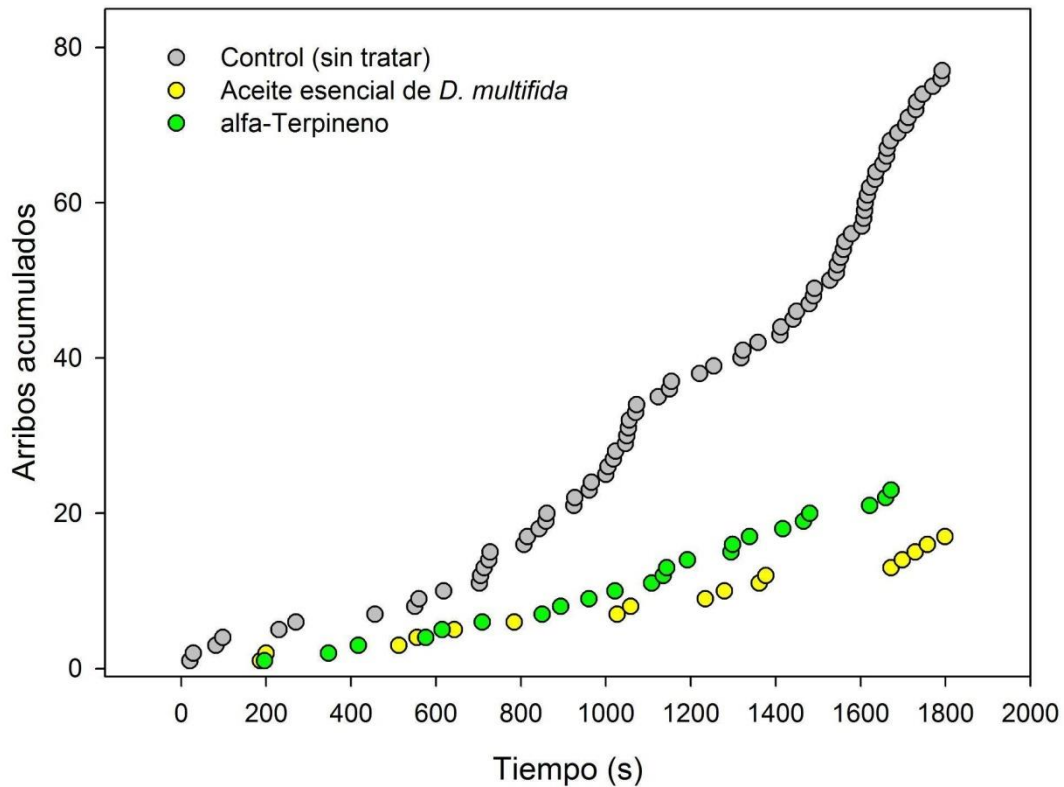
**Figura 6.** Número acumulado de arribos a un cebo no tratado (control) registrados durante un lapso de 1800 s (experimentos de no-elección). Los ensayos fueron replicados a lo largo del periodo del 15/02/2016 al 11/03/2016.



**Figura 7.** Número acumulado de arribos a un cebo tratado con aceite esencial de *D. multifida* registrados durante un lapso de 1800 s (experimentos de no-elección). Los ensayos fueron replicados a lo largo del periodo del 15/02/2016 al 11/03/2016. Aquellas réplicas que registraron 1 o 0 arribos, no fueron graficadas.



**Figura 8.** Número acumulado de arribos a un cebo tratado con alfa-terpineno registrados durante un lapso de 1800 s (experimentos de no-elección). Los ensayos fueron replicados a lo largo del periodo del 15/02/2016 al 11/03/2016. Aquellas réplicas que registraron 1 o 0 arribos, no fueron graficadas.



**Figura 9.** Arribos acumulados dentro de un lapso de 1800 s en ensayos de no-elección. La figura ilustra sólo un conjunto representativo de datos del mismo día de muestreo (4/3/2016) en el que se evaluaron los tres tratamientos (aceite esencial de *D. multifida*, alfa-terpineno y control).

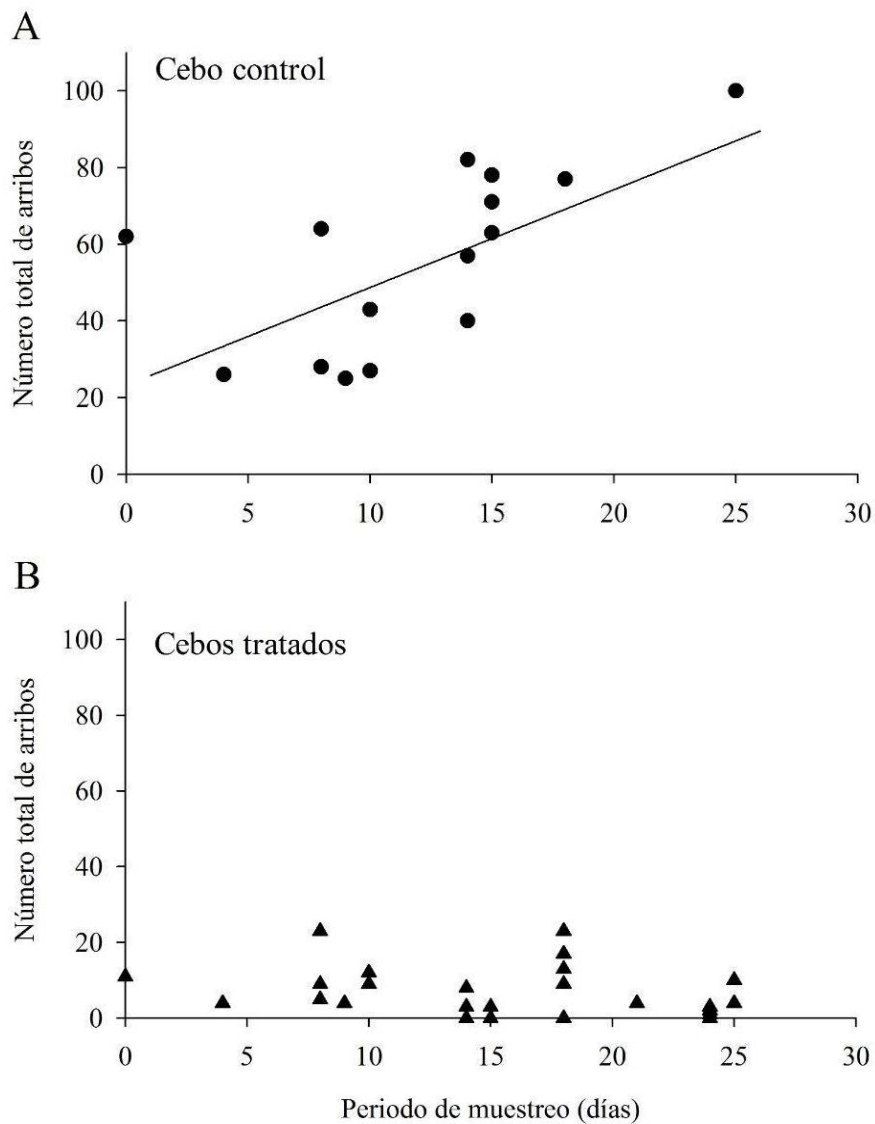
**Tabla 3.** Tasa de arribo (número de avispas por segundo) calculada para cada tratamiento de los experimentos de no-elección

Tasa de arribo	Control	Aceite esencial	alfa-Terpineno
Mínima	$3,12 \times 10^{-2} \pm 3,7 \times 10^{-3}$	$5,12 \times 10^{-3} \pm 2,1 \times 10^{-4}$	$5,01 \times 10^{-3} \pm 4,4 \times 10^{-4}$
Media	$4,27 \times 10^{-2} \pm 2,9 \times 10^{-3}$	$6,93 \times 10^{-3} \pm 4,0 \times 10^{-4}$	$5,76 \times 10^{-3} \pm 4,6 \times 10^{-4}$
Máxima	$5,81 \times 10^{-2} \pm 22,6 \times 10^{-3}$	$9,31 \times 10^{-3} \pm 4,1 \times 10^{-4}$	$6,73 \times 10^{-3} \pm 4,2 \times 10^{-4}$

### 3.4 Actividad repelente a lo largo del tiempo



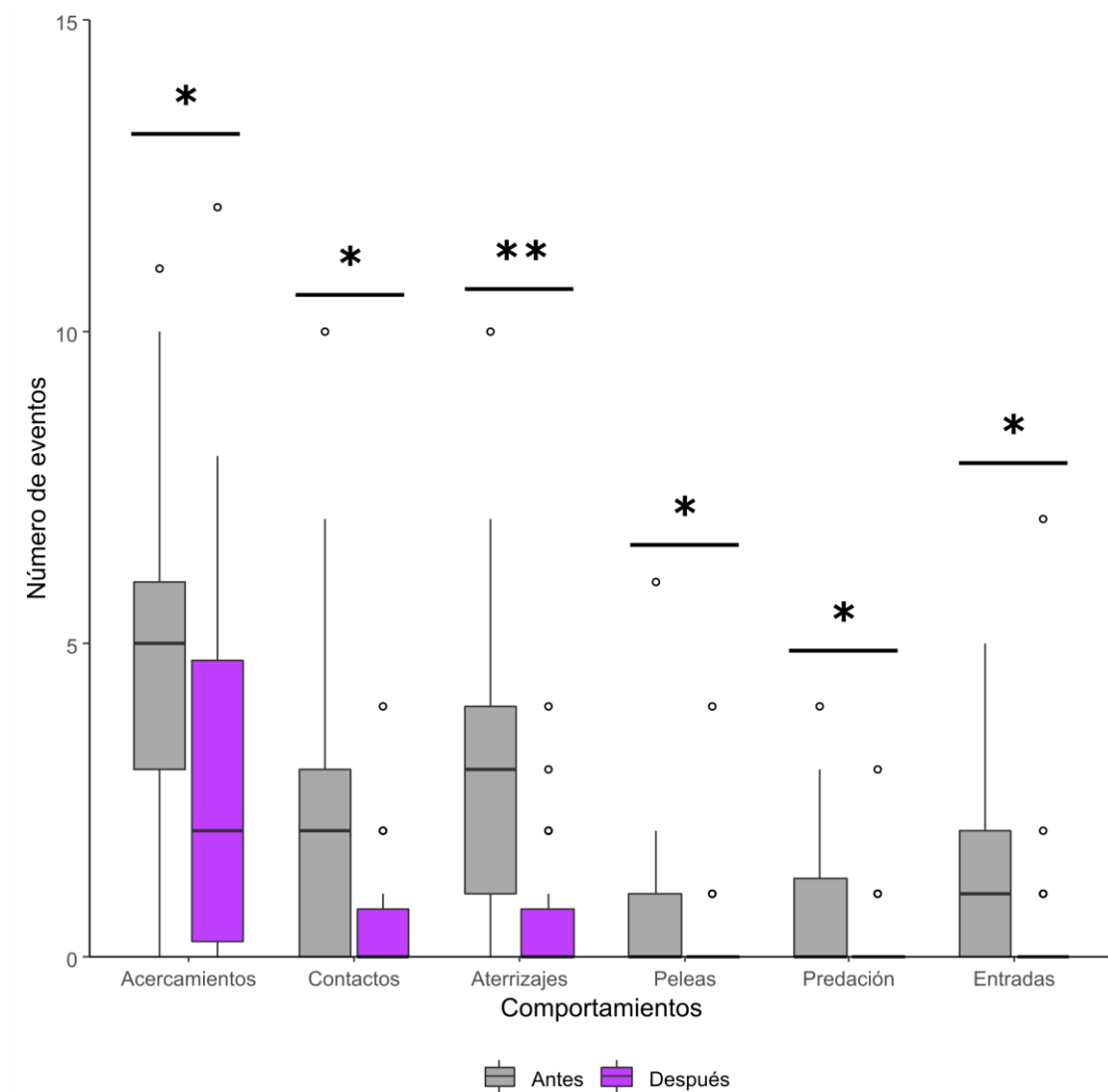
Encontré una correlación positiva significativa entre el número total de avispas en los cebos control y el tiempo de muestreo ( $\rho = 0,68$ ;  $p = 0,005$ ). El número de avispas registrado en los experimentos de no-elección aumentó paulatinamente a lo largo del periodo de muestreo (del 15/2/2016 al 11/3/2016) (Fig. 10A). Sin embargo, no se observó correlación en los cebos tratados, ya sea con aceite esencial ( $\rho = -0,28$ ,  $p = 0,31$ ) como con alfa-terpineno ( $\rho = -0,04$ ;  $p = 0,87$ ). En los dos últimos casos, el número total de avispas que arribaron al alimentador fue similar a lo largo de todo el periodo de muestreo. Los datos de ambos tratamientos se mostraron en la figura 10B ( $\rho = -0,24$ ;  $p = 0,19$ ).



**Figura 10.** Número total de avispas por experimento a lo largo del periodo de muestreo (del 15/2/2016 al 11/3/2016). (A) Cebos sin tratar ( $\rho = 0,68$ ,  $n = 15$ ,  $p = 0,005$ ). (B) Cebos tratados con aceite esencial de *Dysphania multifida* y tratamiento con alfa-terpineno, graficados juntos (*D. multifida*:  $\rho = -0,28$ ,  $p = 0,31$ ; alfa-terpineno:  $\rho = -0,04$ ;  $n = 25$ ,  $p = 0,87$ ). Test de correlación de Spearman,  $\alpha = 0.05$

### 3.5. Efecto repelente de aceites esenciales en colmenas de *A. mellifera*

El tratamiento con aceite esencial produjo una reducción significativa en la frecuencia de eventos de todos los comportamientos analizados (acercamientos:  $V = 100$ ,  $p = 0,009$ ; contactos:  $V = 100$ ,  $p = 0,003$ ; aterrizajes:  $187,5$ ,  $p = 0,0002$ ; peleas:  $V = 51,5$ ,  $p = 0,01$ ; depredación:  $V = 102,5$ ,  $p = 0,01$ ; entradas:  $V = 174$ ,  $p = 0,009$ ;  $N = 26$ ; Fig. 11). En cuanto al tratamiento control, aunque el número de réplicas fue relativamente bajo en comparación al tratamiento con repelente, la frecuencia de eventos de cada categoría de comportamiento no difirió entre ambas observaciones consecutivas (acercamientos:  $V = 0$ ,  $p = 0,17$ ; contactos:  $V = 0$ ,  $p = 1$ ; aterrizajes:  $V = 3$ ,  $p = 1$ ; peleas:  $V = 2$ ,  $p = 1$ ; entradas:  $V = 5$ ,  $p = 1$ ;  $N = 4$ )



**Figura 10.** Frecuencias de eventos de las diferentes categorías de comportamientos agonísticos observados antes y después de la aplicación del aceite esencial de lavanda en la piquera. \* indican valor  $p < 0,05$ ; \*\* indican valor  $p < 0,001$  (test de Wilcoxon para muestras pareadas,  $\alpha = 0,05$ ,  $n=26$ ).

#### 4. Discusión

El presente estudio es el primero en evaluar el efecto repelente del aceite esencial de *D. multifida* y de uno de sus componentes mayoritarios, el alfa-terpineno, en avispas de *Vespula germanica*. Los resultados indican que tanto el aceite esencial como el alfa-terpineno actúan como un estímulo aversivo poderoso para las avispas sin experiencia ya que ambos fueron capaces de desencadenar una fuerte respuesta de evitación cuando fueron aplicados a cebos proteicos. Estos resultados están en línea con estudios previos que demuestran que los

repelentes tienen un efecto en el comportamiento individual de estas avispa, afectando sus preferencias alimenticias y su respuesta de aterrizaje (Buteler et al. 2016).

En este estudio, el alfa-terpineno mostró una eficacia similar a la del aceite esencial puro de *D. multifida* cuando fue aplicado en la misma cantidad. A pesar de que el alfa-terpineno representa aproximadamente 1/5 del total de la composición del aceite esencial, estos resultados sugieren que podría contribuir significativamente al efecto repelente del aceite esencial y por lo tanto podría ser usado como alternativa. Además, el hecho de que el alfa-terpineno presente una baja toxicidad aguda (EPA CLASS 4) y sea usado con frecuencia como agente aromatizante en la industria cosmética y alimentaria, lo convierte en una buena alternativa para el aceite esencial puro. Esto resulta particularmente relevante desde una perspectiva aplicada, ya que los terpenos individuales pueden ser obtenidos más fácilmente y a un costo menor que los aceites esenciales. A su vez, el uso de estándares químicos previene de lidiar con la variabilidad química que caracteriza a los aceites esenciales, cuya composición puede variar significativamente de acuerdo al estado fenológico de la planta, el sitio de origen, las condiciones de crecimiento de la planta, la parte de la planta del cual fue extraído, entre otros factores (Isman 2006). Sin embargo, también vale la pena destacar que los aceites esenciales a menudo pueden resultar repelentes más efectivos que sus constituyentes individuales, debido a los efectos de sinergismo observados en ciertas mezclas (Buteler et al. 2016).

¿Es posible que la baja frecuencia de aterrizajes observada en el cebo tratado se deba a un enmascaramiento de la fuente de alimento en lugar de un efecto repelente? En un estudio realizado bajo condiciones similares al presente trabajo, Buteler y colaboradores (2016) descartan la posibilidad de un enmascaramiento de la fuente de alimento. Estos autores observaron que, cuando aquellas avispa que habían sido entrenadas con una fuente no tratada retornaron al sitio de forrajeo y en su lugar encontraron una fuente idéntica pero tratada con un aceite esencial (tea tree o lemongrass), éstas generalmente se aproximaron a una distancia muy cercana, realizaron varios sobrevuelos sobre el alimentador y, aunque la mayoría de las

avispa aterrizó sobre el recurso, sólo una baja proporción logró recolectar carne. En base a estas observaciones, los autores concluyeron que la fuente de alimento estaba siendo detectada pero que las avispas optaron por no explotar el recurso que contenía el olor repelente. De manera similar, durante la realización de los experimentos, observé que una gran parte de las avispas que se aproximaron al área de trabajo se aproximaron a la fuente antes de ser repelidas. En experimentos llevados a cabo en los capítulos posteriores de esta tesis (e.g. cap 2 y cap 3) también se observó que el radio de acción del efecto repelente es acotado. Por ejemplo, en un experimento de no-elección del capítulo 3 en el que se evaluó el éxito de aterrizaje de avispas sin experiencia en una fuente tratada con aceite esencial de lavanda (ver subsección 2.3, capítulo 3), encontré que sólo el 16,2% de las avispas que se acercaron a menos de 25 cm del alimentador lograron aterrizar sobre la carne.

Los resultados muestran que tanto el aceite esencial de paico como el alfa-terpineno no fueron 100% efectivos en mantener a las avispas alejadas de la fuente de alimento, ya que una pequeña proporción de las forrajeras logró aterrizar y recolectar alimento de los alimentadores tratados. Sin embargo, las diferencias observadas en el número total de arribos entre cebos tratados y no tratados sugieren que los repelentes son efectivos incluso cuando ocurre aprendizaje individual y comunicación social. Las curvas de arribo de avispas a los cebos control exhibieron un patrón no-lineal, similar al observado previamente por Lozada y colaboradores (2016) cuando se permitió que ocurriera comunicación social en la fuente y en el nido. En los cebos que fueron tratados ya sea con aceite esencial o alfa-terpineno, el patrón de arribo se ajustó a un modelo lineal cuya pendiente fue significativamente menor a la observada en los cebos no tratados durante los primeros 10 minutos del experimento. El diseño experimental no permitió discernir si las diferencias observadas en los patrones de arribo se debieron a una menor tasa de reclutamiento en el nido o a una reducción del efecto de incremento local como resultado del menor número de avispas que permanecían posadas en la fuente, ya que los patrones de arribo a los cebos tratados fueron similares a los observados en Lozada y colaboradores (2016) en ausencia de incremento local y

reclutamiento. Sin embargo, ya sea por cualquiera de ambos mecanismos, los resultados sugieren que la presencia de un repelente en las inmediaciones de la fuente afecta negativamente la comunicación social, ya sea de manera directa o indirecta. Futuros estudios podrían evaluar si estas avispa reclutan o no reclutan congéneres del mismo nido a recursos tratados con repelente.

Un hallazgo interesante surge al analizar el efecto de los repelentes a lo largo de la temporada. A medida que la temporada avanzó, la abundancia de obreras y su motivación por la proteína aumentó, probablemente como consecuencia del aumento en el número de larvas y la disminución en la abundancia de las presas. Esto se evidenció en el hecho de que el número total de avispa que arribaron a los cebos no tratados aumentó a lo largo del tiempo. Sin embargo, el número de avispa que arribaron a los cebos tratados permaneció bajo a lo largo de toda la temporada de muestreo, sugiriendo que la efectividad del repelente se mantiene relativamente constante, incluso cuando la motivación por el recurso y la densidad de forrajeras aumenta.

Los ensayos sobre la eficacia del aceite esencial de lavanda en prevenir los ataques de las avispa a las colmenas de *A. mellifera carnica* muestran que el olor puede disuadir en gran medida el comportamiento de forrajeo de las avispa en las cercanías de la piquera, al disminuir la frecuencia de acercamientos, aterrizajes, entradas y enfrentamientos entre avispa y abejas. Si bien estos resultados sugieren que el aceite esencial de lavanda puede reducir el impacto causado por las avispa, este estudio es preliminar y se requiere una investigación más exhaustiva para determinar si tiene potencial como una herramienta de manejo. Por un lado, se necesitan estudios detallados sobre el efecto de los aceites esenciales en las colmenas, aunque al ser aplicados por fuera, como en el presente trabajo, no representarían un problema en cuanto a la toxicidad para abejas ni deberían afectar las propiedades organolépticas de los productos de la colmena. Posteriormente, debería evaluarse el radio de acción del efecto repelente. En los experimentos de elección y de no-elección llevados a cabo con el aceite esencial de *D. multifida* y alfa-terpineno se observó que las avispa se acercaron al

alimentador a pesar de la presencia del aceite, aunque la mayoría de ellas han sido finalmente disuadidas de aterrizar en el recurso. Este comportamiento es esperable debido a que estos compuestos volátiles actúan interfiriendo el forrajeo a corta distancia de la fuente de alimento. También sería importante evaluar la respuesta comportamental de las avispas frente a una aplicación más prolongada del repelente, a fin de examinar la respuesta en el mediano y largo plazo. Las forrajeras de *V. germanica* exhiben una alta plasticidad comportamental a nivel individual y mecanismos de comunicación social que guían a otras avispas a una fuente determinada. Por ej. las forrajeras de *Vespula* spp. poseen memoria espacial de largo plazo que les permiten relocalizar el sitio de alimentación durante un tiempo prolongado (Moreyra et al. 2016); incluso pueden continuar revisando el lugar aprendido aunque el alimento ya no esté disponible (Lozada y D'Adamo 2014). A nivel social, el incremento local y la comunicación en el nido pueden facilitar el descubrimiento de una fuente de alimento por conoespecíficas. Evaluar el rol de estos factores al momento de evaluar el efecto de los repelentes a base de aceites esenciales en el manejo de estas avispas plaga sería el siguiente paso para obtener una estimación más realista sobre su potencial eficacia para ser usado en la protección de colmenas.

En base a los resultados del presente estudio, es posible concluir que el aceite esencial de *D. multifida* y el alfa-terpineno tienen potencial para ser usados como repelentes contra avispas de *Vespula germanica*. Por otro lado, el uso de aceites esenciales, como el de lavanda, podría significar un menor impacto de insecticidas sintéticos sobre organismos no-blanco y una reducción de los ataques a colmenas de *Apis mellifera*. Futuros estudios podrían investigar la eficacia de formulaciones a base de aceites esenciales en la prevención de los ataques a colmenas, como así también evaluar si el uso simultáneo de trampas con compuestos atrayentes podría potenciar el efecto repelente en un escenario de manejo push-pull.

# Capítulo 3

Rol de la experiencia en la respuesta a olores:

Aprendizaje asociativo de un olor aversivo <sup>5</sup>

---

## Resumen

El aprendizaje asociativo puede modificar cómo los animales responden a estímulos relevantes del ambiente. En particular, los olores juegan un papel central durante la explotación de recursos. Por lo tanto, estudiar cómo el aprendizaje puede modular la respuesta a claves olfativas y su impacto en la toma de decisiones, resulta esencial para comprender el rol de la plasticidad comportamental durante el forrajeo. En este capítulo evalué si la experiencia apetitiva puede modular la respuesta a un olor aversivo (aceite esencial de lavanda) en *V. germanica*. Mediante experimentos a campo, evalué la respuesta al olor en avispas sin experiencia y con experiencia de forrajeo, tanto en ausencia como en presencia del olor bajo diferentes escenarios. Las avispas sin experiencia y aquellas que habían tenido experiencia de forrajeo en ausencia del olor, evitaron las fuentes de alimento con lavanda y no fueron atraídas por el olor no recompensado. Sin embargo, aquellas avispas que tuvieron experiencia con el olor exhibieron un patrón comportamental opuesto: prefirieron las fuentes de alimento con lavanda y fueron atraídas por el olor solo. El abanico de respuestas comportamentales desencadenadas por el olor luego de la experiencia apetitiva indica que el cambio en la respuesta ocurrió por aprendizaje asociativo. Así, un olor que inicialmente desencadenaba una respuesta aversiva se volvió atractivo. Este cambio en la valencia del olor ocurrió luego de un evento de recolección, mientras que tres y cinco visitas condujeron a una memoria olfativa que perduró 24 hs. Además, la memoria del olor promovió un mayor

---

<sup>5</sup> Yossen, M. B., Buteler, M., & Lozada, M. (2020). Foraging experience modulates response to aversive odour cues in social wasps. *Animal Behaviour*, 164, 113-122.



consumo de un recurso diferente y menos atractivo (sacarosa). Estos resultados muestran que la respuesta espontánea a un olor puede ser modulada radicalmente por la experiencia. Asimismo, contribuyen a mejorar nuestro entendimiento sobre las habilidades de aprendizaje y memoria olfativa de las avispas eusociales en el contexto de forrajeo de carroña.

**PALABRAS CLAVE:** aprendizaje asociativo, plasticidad comportamental, memoria olfativa, *Vespula germanica*, olores aversivos.

## 1. Introducción

La habilidad de los animales de modificar su comportamiento en base a la experiencia es crucial para lidiar con situaciones cambiantes e inesperadas, y en última instancia, para su supervivencia (Dukas 2013; Snell-Rood 2013). La experiencia puede afectar cómo los organismos responden a ciertos estímulos o situaciones particulares de su ambiente. Por lo tanto, un mayor conocimiento sobre cómo la experiencia modula el comportamiento es relevante para entender una variedad de aspectos de la vida de un animal, como el forrajeo (Shettleworth 2001; Saleh y Chittka 2006; Jernigan et al. 2019).

Las claves olfativas son esenciales en la búsqueda de fuentes de alimento y la respuesta a estos estímulos está influenciada por el aprendizaje. Un número creciente de estudios demuestra que ciertas claves olfativas que rodean a una fuente de alimento pueden adquirir un significado para el animal al volverse asociadas al alimento luego de una experiencia apetitiva (Hartlieb et al. 1999; Shettleworth 2010; Giurfa 2015). Estas asociaciones, a su vez, pueden dar lugar a memorias olfativas que guiarán las decisiones futuras (Menzel 1999, 2009). De esta manera, mecanismos asociativos relativamente simples pueden conducir a cambios radicales en los patrones de toma de decisiones durante forrajeo

(e.g., Saverschek y Roces 2011; Arenas y Farina 2012; Moreyra et al. 2014; Moreyra y Lozada 2018).

Entre los insectos, las avispas sociales como *Vespula germanica* ofrecen un modelo interesante para el estudio de la plasticidad comportamental durante el forrajeo. Una vez que una nueva fuente de carroña es descubierta, las forrajeras retornan al sitio de alimentación reiteradas veces, incluso aunque el alimento ya no esté disponible (e.g., Lozada y D'Adamo 2011). Se ha demostrado que este comportamiento de relocalización involucra diversas habilidades cognitivas (e.g., Lozada y D'Adamo 2014; Wilson-Rankin 2014). Durante su visita a la fuente, las forrajeras aprenden a asociar claves visuales y contextuales (e.g., colores y patrones) con la fuente de alimento, lo que les ayuda a reconocer el lugar previamente recompensado con una sorprendente precisión incluso 24 h después (D'Adamo y Lozada 2003, 2008, 2011; Lozada y D'Adamo 2009; Moreyra et al. 2017). Interesantemente, se ha demostrado que una sola visita de recolección es suficiente para que se produzca aprendizaje asociativo entre una fuente y estímulos visuales/espaciales (Lozada y D'Adamo 2006, 2011; Moreyra y Lozada 2018).

Si bien se ha estudiado con bastante profundidad el aprendizaje de claves visuales y contextuales (e.g., Lozada y D'Adamo 2014), se ha dedicado menos atención a la plasticidad comportamental en relación a estímulos olfativos y, mucho menos, al rol de los olores aprendidos en las decisiones de forrajeo en el campo. En véspidos, las claves olfativas participan en la búsqueda de fuentes de proteínas y carbohidratos, tanto a nivel individual (Raveret Richter 2000) como a nivel colectivo (Overmyer y Jeanne 1998; Santoro et al. 2015; Lozada et al. 2016). Recientemente se ha demostrado que las avispas sociales son capaces de aprender a asociar olores con fuentes ricas en carbohidratos (McPheron y Mills 2007; Elmquist y Landolt 2018; El-Sayed et al. 2018). Por ejemplo, un estudio de laboratorio demostró que la respuesta de atracción de *Polistes dominula* hacia olores de fruta fermentada aumentó luego de experiencias apetitivas con el olor (Elmquist y Landolt 2018). También se encontró evidencia de aprendizaje asociativo en poblaciones naturales de *V. germanica* y *V.*

*vulgaris* en Nueva Zelanda, donde se observó que las avispas son atraídas por ciertas claves olfativas presentes en exudados de áfidos sólo cuando estas claves están presentes en el ambiente en que se desarrolla la colonia (El-Sayed et al. 2018). Sin embargo, aún no se sabe si la respuesta a olores puede ser modificada por la experiencia y cómo estos cambios impactan en las decisiones de forrajeo.

Los olores aversivos plantean un caso interesante para el estudio de la plasticidad comportamental en relación a estímulos olfativos. En insectos, los olores repelentes derivados de metabolitos secundarios de plantas pueden afectar fuertemente las decisiones de forrajeo cuando están asociados a una fuente de alimento (ver capítulo 1). Estudios recientes llevados a cabo con avispas sin experiencia mostraron que la presencia de estos olores puede disuadir el forrajeo cuando se aplican en las cercanías de una fuente de proteínas o carbohidratos (Zhang et al. 2013; Boevé et al. 2014; Buteler et al. 2016; Capítulo 2). Por lo tanto, cambios en la respuesta hacia olores aversivos como resultado del aprendizaje apetitivo pueden resultar en cambios radicales en la explotación de fuentes de alimento. Por otra parte, los olores repelentes tienen relevancia también desde el punto de vista aplicado, ya que su uso ha sido planteado como una posible herramienta de manejo para prevenir los daños causados por avispas invasoras sobre ciertos recursos, como colmenas de *A. mellifera*. En este sentido resulta de gran relevancia evaluar en qué medida el aprendizaje asociativo puede afectar la eficacia de estos bio-repelentes.

En este capítulo me propuse profundizar en la plasticidad comportamental de las avispas de *V. germanica* durante la explotación de carroña. En particular analicé en qué medida la respuesta comportamental a un olor aversivo puede ser modificada por la experiencia apetitiva con ese olor. Para esto, llevé a cabo diferentes tipos de experimentos a campo usando el aceite esencial de lavanda como estímulo repelente, cuya eficacia fue probada por Zhang y colaboradores (2013) y también en el capítulo 2 de esta tesis. Para evaluar la respuesta al olor, se combinaron experimentos de elección (i.e., dos fuentes de alimento disponibles) y de no-elección (i.e., una única fuente de alimento disponible), ya que

la respuesta de las avispas al olor puede depender del valor de la fuente de alimento, y éste a su vez puede ser influenciado por la disponibilidad de fuentes alternativas (Bateson 2004). En primer lugar, analicé la respuesta espontánea de avispas sin experiencia hacia una fuente de alimento pareada con lavanda. Posteriormente, analicé la respuesta al olor en avispas que tuvieron experiencia de recolección en presencia de lavanda. Al mismo tiempo, también examiné cómo el cambio en la respuesta a la lavanda impacta en las decisiones de forrajeo de las avispas al evaluar la respuesta a una fuente con el olor en diferentes escenarios: una única fuente disponible (i.e., no-elección), dos fuentes disponibles simultáneamente (i.e., elección), olor solo, y olor pareado a una fuente de alimento diferente y menos atractiva (i.e., solución de sacarosa). Por último, también analicé el rol del nivel de experiencia en la subsecuente respuesta al olor y la persistencia del cambio en la respuesta al olor al evaluar la memoria olfativa a 24 hs.

## **2. Metodología**

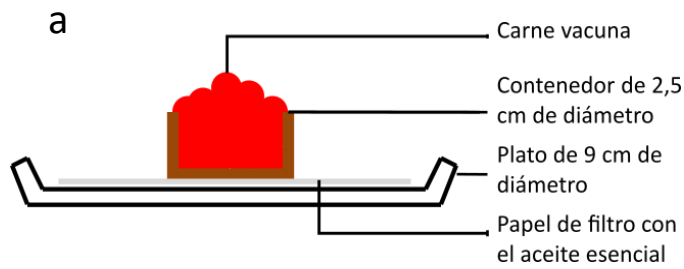
### **2.1 Sitio de estudio e insectos**

Con el fin de estudiar el comportamiento de las avispas en su contexto natural de forrajeo, los experimentos fueron llevados a cabo a campo con avispas provenientes de colonias silvestres. Los experimentos fueron hechos en las costas de los lagos Gutiérrez, Moreno y Nahuel Huapi, en San Carlos de Bariloche (41°S, 71°O), donde es frecuente encontrar a las forrajeras en busca de alimento y agua. El trabajo fue llevado a cabo en el área de la costa de los lagos, entre las 10:00 a 17:00 horas y durante el periodo de mayor actividad de las colonias de *V. germanica* (febrero-abril de 2017 y 2018). Los experimentos se realizaron bajo condiciones meteorológicas relativamente similares, en las que la temperatura ambiente osciló entre 15-25°C y la velocidad de viento fue inferior a 7 km/h de acuerdo a la página web windguru (<https://www.windguru.cz/>).

## 2.2. Procedimiento general de los experimentos

Como fuente de alimento carne bovina picada colocada dentro de un pequeño contenedor de plástico rojo (2,5 cm de diámetro x 1 cm de alto) apoyado sobre un plato plástico blanco (9 cm de diámetro x 0,5 cm de alto) (Fig. 1). Como modelo de estímulo aversivo se usó el aceite esencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*), ya que en el capítulo 2 de esta tesis, como así también en estudios previos, se ha demostrado que presenta una marcada actividad repelente (Zhang et al. 2013; Boevé et al. 2014). El aceite esencial puro fue aplicado (100  $\mu$ l) a un papel filtro (Whatman No. 1) ubicado entre el contenedor pequeño y el plato blanco. De esta manera, el aceite esencial no entró en contacto directo con la carne y las avispas fueron expuestas solamente al olor. En todos los experimentos, el volumen de aceite esencial aplicado fue el mismo. Se utilizó aceite esencial comercial (Swiss-Just). Una vez iniciado el experimento, tanto la carne como los recipientes plásticos y el papel filtro junto con el aceite esencial fueron completamente renovados cada 15 minutos.

Todos los experimentos involucraron la observación de avispas que espontáneamente se acercaron al alimentador colocado sobre el suelo, es decir, las avispas nunca fueron capturadas. En cada experimento se trabajó con una sola avispa con el propósito de prevenir el incremento local. Cualquier otra avispa que aterrizó sobre el alimento fue removida con un aspirador manual para insectos (D'Adamo et al. 2000). Cada réplica de cada conjunto de experimentos fue llevada a cabo en diferentes ubicaciones separadas al menos por 200 m, con el fin de trabajar con individuos provenientes de diferentes colonias (Edwards 1980; Moreyra et al. 2012; Wilson-Rankin 2014).



**Figura 1.** Esquema (a) y fotografía (b) de un alimentador proteico empleado durante los experimentos (créditos: M.B. Yossen)

### 2.3. Experimento 1: Respuesta de avispas sin experiencia

Para evaluar si la respuesta inicial de las avispas hacia el olor de lavanda puede ser modificada por la experiencia apetitiva con dicho olor, primero analicé el comportamiento de avispas sin experiencia (i.e., avispas que no fueron expuestas previamente al alimentador ni al olor). La respuesta de las avispas al olor fue evaluada en diferentes escenarios: 1) una única fuente de alimento disponible, ya sea con o sin lavanda (i.e., escenario de no-elección), 2) dos fuentes de alimento disponibles simultáneamente, una con lavanda y otra sin lavanda (escenario de elección), y 3) una fuente de alimento versus el olor a lavanda solo (i.e., escenario de elección) (Fig. 2a).

Por medio de experimentos de no-elección, evalué separadamente la respuesta de aterrizaje y de recolección hacia una única fuente de alimento, ya sea tratada con lavanda o no tratada. En el primer experimento, analicé sólo la respuesta de aterrizaje. Para esto, coloqué un alimentador en el centro de un anillo de alambre de 50 cm de diámetro. Luego, evalué si la primera avispa que ingresó al área delimitada por el anillo aterrizó o no sobre la fuente de alimento (i.e., respuesta de aterrizaje). El comportamiento de la avispa fue registrado por medio de una cámara Canon PowerShot SX170 IS (30 cuadros/segundo) colocada sobre un trípode. Consideré que ocurrió un aterrizaje cuando la avispa tocó el alimento con sus seis patas. En el otro experimento de no-elección, evalué solamente la respuesta de recolección. En este caso, luego de colocar el alimentador sobre el suelo, esperé a que una avispa aterrizara espontáneamente sobre la carne y luego registré si recolectó o no carne (i.e., éxito de recolección). Se consideró que ocurrió un evento de recolección cuando la avispa abandonó la fuente llevando un trozo de carne entre sus mandíbulas.

Por medio de un ensayo de elección, evalué la preferencia de las avispas por una fuente de alimento con lavanda versus una fuente sin lavanda, ambas ofrecidas simultáneamente. Durante el experimento, los alimentadores fuente fueron colocados a 60 cm de distancia entre sí y formando una línea perpendicular a la dirección del viento, con el fin de evitar la superposición de las plumas de olor. Cuando una avispa arribó espontáneamente al área experimental, registré al alimentador elegido en términos del primer aterrizaje. El siguiente experimento de elección se llevó a cabo para corroborar la hipótesis de que el olor de lavanda constituye un estímulo aversivo incluso para aquellas pocas avispas que igualmente aterrizaban en la fuente con el olor aversivo. En el experimento, primero se permitió que una avispa aterrizara espontáneamente sobre una de fuente de alimento tratada con lavanda (o no tratada, en el caso del tratamiento control), la cual fue inmediatamente marcada de acuerdo al procedimiento descrito en la subsección 2.2. Luego del marcado, el alimentador cuidadosamente removido con el fin de evitar que la avispa adquiriera una experiencia de recolección exitosa con la fuente. Luego de dos minutos, se insertaron dos

alimentadores nuevos, uno tratado con lavanda y el otro sin tratar. Ambos fueron colocados a 60 cm uno del otro y a 1,5 m de distancia de la posición original, en dirección opuesta a la dirección del viento. Este arreglo espacial en forma de V fue usado para desacoplar las nuevas fuentes de alimento del micrositio aprendido, ya que numerosos estudios han demostrado que las preferencias de las forrajeras de *V. germanica* pueden ser influenciada por las claves visuales y contextuales aprendidas durante los encuentros anteriores (e.g., Lozada y D'Adamo 2014; Moreyra y Lozada 2018). Cuando la avispa marcada retornó al área experimental (en general a los pocos minutos de haber colocado los alimentadores nuevos), registré la fuente elegida al observar su primer aterrizaje. La posición relativa de los alimentadores fue alternada aleatoriamente entre experimentos.

Por último, llevé a cabo un experimento de elección en el que se evaluó la respuesta de atracción al olor versus el alimento solo. En este caso, se colocó un alimentador con carne sola y a 60 cm de distancia se colocó un plato blanco con una pieza de papel filtro (3 x 3 cm) impregnado en aceite esencial, formando una línea perpendicular a la dirección del viento. Una vez colocados, registré la elección de la primera avispa que se acercó espontáneamente al área experimental. En este caso, la elección fue evaluada en términos del primer acercamiento. Un evento de acercamiento ocurrió cuando la avispa se aproximó a menos de 10 cm del plato, ya sea con carne o con lavanda.

#### 2.4. Experimento 2: Respuesta de avispas con experiencia

Luego de evaluar la respuesta de las avispas sin experiencia, examiné la respuesta al olor de lavanda en avispas que tuvieron experiencia exitosa de forrajeo (i.e., que abandonaron la fuente llevando una pieza de carne entre sus mandíbulas, ya sea en presencia de lavanda o en ausencia del olor. La respuesta también fue evaluada mediante experimentos de no-elección y de elección (Fig. 2a).



En el primer experimento, evalué si la presencia del olor de lavanda alrededor del alimento afectaba el desempeño de las avispas durante la relocalización del recurso, bajo un escenario de no-elección. Si la presencia del olor tiene una interferencia negativa en el comportamiento de las avispas durante la relocalización del recurso, la predicción es que las avispas dejarán de retornar a la fuente, fallarán en recolectar alimento o demorarán más tiempo en manipularlo. El experimento consistió en dejar que una avispa aterrice sobre un alimentador con lavanda (o sin lavanda, en el caso del tratamiento control) y recolecte alimento una vez, con la finalidad de que ésta adquiriera una experiencia de recolección exitosa. Aquellas avispas que en esta instancia abandonaron la fuente sin recolectar alimento fueron excluidas del experimento. Posteriormente, registré si la avispa retornó al área experimental y si recolectó carne (i.e., éxito de recolección) durante las siguientes tres visitas. Adicionalmente, durante cada visita también registré el tiempo transcurrido desde el primer aterrizaje de la avispa hasta la partida llevando un trozo de carne (i.e., tiempo de manipulación). Luego de la cuarta visita, el alimentador fue removido y reemplazado por un plato blanco limpio idéntico al utilizado en el alimentador, como se describió en Lozada y D'Adamo (2006). Cuando la avispa retornó al área experimental y encontró que el alimento ya no estaba disponible, evalué el comportamiento de búsqueda. La respuesta de búsqueda fue cuantificada mediante dos variables respuesta: número total de sobrevuelos y número total de aterrizajes hechos sobre el plato vacío durante 30 minutos. Un “sobrevuelo” ocurrió cuando la avispa voló sobre el plato sin aterrizar sobre él.

En el segundo experimento analicé la respuesta de las avispas frente a una fuente tratada con lavanda vs una no tratada, ambas disponibles simultáneamente en un escenario de elección. En este caso el experimento involucró dos fases: una fase de entrenamiento y una fase de prueba. Durante la etapa de entrenamiento, se permitió que una avispa naïve aterrice y recolecte alimento durante tres visitas consecutivas de un alimentador tratado con lavanda (o no tratado, en el caso del grupo control). Luego de la tercera visita, el alimentador usado durante el entrenamiento fue removido y se colocaron dos nuevos alimentadores a 1.5 m del

sitio de entrenamiento, siguiendo una disposición en forma de V como la que se describió previamente. Cuando la avispa marcada retornó al área experimental, se inició la fase de prueba, la cual consistió en registrar el alimentador elegido en términos del primer aterrizaje.

Por último, evalué la respuesta al olor de lavanda versus carne sola, ofrecidos de manera simultánea en un espacio de elección. En este caso, se permitió que una avispa aterrice y recolecte alimento durante tres visitas consecutivas de un alimentador tratado con lavanda (o no tratado, en el caso del tratamiento control). Una vez finalizada la fase de entrenamiento, el alimentador fue removido y a 1,5 m de distancia del sitio de entrenamiento se colocó un alimentador con carne sola y una pieza de papel filtro el aceite esencial de lavanda, de acuerdo al arreglo en forma de V detallado en los experimentos anteriores. Cuando la avispa retornó al área experimental, se registró la elección de la avispa en términos de su primer acercamiento hacia alguno de los estímulos.

## 2.5. Experimento 3: Rol del nivel de experiencia en la respuesta al olor y memoria de largo plazo.

En este punto evalué si la respuesta a la lavanda varía de acuerdo al nivel de experiencia (i.e., número de visitas de recolección) en presencia del olor. También exploré las habilidades de memoria de largo plazo de las avispas al evaluar si los cambios en la respuesta al olor como resultado de la experiencia apetitiva pueden ser retenidos a lo largo de 24 h.

Dos grupos de avispas fueron independientemente entrenados y puestos a prueba: “grupo 0 h” y “grupo 24 h”. En el grupo 0 h, se entrenó a una avispa naïve a recolectar alimento de una fuente con lavanda (o sin lavanda, en el caso del grupo control) durante una, tres o cinco visitas consecutivas, de acuerdo al tratamiento (i.e., niveles de experiencia). Una vez finalizada la etapa de entrenamiento y antes de que la avispa marcada retornara en su visita siguiente, se removió el alimentador de entrenamiento y se insertaron dos piezas de

papel filtro (3 x 3 cm) a 1,5 m “viento arriba” del sitio de entrenamiento, a 60 cm de distancia una de la otra, siguiendo un arreglo en forma de V. En esta etapa, no se utilizó el plato blanco, para evitar que claves visuales aprendidas desencadenaran una respuesta de atracción. Las piezas de papel se sujetaron con pinzas sujetadoras y permanecieron suspendidas a 5 cm del suelo. Una de las piezas contenía impregnado el aceite esencial mientras que otra no fue tratada. Cuando la avispa retornó al área experimental, la fase de prueba consistió en registrar el número total de acercamientos y de aterrizajes hechos hacia cada uno de los papeles filtro durante 15 minutos. En este caso, se consideró que hubo un “acercamiento” cuando la avispa se aproximó dentro de los 10 cm del papel del filtro (Ver comportamiento de acercamiento en Anexo). Un “aterrizaje” ocurrió cuando la avispa tocó el papel filtro con sus seis patas (Fig. 2b).

En el grupo 24 h, la fase de entrenamiento fue llevada a cabo de la misma manera que el grupo 0 h. Tres subgrupos de avispas fueron también diferencialmente entrenados con una, tres o cinco visitas a un alimentador con lavanda (o sin lavanda, en el caso del grupo control). Sin embargo, en este grupo la fase de prueba fue llevada a cabo 24 h después del entrenamiento. Una vez finalizado el entrenamiento, el alimentador fue removido. Al día siguiente ( $24 \pm 1$  h) se colocaron dos papeles filtro, uno tratado con lavanda y otro sin tratar, a 1,5 m del sitio exacto en el que se había colocado el alimentador de entrenamiento en dirección contraria a la dirección del viento y a 60 cm de distancia uno del otro. Luego, esperé que la avispa marcada retornara espontáneamente al área experimental. Si la avispa marcada no fue observada en las inmediaciones del área experimental dentro de un periodo de 60 min se consideró que no retornó. Si la avispa fue observada en el área experimental, registré el número total de acercamientos y de aterrizajes hechos sobre cada papel filtro durante 15 minutos desde que fue observada por primera vez (Fig. 2b).

## 2.6. Experimento 4: Influencia de la experiencia en decisiones de consumo

Para analizar con mayor profundidad cómo los cambios en la respuesta al olor aversivo como resultado de la experiencia apetitiva pueden influenciar las decisiones de forrajeo, aquí analicé la respuesta de consumo de las avispas hacia un recurso de diferente tipo y menos atractivo que la carne (solución de sacarosa) que contenía el olor previamente experimentado. Previo al experimento, llevé a cabo un ensayo de preferencia para corroborar que, bajo las condiciones experimentales actuales, la solución de sacarosa constituye un recurso menos atractivo que la carne, como ha sido observado en estudios previos (D'Adamo y Lozada 2003; Masciocchi et al. 2019). La fuente de sacarosa consistió en 2,5 ml de una solución de sacarosa (50% peso/peso) aplicada en forma de gotas sobre un plato plástico blanco idéntico al descrito previamente para los alimentadores con carne. El alimentador con carne fue idéntico al utilizado en los experimentos anteriores. Ambos alimentadores fueron colocados sobre el suelo, a 60 cm uno del otro y formando una línea perpendicular a la dirección del viento. Una vez colocados, registré la elección (en términos del primer aterrizaje) de la primera avispa naïve que se acercó al área experimental.

Posteriormente, evalué si la experiencia apetitiva con carne pareada a la lavanda puede promover un aumento en la respuesta de consumo de una solución rica en carbohidratos (i.e., sacarosa) pareada al olor previamente experimentado. El entrenamiento consistió de tres visitas consecutivas de recolección a un alimentador de carne vacuna tratado con lavanda. Antes de la cuarta visita, se removió el alimentador de entrenamiento y se colocaron dos alimentadores de sacarosa a 1 m de distancia “viento arriba” del sitio donde se encontraba el alimentador de prueba, y a 60 cm de distancia uno del otro. Para evitar la influencia de claves visuales aprendidas, los alimentadores que se emplearon durante la fase de prueba fueron de diferente forma y color de aquél usado durante el entrenamiento. El alimentador estuvo compuesto por un plato plástico cuadrado y de color marrón (10 x 10 cm) con una pieza de papel filtro (3 x 3 cm) situada en el centro del cuadrado. Uno de los alimentadores contenía además el aceite esencial de lavanda que fue aplicado sobre la pieza de papel filtro. La solución de sacarosa (2,5 ml) se aplicó en forma de gotas que rodearon el

papel filtro sin entrar en contacto con él. Cuando la avispa retornó al área experimental y se encontró con la solución de sacarosa en lugar de la carne, registré si consumió sacarosa o no, como así también cual fue el alimentador elegido. Si la avispa no consumió de la solución dentro de los 15 min posteriores a su llegada, se consideró que no hubo consumo (Fig. 2c).

## **2.7. Análisis estadístico**

En los experimentos con avispas sin experiencia, en primer lugar, se evaluó el éxito de aterrizaje (i.e. si la avispa aterrizó o no sobre la fuente de alimento) y el éxito de recolección (i.e. si la avispa logró recolectar cerne o no) a una única fuente de alimento única (escenario de no elección), ya sea tratada con aceite esencial o no tratada con. Para cada variable respuesta se construyó una tabla 2 x 2 que se analizó mediante el test exacto de Fisher (Sokal y Rohlf 1995). El test binomial exacto fue empleado para analizar los resultados de los tres tipos experimentos de elección (carne+lavanda vs carne en avispas sin ninguna experiencia previa, carne+lavanda vs carne en avispas con experiencia previa solo de aterrizaje, y lavanda vs carne) para determinar si la frecuencia de avispas a cada estímulo difirió estadísticamente de la distribución esperada por azar del 50% en cada una. Luego, se usó el test exacto de Fisher para comparar la frecuencia de avispas en cada estímulo entre ambos tratamientos.

En los experimentos de no-elección con avispas con experiencia, primero comparé el éxito de recolección, definido como el número de avispas que lograron recolectar alimento durante las tres visitas consecutivas/número total de avispas del experimento) entre ambos tipos de fuente de alimento (tratada y no tratada) mediante el test exacto de Fisher. Para evaluar si la presencia del aceite esencial de lavanda tenía un efecto en el tiempo de manipulación del recurso, se construyó un Modelo Lineal Mixto en el cual la variable respuesta fue el tiempo de manipulación (medido en segundos), la variable explicativa fue el tratamiento (con dos niveles: alimentador tratado con lavanda y alimentador no tratado), y

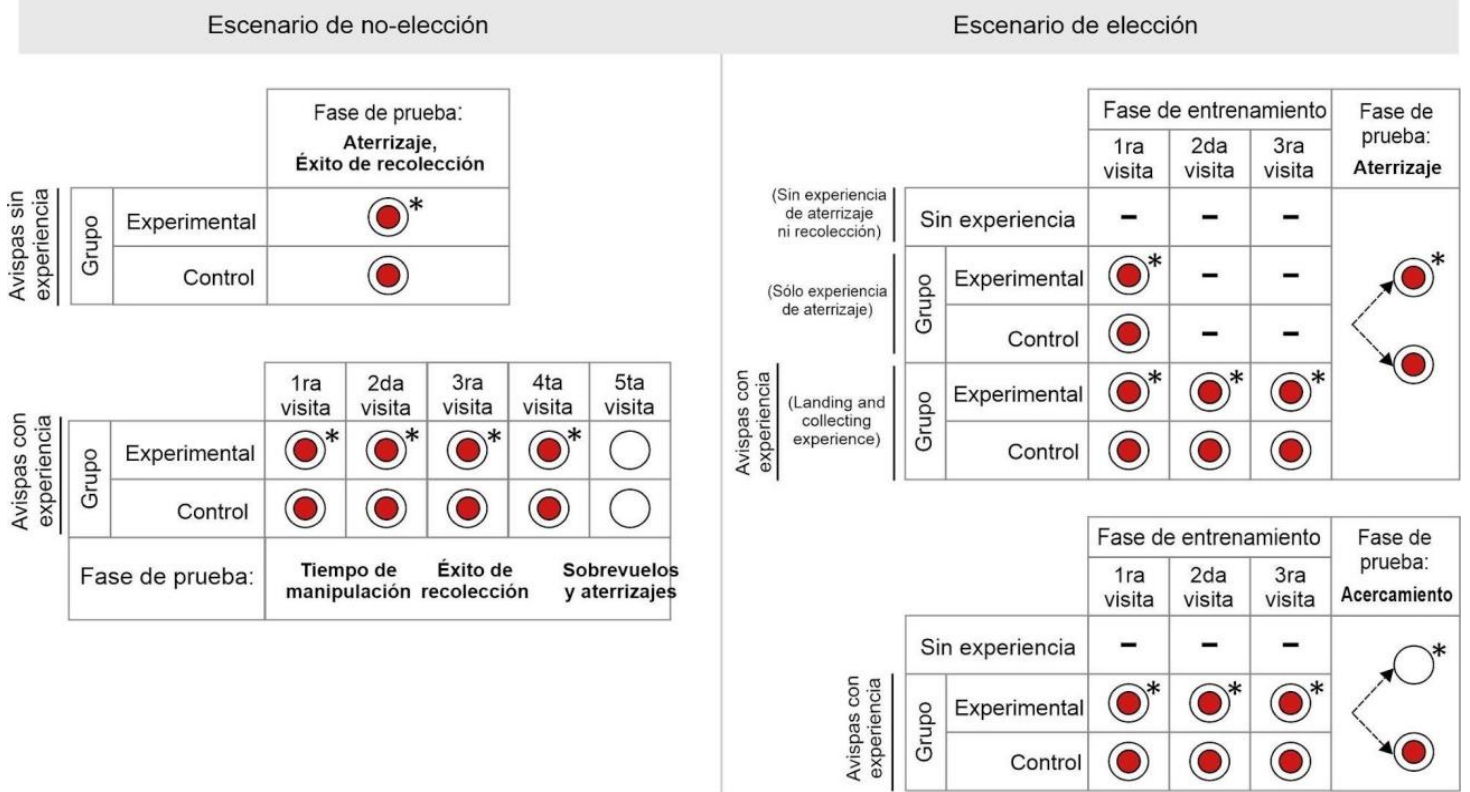
como factor aleatorio se incluyó al individuo ya que las réplicas no fueron independientes ya que están anidadas por individuo. La respuesta de búsqueda, evaluada en términos del número total de sobrevuelos y el número total de aterrizajes hechos sobre el plato vacío luego de la remoción del alimento, fue analizada mediante el test de Mann-Whitney y ambas variables respuesta fueron analizadas por separado. Para los experimentos resultados de los dos experimentos de elección (carne+lavanda vs carne, carne vs lavanda) llevé a cabo los mismos test estadísticos que los empleados para los experimentos de elección con avispas sin experiencia.

Para analizar cómo el nivel de experiencia (i.e., uno, tres y cinco visitas) afecta la respuesta al olor no recompensado, primero apliqué el test de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar la respuesta de atracción, definida como el número de acercamientos + aterrizajes realizados hacia el papel de filtro con lavanda y el papel filtro solo. Si el número de episodios de atracción hacia el papel filtro con lavanda difirió estadísticamente del papel filtro no tratado, se consideró que hubo una respuesta de atracción hacia el olor. En el caso de que hubiera habido una respuesta significativa al olor, comparé la respuesta de atracción sólo hacia el papel filtro con lavanda entre los tres niveles de experiencia por medio del test de Kruskal-Wallis. En el caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de experiencia, llevé a cabo comparaciones múltiples por medio del test de Dunn ajustado por el método de Bonferroni. Para el grupo de 24 h, además de estos análisis, también evalué la tasa de retorno al área experimental. Por medio del test exacto de Fisher comparé la tasa de retorno, definida como el número de avispas que retornaron al área experimental/número total de avispas, entre los tres niveles de experiencia y para ambos tratamientos (fuente de alimento con lavanda, fuente de alimento no tratada). En el caso de requerir comparaciones a posteriori, se aplicó la corrección de Bonferroni al ajustar  $\alpha$  por comparación a  $\alpha' = \alpha/k$ , donde  $k$  es el número de comparaciones. Tanto la respuesta de atracción, como así también el rol del nivel de experiencia en la respuesta al olor, fueron evaluadas de igual manera que en el grupo 0h.

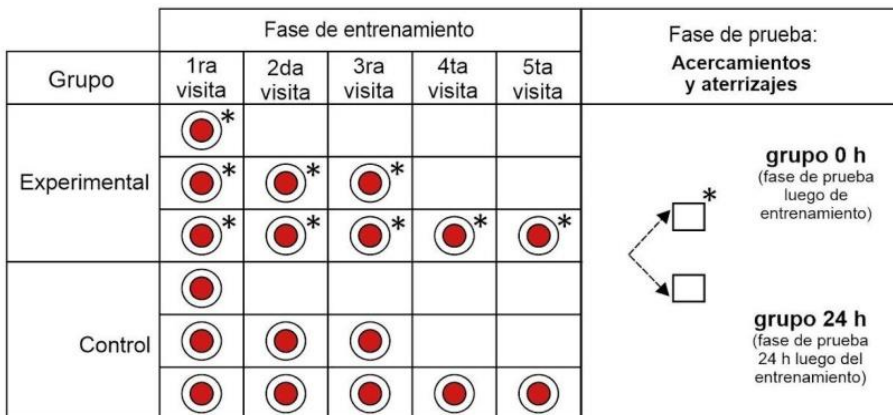
Finalmente, para evaluar si la experiencia previa apetitiva con el olor de lavanda puede influenciar la respuesta de consumo de sacarosa cuando está pareada al olor, usé el test exacto de Fisher para comparar la frecuencia de avispas que consumieron solución de sacarosa (ya sea de una fuente con lavanda o sin lavanda) entre ambos tratamientos. El análisis de la preferencia de avispas sin experiencia por carne vs sacarosa, y avispas con experiencia por sacarosa + lavanda vs sacarosa se llevó a cabo por medio del test binomial exacto.

Los análisis estadísticos fueron realizados por medio del software R v. 3.5.1 (R Core Team, 2018) con un  $\alpha=0.05$ . El modelo lineal mixto fue construido con la función "lmer" del paquete "lme4" (Bates et al. 2015) y la significancia del factor fue evaluado mediante la función "anova()" del paquete "stats".

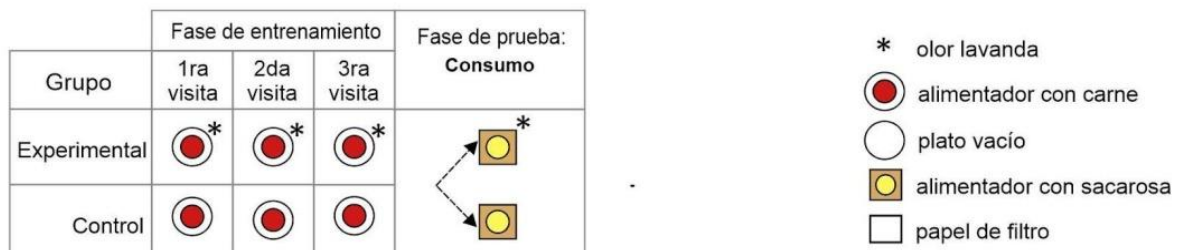
**a) Respuesta al olor pareado a una fuente de alimento en avispas sin y con experiencia de forrajeo**



**b) Rol del nivel de experiencia en la respuesta al olor y memoria de largo plazo**



**c) Influencia de la experiencia con el olor en la decision de consumo de un recurso diferente**



**Figura 2.** Esquema del diseño experimental. a) Respuesta a una fuente de alimento con lavanda en avispas sin y con experiencia previa de recolección, en un contexto de no-elección (i.e., una única



fuentes de alimento disponibles, ya sea con lavanda o sin lavanda) o de elección (i.e., dos fuentes de alimento disponibles, una con lavanda y otra sin lavanda). b) Influencia del nivel de experiencia (i.e., una, tres o cinco visitas) en la respuesta al olor de lavanda solo en avispas entrenadas en presencia o ausencia del olor). En este caso, dos subgrupos de avispas fueron independientemente entrenados y testeados: grupo 0 h en el que la fase de prueba se llevó a cabo inmediatamente luego del entrenamiento, y grupo 24 h en el que la fase de prueba fue llevada a cabo  $24 \pm 1$  h después de finalizado el entrenamiento. La respuesta de atracción fue evaluada en términos del número total de acercamientos + aterrizajes. c) Respuesta de consumo de una solución de sacarosa + lavanda (o sin olor, según el tratamiento) en avispas que tuvieron experiencia previa de forrajeo con una fuente de proteína + lavanda (o sin lavanda, según el tratamiento). La respuesta de consumo fue evaluada en términos de consumo (i.e., si la avispa consumió solución o no) y de preferencia.

### 3. Resultados

#### 3.1. Experimento 1: Respuesta de avispas sin experiencia

En los experimentos de no-elección, solo un pequeño porcentaje de avispas aterrizó en la fuente de alimento con lavanda (carne+lavanda: 16,2%; carne: 97,2%) (Test exacto de Fisher:  $N(\text{carne+lavanda}) = 37$ ,  $N(\text{carne}) = 36$ ,  $P < 0,0001$ ; Fig. 3a). Sin embargo, no encontré diferencias estadísticamente significativas cuando comparé el éxito de recolección entre una fuente tratada con lavanda y una fuente no tratada (test exacto de Fisher:  $N(\text{carne+lavanda}) = 40$ ,  $N(\text{carne}) = 42$ ,  $P = 0,24$ ).

Cuando las avispas pudieron elegir entre una fuente de alimento con lavanda versus una no tratada, ellas mostraron una fuerte respuesta de evitación hacia la fuente con lavanda y muy pocas avispas lograron aterrizar sobre esta fuente (carne+lavanda: 7,5%) (test binomial exacto:  $N = 42$ ,  $P < 0,0001$ ; Fig. 4a). Incluso aquellas avispas que previamente habían aterrizado en la fuente con lavanda cuando ésta era la única opción disponible, luego la evitaron cuando se les dio la opción de elegir entre una fuente con lavanda y una fuente no tratada (test binomial exacto:  $N = 40$ ,  $P < 0,0001$ ; Fig. 3a). El mismo patrón se observó en las avispas que tuvieron un primer encuentro de aterrizaje con la fuente sin tratar (test exacto de Fisher:  $N(\text{carne+lavanda}) = 42$ ,  $N(\text{lavanda}) = 42$ ,  $P = 0,15$ ). Finalmente, al examinar la

respuesta de las avispas al olor de lavanda sólo vs carne, se encontró que la presentación del olor solo no desencadenó respuestas de acercamiento, y todas las avispas evaluadas se acercaron a la fuente de carne (test binomial exacto:  $N = 39$ ,  $P < 0,0001$ ; Fig. 5a).

### 3.2. Experimento 2: Respuesta de avispas con experiencia

Al evaluar el comportamiento de relocalización de las avispas (i.e., escenario de no-elección) luego de haber tenido una experiencia de recolección con la fuente, se encontró que el éxito de recolección en una única fuente con lavanda no difirió estadísticamente del observado en la fuente no tratada (test exacto de Fisher:  $N(\text{carne+lavanda}) = 40$ ;  $N(\text{carne}) = 42$ ;  $P = 0,48$ ; Fig. 3b). Tampoco se encontró diferencia en el tiempo de manipulación del alimento entre la fuente con lavanda y la fuente no tratada (LMM, anova:  $F(1,80) = 0,33$ ;  $P = 0,56$ ; Fig 3b). Cuando las avispas retornaron al área experimental y encontraron que el alimento ya no estaba allí, ellas típicamente permanecieron buscando el alimento durante todo el periodo analizado (30 minutos). De manera similar a lo observado en la tasa de retorno y el tiempo de manipulación, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de sobrevuelos hechos sobre el plato vacío entre avispas habían sido entrenadas con carne con lavanda y aquéllas que habían sido entrenadas en ausencia de este olor (media±error estándar; carne+lavanda=  $32,5 \pm 1,5$  avispas,  $N = 40$ ; carne:  $33,34 \pm 1,7$  avispas,  $N = 42$ ) (test de Mann–Whitney:  $U = 352$ ,  $P = 0,99$ ; Fig. 3b); sin embargo, hubo una cierta tendencia a ser significativas en el caso de los aterrizajes (media±error estándar; carne+lavanda:  $2,2 \pm 0,5$  avispas,  $N = 40$ ; carne:  $3,9 \pm 0,6$  avispas,  $N = 42$ ) (test de Mann–Whitney:  $U = 452$ ,  $P = 0,08$ ).

Cuando se evaluó la preferencia por una fuente con lavanda versus una no tratada, el patrón de preferencia dependió del tipo de experiencia de la avispa. Las avispas que habían sido entrenadas con la fuente no tratada mostraron una fuerte preferencia (94,6%) por esta

fuelle (test binomial exacto:  $N = 37$ ,  $P < 0,0001$ ; Fig. 4b). Por el contrario, las avispas que habían sido entrenadas en presencia de lavanda mostraron una marcada preferencia por la fuente tratada (82,1%) (Test binomial exacto:  $N = 39$ ,  $P < 0,0001$ ). Cuando el olor de lavanda y la carne fueron ofrecidos por separado en bifurcación, las avispas que habían sido entrenadas con la fuente no tratada, no mostraron una respuesta de atracción al olor y todas ellas se dirigieron hacia la fuente de alimento (test binomial exacto:  $N = 33$ ,  $P < 0,0001$ ; test exacto de Fisher:  $P < 0,0001$ ). Por otra parte, las avispas que habían sido entrenadas a recolectar alimento en presencia de lavanda sí exhibieron una respuesta de atracción hacia este olor, de hecho, fueron igualmente atraídas por la lavanda y por el recurso (test binomial exacto:  $N = 34$ ,  $P = 0.23$ ; Fig. 5b).

### 3.3. Experimento 3: Rol del nivel de experiencia en la respuesta al olor y memoria de largo plazo

Cuando las avispas del grupo 0 h retornaron al área experimental luego de haber finalizado la sesión de entrenamiento, típicamente se dirigieron primero al micrositio donde se encontraba el alimentador, ya sea que hubieran sido entrenadas en presencia de lavanda o en ausencia de este olor. Cuando se evaluó la respuesta de atracción hacia el olor de lavanda, encontré que las avispas que habían sido entrenadas en presencia de lavanda sobrevolaron el micrositio aprendido y luego volaron en contra del viento hacia la fuente del olor. En los tres tratamientos (una, tres y cinco visitas) encontré una respuesta de atracción significativa hacia el olor (Fig. 5a). Esto se evidenció en el hecho de que el número de episodios de atracción (i.e., acercamientos + aterrizajes) hacia el papel filtro con lavanda fue considerablemente mayor que hacia el papel filtro no tratado, el cual fue prácticamente ignorado por las avispas (test de Wilcoxon pareado; una visita:  $V = 663$ ,  $N = 40$ ,  $P < 0,0001$ ; tres visitas:  $V = 528$ ,  $N = 32$ ,  $P < 0,0001$ ; cinco visitas:  $V = 406$ ,  $N = 28$ ,  $P < 0,0001$ ). Cuando se evaluó el rol del nivel de experiencia en la respuesta al olor, encontré que el número de episodios de atracción varió

considerablemente dependiendo del número de experiencias de recolección con la fuente con lavanda (test de Kruskal–Wallis:  $22 = 62,35$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 6a). En promedio, las avispas que habían recolectado alimento durante cinco visitas consecutivas efectuaron más episodios de atracción que aquellas avispas con tres visitas, y a su vez, las avispas con tres visitas mostraron una mayor respuesta de atracción que las avispas con una sola (Tabla 1). Sin embargo, las avispas que fueron entrenadas en ausencia de lavanda (grupo control) no mostraron una respuesta de atracción hacia el olor a lavanda solo (test de Wilcoxon pareado: una visita:  $V = 3$ ,  $N = 29$ ,  $P = 0,23$ ; tres visitas:  $V = 4$ ,  $N = 31$ ,  $P = 0,07$ ; cinco visitas:  $V = 3,5$ ,  $N = 31$ ,  $P = 0,13$ ).

**Tabla 1.** Resultados de comparaciones *pos hoc* entre diferentes niveles de experiencia (una, tres y cinco visitas de recolección) en los grupos (Dunn test,  $\alpha=0,05$ ). La variable respuesta fue el número de número de episodios de atracción (i.e., acercamientos + aterrizajes) hechos hacia el papel de filtro impregnado con aceite esencial de lavanda

Comparación	Z	Valor p
una visita-tres visitas	4,55	<
una visita-cinco visitas	7,79	<
tres visitas-cinco visitas	3,28	0,003

En el grupo de 24 h, sólo una proporción de las avispas que habían finalizado la sesión de entrenamiento retornaron al área experimental luego de 24 h. En el tratamiento con lavanda, esta tasa de retorno varió dependiendo de su nivel de experiencia (test exacto de Fisher:  $P = 0,0002$ ). Las avispas entrenadas con tres y cinco visitas de recolección retornaron con mayor frecuencia que las avispas con una sola visita (Tabla 2) (test exacto de Fisher: una-tres visitas:  $P = 0,0003$ ; una-cinco visitas:  $P = 0,0006$ ; tres-cinco visitas:  $P = 1$ ;  $\alpha' = 0,016$  por comparación). Debido a la baja tasa de retorno observada en avispas con una sola visita ( $N = 3$ ), estas avispas fueron excluidas de los análisis posteriores. De manera similar a lo encontrado en avispas del grupo 0 h, las avispas del grupo 24 h que habían sido entrenadas

con tres y cinco visitas de recolección mostraron una respuesta de atracción significativa hacia el olor de lavanda solo (Fig. 6b). Estas avispas efectuaron considerablemente mayor número de episodios de atracción hacia el papel filtro impregnado con lavanda que hacia el papel filtro no tratado (test de Wilcoxon pareado: tres visitas:  $V = 66$ ,  $N = 17$ ,  $P = 0,004$ ; cinco visitas:  $V = 91$ ,  $N = 16$ ,  $P = 0,002$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el nivel de atracción hacia el olor solo entre las avispas con tres y con cinco visitas (Test de Mann–Whitney:  $U = 129,5$ ,  $N1 = 17$ ,  $N2 = 16$ ,  $P = 0,15$ ). En cuanto a las avispas entrenadas en ausencia de lavanda, no se observaron diferencias significativas en la tasa de retorno entre los diferentes niveles de experiencia (Tabla 2) (test exacto de Fisher:  $P = 0,51$ ). Debido a la baja frecuencia de retorno observada en avispas del grupo control luego de 24 h, los datos correspondientes a los grupos con tres y cinco visitas fueron sumados y luego se comparó el número de episodios de atracción entre ambos papeles filtro. De manera similar a lo observado en el grupo de 0 h, las avispas que habían sido entrenadas en ausencia de lavanda no fueron atraídas por la lavanda ya que el número de episodios de atracción no difirió entre ambos papeles filtro (test de Wilcoxon pareado:  $V = 0$ ,  $N = 9$ ,  $P = 0,34$ ).

**Tabla 2.** Tasa de retorno de las avispas al área de entrenamiento luego de 24(±1) h de finalizada la fase de entrenamiento, de acuerdo al tipo de fuente de alimento con la que fueron entrenadas: fuente con lavanda o fuente sin lavanda (control). La tasa de retorno está expresada en porcentaje de avispas que retornaron/total de avispas entrenadas. Letras diferentes indican diferencias significativas en la tasa de retorno entre niveles de experiencia ( $\alpha' = 0,016$ ).

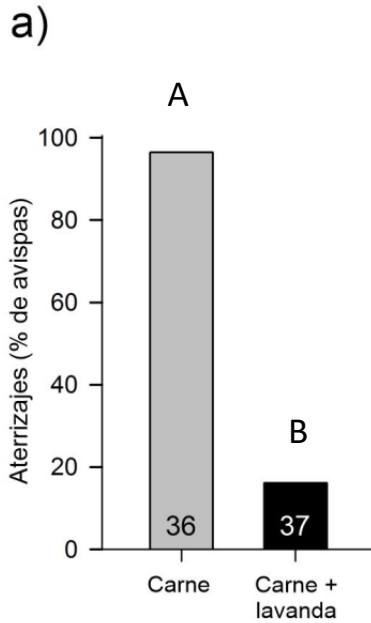
Nivel de experiencia	Tasa de retorno a 24 h	
	Fuente con lavanda	Fuente control
una visita	10% (n=30) <b>a</b>	6,6% (n=30) <b>a</b>
tres visitas	53,12% (n=32) <b>b</b>	16,6% (n=30) <b>a</b>
cinco visitas	55,1% (n=29) <b>b</b>	14,3% (n=28) <b>a</b>

#### 3.4. Experimento 4: Influencia de la experiencia en las decisiones de consumo

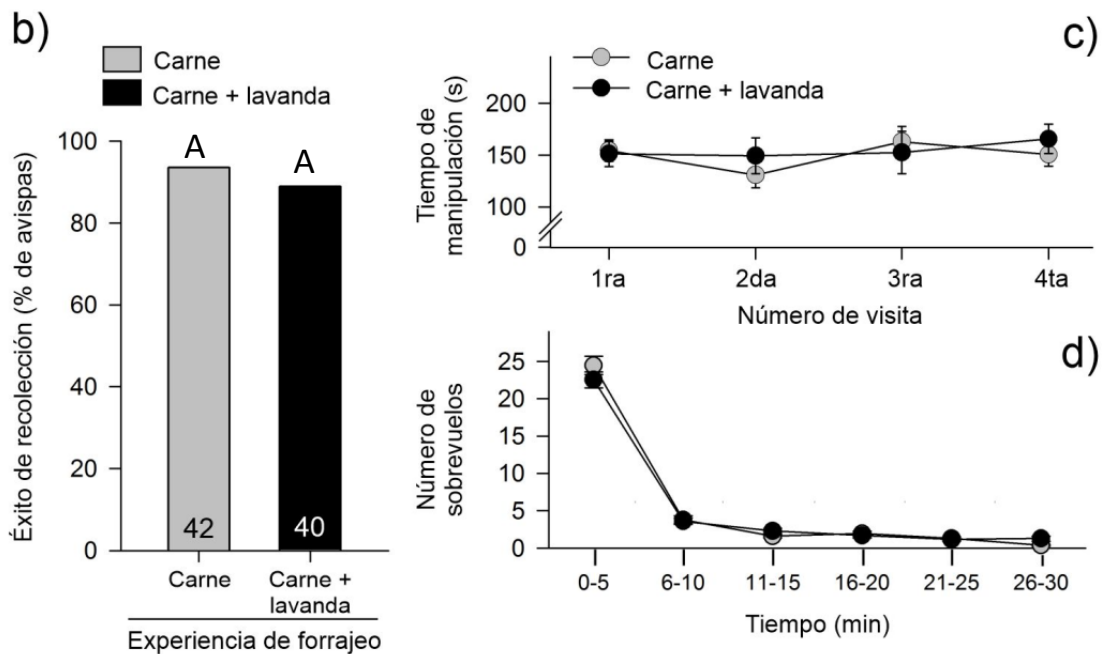
En el primer experimento de elección, encontré que todas las avispas sin experiencia prefirieron la fuente de carne vacuna por encima de la solución de sacarosa (test binomial exacto:  $N = 40$ ,  $P < 0,0001$ ), corroborando que la sacarosa fue un recurso menos atractivo que la carne bajo las condiciones experimentales de este estudio. Al evaluar la respuesta de consumo (i.e., si la avispa consumió o no sacarosa) en avispas que previamente habían recolectado carne de una fuente no tratada con lavanda, encontré que el 25,7% de las avispas consumieron de la solución azucarada y todas ellas lo hicieron del alimentador no tratado (test binomial exacto:  $N = 35$ ,  $P < 0,0001$ ). Sin embargo, cuando las avispas habían sido entrenadas con carne en presencia de lavanda, el porcentaje de avispas que consumieron solución azucarada fue considerablemente mayor (81,9%) (test exacto de Fisher:  $P < 0,0001$ ), y todas ellas eligieron la fuente con lavanda (test binomial exacto:  $N = 33$ ,  $P < 0,0001$ ; Fig. 7).

## Escenario de no-elección

### Avispas sin experiencia



### Avispas con experiencia



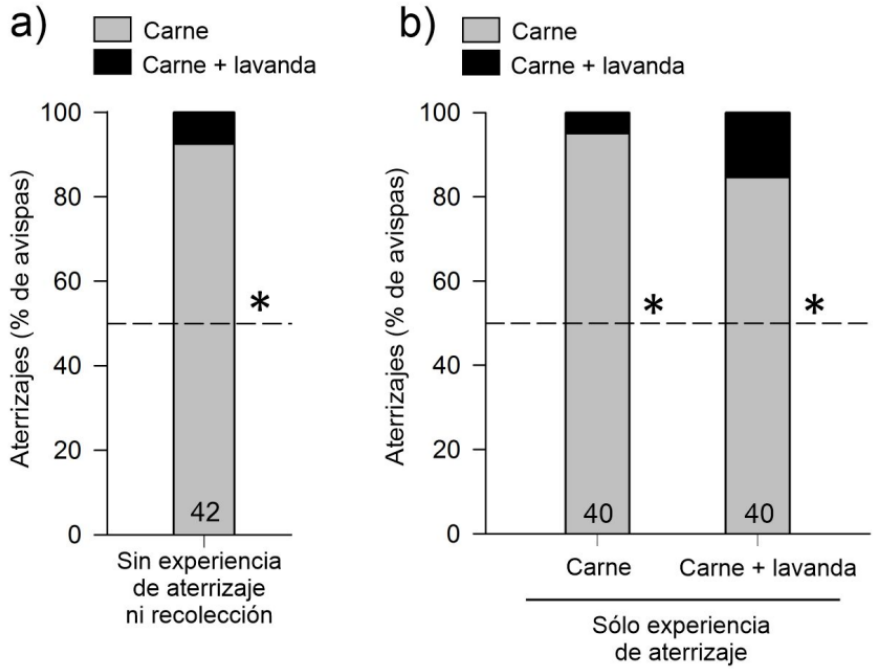
**Figura 3.** Respuesta hacia una fuente de alimento con lavanda bajo un escenario de no-elección (i.e., una única fuente de alimento disponible) en avispas sin y con experiencia previa de forrajeo. a) Porcentaje de avispas sin experiencia que aterrizaron en una fuente de alimento con o sin lavanda

(i.e., respuesta de aterrizaje). b) Porcentaje de avispas que recolectaron carne durante las cuatro visitas consecutivas a una fuente de alimento con o sin lavanda (i.e., éxito de recolección). c) Tiempo de manipulación (media  $\pm$  error estándar) de una fuente de alimento con o sin lavanda durante cada una de las visitas. d) Número de sobrevuelos (media  $\pm$  error estándar) realizados sobre el plato vacío luego de la remoción del alimento, registrados durante un periodo de 30 min desde el retorno de la avispa al área experimental. Los números dentro de cada barra indican el número total de avispas evaluadas en cada tratamiento. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).



Escenario de elección

Avispas sin experiencia



Avispas con experiencia

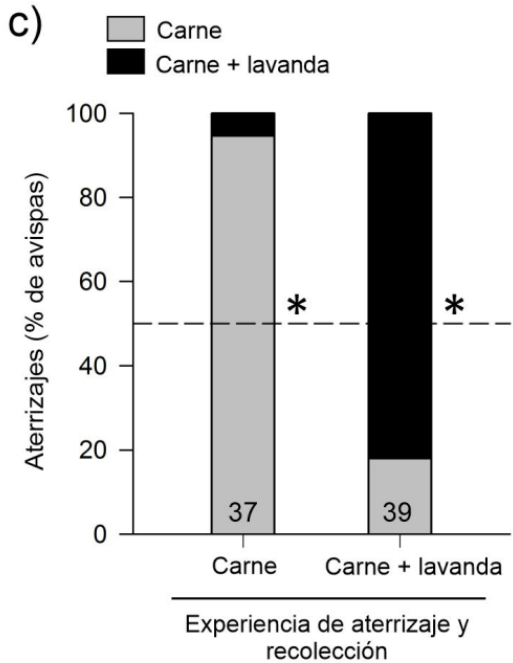
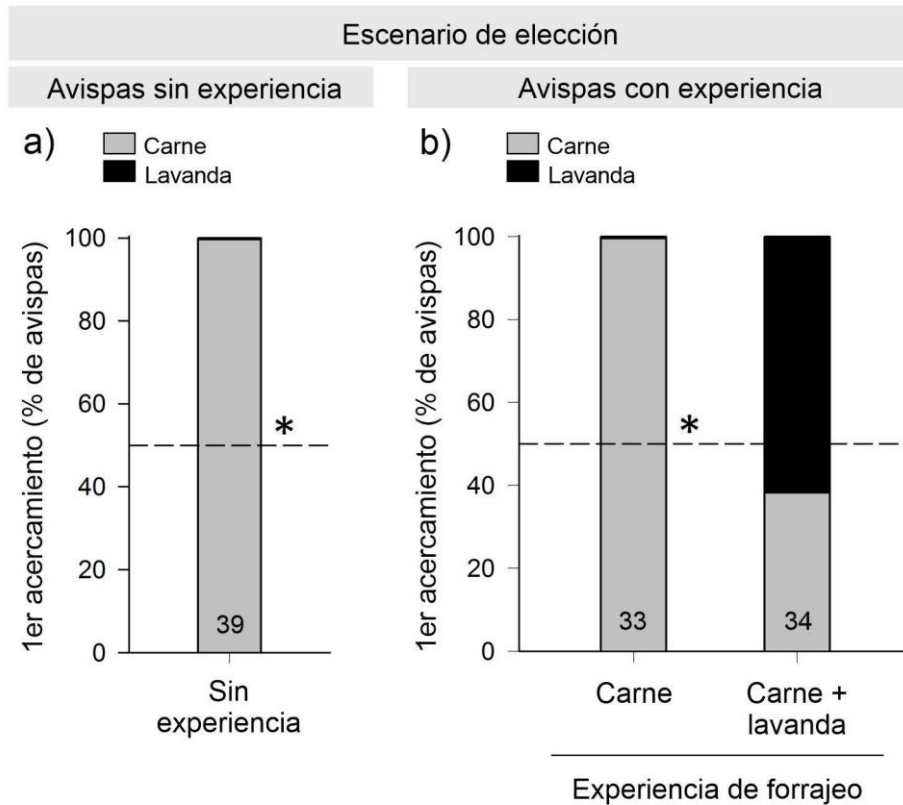
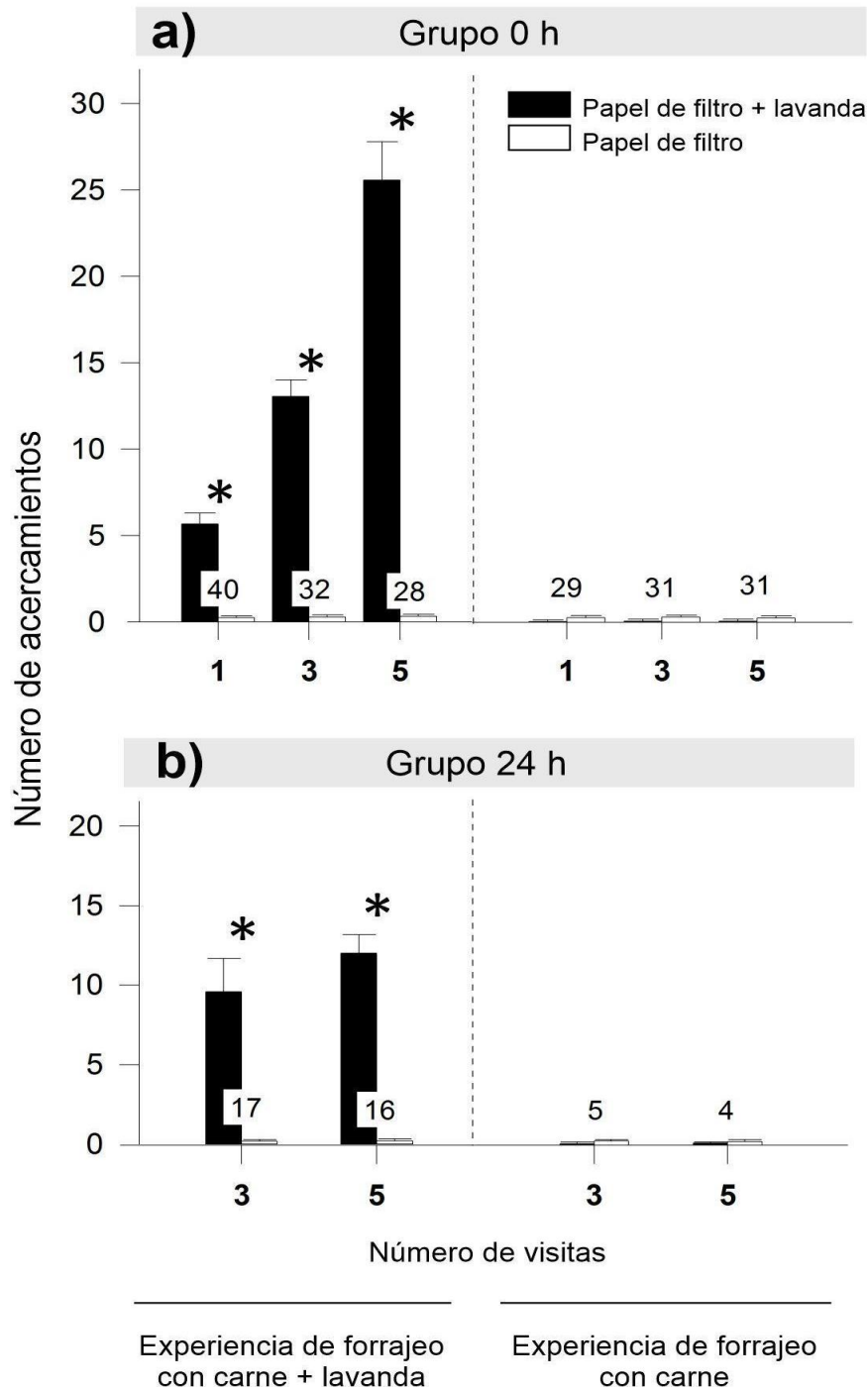


Figura 4. Respuesta hacia una fuente de alimento + lavanda bajo un escenario de elección (i.e., dos fuentes de alimento disponibles simultáneamente: carne + lavanda vs carne) en (a) preferencia de

avispas sin ningún tipo de experiencia con la fuente de alimento; (b) preferencia de avispas que previamente aterrizaron en una fuente de alimento con o sin lavanda (c) avispas que tuvieron experiencia previa de recolección (3 visitas) con una fuente de alimento con o sin lavanda. Los números dentro de cada barra indican el número total de avispas evaluadas en cada tratamiento. Los asteriscos indican una preferencia estadísticamente significativa por una de las fuentes ( $p < 0,05$ ).

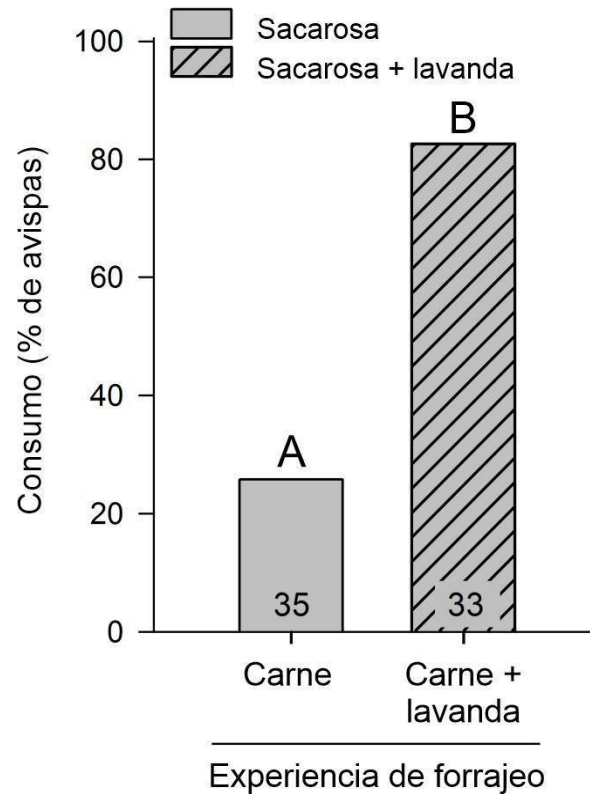


**Figura 5.** Respuesta hacia el olor de lavanda solo, bajo un escenario de elección (i.e., carne sola vs lavanda sola) en (a) avispas sin experiencia previa y (b) avispas que tuvieron experiencia previa de recolección (3 visitas) con una fuente de alimento con o sin lavanda. Los asteriscos indican una preferencia estadísticamente significativa por una de las fuentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** Respuesta de atracción (i.e., número de acercamientos + aterrizajes) hacia un papel de filtro tratado con aceite esencial de lavanda versus un papel filtro no tratado, en avispas con diferente nivel de experiencia (i.e., una, tres y cinco visitas de recolección) con una fuente de alimento tratada con lavanda (izquierda) o no tratada (derecha). a) Respuesta de atracción evaluada inmediatamente después de finalizada la fase de entrenamiento (i.e., grupo 0 h). b) Respuesta de atracción evaluada 24±1 h luego de finalizada la fase de entrenamiento (i.e., grupo 24 h). Los datos correspondientes al tratamiento con una visita del grupo 24 h fueron excluidos del análisis debido a la baja frecuencia de avispas que retornaron al área experimental luego de 24 h. Los números dentro de cada barra indican

el número total de avispas evaluadas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en el número de episodios de atracción entre ambos papeles filtro ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Porcentaje de avispas que consumieron solución de sacarosa, ya sea de una fuente con olor de lavanda o sin este olor, luego de haber tenido experiencia de recolección (3 visitas) con una fuente de carne vacuna pareada al olor de lavanda. Los números dentro de cada barra indican el número de avispas evaluadas. Diferentes letras indican diferencias significativas en la respuesta de consumo entre ambas fuentes de sacarosa ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discusión

Los resultados de este estudio revelan que la respuesta comportamental de las avispas de *V. germanica* hacia claves olfativas puede ser radicalmente modulada por la experiencia apetitiva. Encontré que la experiencia de forrajeo con un olor aversivo pareado a una fuente de proteína de alta calidad condujo al establecimiento de una asociación entre el olor y la

recompensa alimenticia, generando que el olor aversivo se volviera atractivo. Esto demuestra que estas avispas pueden aprender a reclasificar claves olfativas al ser asociadas con fuentes de proteínas. Además, la capacidad de las forrajeras para evocar la memoria de la asociación luego de 24 h brinda por primera vez evidencia experimental de memoria olfativa de largo plazo en avispas del género *Vespula*. Otro resultado relevante que se desprende de este estudio es la habilidad de las forrajeras de *V. germanica* para establecer asociaciones entre claves olfativas y el alimento usando proteínas como recompensa alimenticia, ya que hasta el momento los estudios sobre el aprendizaje asociativo en véspidos han sido en relación a fuentes de alimento ricas en hidratos de carbono (Elmqvist y Landolt 2018; El-Sayed et al. 2018; Gong et al. 2019). Estos hallazgos representan un aporte significativo al conocimiento sobre la plasticidad comportamental en relación a claves olfativas en avispas sociales.

Los resultados obtenidos bajo los diferentes escenarios experimentales revelan que la experiencia apetitiva con el olor aversivo puede conducir a cambios significativos en las decisiones de forrajeo en general. Las avispas sin experiencia no fueron atraídas por el olor de lavanda y la mayoría de ellas evitaron la fuente de alimento con este olor cuando se les ofreció una fuente no tratada como alternativa y también cuando la fuente con lavanda fue la única opción. Sin embargo, luego de haber tenido experiencia de forrajeo con el alimento en presencia de lavanda, el olor no generó efectos negativos en el desempeño de forrajeo evaluado en términos de tiempo de manipulación, éxito de recolección y respuesta de búsqueda. De hecho, cuando tuvieron opción, las avispas entrenadas en presencia de lavanda prefirieron las fuentes de alimentos con el olor y exhibieron una fuerte respuesta de atracción hacia el olor en ausencia de recompensa. Además, la experiencia apetitiva con el olor también promovió la tasa de consumo de sacarosa, un recurso menos atractivo, cuando estuvo pareado al olor aprendido. Si bien en otras especies de véspidos, como *Polistes dominula*, se ha reportado que el nivel de atracción de ciertos olores puede incrementarse como resultado de procesos asociativos (Elmqvist y Landolt 2018), en este estudio observé que la experiencia de forrajeo con el olor a lavanda condujo a un patrón comportamental totalmente opuesto al

observado en avispas sin experiencia. Esto demuestra que simples eventos apetitivos pueden moldear la explotación de recursos en *V. germanica*, cómo se ha enfatizado en estudios previos (Lozada y D'Adamo 2014; Moreyra y Lozada 2018).

En esta investigación analicé como el aprendizaje asociativo puede modular la respuesta a estímulos relevantes del ambiente y su impacto en las decisiones de forrajeo en el ambiente natural. La mayoría de los estudios en aprendizaje apetitivo en insectos son llevados a cabo en condiciones de laboratorio (Bitterman et al. 1983; Dukas 2008; Giurfa 2015; Vinauger et al. 2016). En este trabajo me enfoqué en el comportamiento de avispas libres en su contexto natural de forrajeo, por lo que los individuos fueron capaces de percibir, reaccionar y tomar decisiones libremente sin ser manipulados o inducidos artificialmente. El repertorio comportamental exhibido por avispas entrenadas en presencia de lavanda hacia este olor es consistente e indica que el cambio en la valencia del olor ocurrió como resultado de aprendizaje asociativo, ya que el olor solo fue capaz de desencadenar las mismas respuestas apetitivas y niveles de atracción que la recompensa misma, i.e., acercamientos, aterrizajes y comportamiento de búsqueda (Shettleworth 2010; Griffin et al. 2016). Hallazgos similares fueron reportados en otros insectos como mosquitos, vinchucas, polillas y avispas parasitoides, en los que el significado comportamental de ciertas claves o señales (e.g., feromonas de agregación y sexuales) cambió luego de condicionamiento apetitivo o aversivo (Hartlieb et al. 1999; Benelli et al. 2014; Vinauger et al. 2014; Mengoni et al. 2017). Estos hallazgos amplían nuestro conocimiento sobre la plasticidad comportamental de vespídeos y sugieren que el aprendizaje asociativo es distribuido entre los taxa de insectos.

Cuando se examinó la respuesta al olor de lavanda solo en avispas que habían tenido experiencia de recolección en presencia de dicho estímulo, se observó que una sola visita de recolección fue suficiente para provocar el cambio en la valencia del olor. Esto es similar a lo observado previamente en avispas de *V. germanica* en relación al aprendizaje de claves visuales/espaciales asociadas a la ubicación del recurso. Estos estudios han mostrado que las avispas son capaces de retornar al micrositio aprendido con gran precisión luego de la primera

visita de recolección. Un rápido aprendizaje tiene sentido si se tiene en cuenta que durante la primera visita las forrajeras deben aprender las claves contextuales (e.g., estímulos olfativos, visuales, patrones) que garanticen su retorno a la fuente. Los resultados obtenidos aquí resaltan la fuerza de una simple experiencia apetitiva en los procesos de aprendizaje de avispas de *Vespula germanica* (e.g., Lozada y D'Adamo 2006, 2011; D'Adamo y Lozada 2011). También se ha propuesto que la primera experiencia de la avispa con la fuente de alimento tiene una mayor saliencia en los procesos de aprendizaje de claves contextuales que las subsiguientes pudiendo interferir con el aprendizaje de claves contextuales nuevas (Moreyra et al. 2020). En el presente estudio se evaluó el aprendizaje asociativo de un olor aversivo que estuvo presente desde el primer encuentro, por lo que sería interesante analizar en estudios futuros si tal cambio en la valencia puede ocurrir si el olor es incorporado luego de la primera visita.

Los resultados también indican que la fuerza de la asociación, evaluada en términos de la respuesta condicionada al olor en ausencia la recompensa depende del número de eventos apetitivos en presencia del olor. Si bien el cambio en la respuesta al olor se observó luego de la primera visita de forrajeo, un mayor número de visitas en presencia del olor (3 y 5 visitas de recolección) aumentaron la respuesta de atracción y condujeron a memorias olfativas más robustas que persistieron al menos por 24 horas. Estos resultados brindan evidencia experimental que apoya los hallazgos de El-Sayed y colaboradores (2018), quienes sugirieron que memorias olfativas de largo plazo podrían estar involucradas en la atracción de ciertos olores derivados de exudados de áfidos, observada en poblaciones naturales de avispas sociales en Nueva Zelanda. También se ha demostrado memoria de largo plazo en *V. germanica* en relación a claves espaciales, al encontrar que las forrajeras recuerdan el micrositio aprendido por al menos 24 horas (Moreyra et al. 2017). Sin embargo, cabe destacar que en este trabajo se necesitaron ocho visitas de forrajeo para promover una memoria de largo plazo del sitio de alimentación, mientras que aquí observé memoria de largo plazo del olor con tres visitas. Curiosamente, al analizar la tasa de retorno al área

experimental luego de 24 h, encontré que la tasa de retorno de las avispas cuando sólo estuvo presente el olor aprendido (i.e., en ausencia de alimento) fue similar a la observada en el trabajo de Moreyra y colaboradores (2017) cuando al otro día colocaron dos fuentes de alimento. En el primer caso, la tasa de retorno fue del 10%, 53.1% y 55,1% para una, tres y cinco visitas, respectivamente, mientras que en el segundo caso fue de 22%, 51% y 41% para dos, cuatro y ocho visitas, respectivamente. Este hallazgo, junto con los resultados obtenidos al evaluar la respuesta de atracción al olor versus la carne sola, sugiere que el olor aprendido se volvió tan atractivo como la recompensa misma y destaca la fuerza del olor aprendido como predictor de presencia de la recompensa.

El análisis de la tasa de retorno luego de 24 h al área experimental, en la cual también se encontraba el olor de lavanda, sugiere que las avispas confían en memorias olfativas durante la búsqueda de alimento. Al comparar la tasa de retorno entre avispas entrenadas en ausencia de lavanda y aquéllas entrenadas en presencia de este olor, encontré que la frecuencia de retorno en el segundo grupo fue de aproximadamente tres veces mayor que la observada en el primero (ver sub-sección 4.3 de Resultados). El hecho de que en ambos tratamientos las avispas recibieron el mismo nivel de entrenamiento en el sitio de forrajeo, sugiere que estas diferencias son causadas por el tipo de entrenamiento (i.e., en presencia o en ausencia del olor) y que la memoria del olor sería la que estaría favoreciendo el retorno de las avispas. Una pregunta interesante que surge en este punto es si el olor aprendido puede favorecer la evocación del lugar aprendido, ya que el olor y el lugar fueron asociados conjuntamente con la recompensa. En estudios en hormigas se ha encontrado que la presencia de un olor aprendido difuso puede contribuir a la recuperación de la memoria de una ruta específica asociada a dicho olor (Czaczkes et al. 2014). Futuros estudios podrían evaluar también el rol de más memorias olfativas en la recuperación de memorias visuales o espaciales.

Además de modificar las preferencias alimenticias, los resultados obtenidos en este estudio también sugieren que la memoria olfativa que resultó de la asociación entre una



fuelle de proteínas y el olor de lavanda puede ser generalizada a otros recursos, como los carbohidratos. Observé que la memoria olfativa motivó el consumo de una solución de sacarosa, un recurso diferente y menos apetitivo que la carne vacuna, al menos durante el momento en el que se llevó a cabo el experimento. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que las memorias olfativas podrían tener un rol importante en la explotación del alimento por parte de avispas sociales. No obstante, para tener una noción más completa sobre el rol de las claves olfativas (ya sea aprendidas o no) durante el forrajeo sería interesante examinar la importancia de los olores en relación a las memorias espaciales, un sistema de orientación clave durante el la explotación de fuentes abundantes como la carroña y que ha sido propuesto como un mecanismo primario durante la relocalización de la fuente de alimento (e.g., Lozada y D'Adamo 2014).

Estos hallazgos demuestran que *V. germanica* constituye un modelo interesante para el estudio de la plasticidad comportamental en contextos apetitivos. El hecho de que un estímulo olfativo que inicialmente desencadenaba una respuesta aversiva pueda volverse atractivo por medio de la experiencia apetitiva demuestra que estas avispas pueden aprender a lidiar con situaciones de forrajeo conflictivas, lo que refleja su gran plasticidad comportamental. Este aspecto es particularmente relevante para las forrajeras de *Vespula germanica*, quiénes se benefician de su habilidad para modificar rápidamente su comportamiento en respuesta a cambios repentinos en los escenarios de forrajeo, una característica que podría ser clave en el éxito de procesos de invasión (Griffin et al. 2016; Lozada y D'Adamo 2014). En conclusión, estos resultados muestran que las respuestas espontáneas a olores pueden ser moduladas por la experiencia en *V. germanica*. Este estudio apoya la noción de que el comportamiento resulta de la imbricación entre el organismo y su ambiente y que el significado emerge de la experiencia y no de información fija proveniente del exterior (Varela 2000; Palacios y Bozinovic 2003).

# Capítulo 4

## Rol de la experiencia en la respuesta a olores: Importancia del aprendizaje espacial en el uso de claves olfativas <sup>6</sup>

---

### Resumen

La búsqueda de alimento en insectos sociales es guiada por diversas claves sensoriales cuya importancia relativa puede depender del contexto de forrajeo. En avispas sociales, las claves olfativas son cruciales en el hallazgo de nuevos recursos, sin embargo, su rol durante la relocalización del alimento, ha sido poco explorado. En este capítulo me propuse evaluar si el uso de claves olfativas durante el forrajeo de carroña puede variar dependiendo de si la avispa está localizando o relocalizando una fuente de alimento. Mediante experimentos de elección, examiné cómo un olor puede guiar a las avispas hacia el alimento bajo tres escenarios: hallazgo del alimento, relocalización de una fuente situada en el lugar aprendido y relocalización de una fuente que ha sido desplazada del lugar aprendido. Considerando que la importancia relativa de las claves puede variar según el tipo de clave, evalué olores con diferente significado comportamental: olor aversivo, olor aprendido y olor de avispas conespecíficas. Todos los olores guiaron la búsqueda del alimento durante el hallazgo y durante la relocalización de una fuente que fue desplazada, sin embargo, fueron irrelevantes cuando la fuente permaneció en su lugar original. Estos hallazgos sugieren una jerarquía en el uso de claves, en la que las claves visuales del terreno parecen más confiables para relocalizar una fuente de carroña, mientras que el olfato podría ser útil para encontrar nuevos recursos o relocalizar una fuente cuando las memorias espaciales fallan. Esto demuestra que el uso de claves olfativas podría ser contexto-dependiente y que el aprendizaje espacial puede modular la respuesta a olores.

---

<sup>6</sup> Yossen, M. B., Buteler, M., & Lozada, M. (2021). Context-dependent use of olfactory cues by foragers of *Vespula germanica* social wasps. *Animal cognition*, 1-11.

**PALABRAS CLAVE:** memorias olfativas, contexto-dependencia, aprendizaje asociativo, claves sociales, comportamiento de forrajeo, carroña

## 1. Introducción

Para los insectos sociales, el éxito en el forrajeo depende de su habilidad para localizar fuentes de alimento en un ambiente que es típicamente cambiante e impredecible. No solo deben ser capaces de localizar nuevas fuentes de alimento sino también de retornar a aquellas fuentes exitosas. Ya sea para localizar o relocalizar recursos, las forrajeras son guiadas por diferentes claves ambientales. Estas claves pueden abarcar diferentes modalidades sensoriales (e.g., olfativas y visuales), pueden a su vez ser aprendidas o tener un origen social (Grüter y Leadbeater 2014; Knaden y Graham 2016; Buehlmann et al. 2020a). La evidencia sugiere que las estrategias de uso de claves en insectos sociales son dependientes del contexto y que la importancia relativa de cada tipo de clave puede diferir de acuerdo a requerimientos específicos de las forrajeras (e.g., Hendrichs 1994; D'Adamo y Lozada 2003; Fukushi y Wehner 2004; Moreyra et al. 2007).

En avispas eusociales, el olfato desempeña un rol central en la búsqueda de alimento (Edwards 1980; Raveret Richter 2000; Jeanne y Taylor 2009). Además del olor propio del alimento, otras claves no-alimenticias también pueden influenciar las decisiones de forrajeo, por ejemplo, ayudando a discriminar recursos convenientes de aquéllos potencialmente perjudiciales (Wright et al. 2010). Por un lado, ciertas claves sociales pueden facilitar el descubrimiento de fuentes de alimento potenciales. Por ejemplo, las forrajeras de *V. germanica* tienden a ser atraídas por recursos en presencia de conespecíficas (incremento local) (D'Adamo et al. 2000, 2001, 2003), y una feromona estaría posiblemente involucrada en esta respuesta (Buteler et al. 2019). Por otro lado, compuestos volátiles involucrados en los

mecanismos de defensa de las plantas también pueden tener un rol relevante en el forrajeo de avispas sociales al desencadenar respuestas de evitación (Maia y Moore 2011). Por ejemplo, ciertos terpenos pueden provocar fuertes respuestas aversivas tanto en avispas sin experiencia como en experimentadas, disuadiendo acercamientos y aterrizajes sobre fuentes basadas en proteínas o carbohidratos (Zhang et al. 2013; Buteler et al. 2016, capítulo 2). Estudios previos en *V. germanica* han demostrado que la presencia del olor conoespecífico o de un olor repelente en las inmediaciones de una fuente de alimento pueden modificar fuertemente las preferencias de las avispas (D'Adamo et al. 2001; Buteler et al. 2016).

La búsqueda de alimento en las avispas eusociales también es guiada por claves olfativas aprendidas. Las avispas sociales son conocidas por exhibir una notable plasticidad comportamental y habilidades en el aprendizaje olfativo (Raveret Richter 2000; Lozada y D'Adamo 2014). Varios estudios han demostrado que las forrajeras de véspidos pueden establecer asociaciones apetitivas de olores con carbohidratos (Jander 1998; El-Sayed et al. 2018). Los avispones, *Vespa velutina*, incluso tienen la habilidad de formar memorias olfativas de largo plazo asociadas a recompensas azucaradas (Gong et al. 2019). En el capítulo 3 se mostró por primera vez que las forrajeras de *V. germanica* pueden también aprender establecer asociaciones apetitivas con proteínas como recompensa. Además, estas asociaciones pueden producirse luego de una simple visita de recolección y que tres experiencias de recolección son suficientes para promover memorias olfativas que persisten al menos por 24 h. Los resultados obtenidos en el capítulo 3 también sugieren que los olores aprendidos no solamente guían la búsqueda del alimento, sino que también pueden incrementar la aceptación de recursos menos apetitivos.

Si bien la importancia de los estímulos olfativos en el hallazgo de una nueva fuente de alimento ha sido relativamente bien documentada (Raveret Richter 2000), su rol en guiar a las forrajeras durante la relocalización de una fuente conocida aún no ha sido evaluado en profundidad. La relocalización de recursos es crucial en especies carroñeras, como *Vespula germanica*. Cuando una fuente de carroña es descubierta, las forrajeras retornan

repetidamente al sitio específico donde el alimento fue recolectado (Lozada y D'Adamo 2014). Mientras abandonan la fuente de alimento por primera vez, las avispas realizan una serie de vuelos especializados a través de los cuales adquieren de manera activa información visual relacionada a la ubicación del alimento (Lozada y D'Adamo 2014). Estudios en *V. germanica* han mostrado que las forrajeras son capaces de identificar con gran precisión el lugar donde se recolectó el alimento (D'Adamo y Lozada 2011, 2014; Lozada y D'Adamo 2014; Wilson-Rankin 2015) incluso luego de 24 horas (Moreyra et al. 2017). Las avispas confían fuertemente en esta memoria espacial para tomar decisiones sobre qué fuentes de alimento explotar, ya que se ha demostrado que tienden a preferir aquellos recursos situados en el micrositio aprendido, a menudo independientemente de las características de la fuente como, por ejemplo, cantidad de alimento ofrecido (Moreyra y Lozada 2019).

La mayor parte de las investigaciones se han enfocado en el rol de olores y de las marcas visuales del terreno por separado, no obstante, algunos estudios han explorado la interacción entre ambas modalidades (Lozada y D'Adamo 2006; Lozada y D'Adamo 2011; Buteler et al. 2016). En un estudio previo se encontró que la fuerza de la respuesta aversiva a un olor repelente decreció luego de una experiencia apetitiva en el sitio de forrajeo, sugiriendo que el aprendizaje puede modular la respuesta al olor (Buteler et al. 2016). Estudios en aprendizaje espacial en *V. germanica* demostraron que las forrajeras frecuentemente retornan al micrositio aprendido, aunque el alimento haya sido desplazado o completamente removido, sugiriendo que el olor podría jugar un rol secundario en la relocalización del alimento (Lozada y D'Adamo 2006; Lozada y D'Adamo 2011). Sin embargo, vale la pena notar que la única clave olfativa evaluada en esos estudios fue el olor emanado por el propio alimento, por lo que otras claves no-alimenticias aún no han sido examinadas en profundidad. Estudios en hormigas han demostrado la importancia de las claves olfativas en relación a la memoria espacial depende del tipo de estímulo olfativo involucrado (por ejemplo, olores aprendidos o feromonas) (Grüter et al. 2011; Czaczkes et al. 2013; Oberhauser et al. 2019). Por lo tanto, examinar el rol de los olores en diferentes

contextos podría contribuir al entendimiento del olfato como mecanismo de orientación en véspidos eusociales.

En este capítulo me propuse profundizar el conocimiento sobre el rol de las claves olfativas durante el forrajeo de *V. germanica*, al evaluar si el uso de olores durante la búsqueda de alimento puede diferir dependiendo del tipo de actividad, i.e., si la avispa está localizando o relocalizando una fuente de alimento. Por medio de experimentos de elección a campo, examiné el rol de un olor en guiar a las avispas hacia el alimento bajo tres escenarios: 1) hallazgo del alimento por avispas sin experiencia, 2) relocalización de una fuente de alimento situada en el lugar aprendido y 3) relocalización de una fuente de alimento que ha sido desplazada del lugar aprendido. Considerando que la importancia relativa de las claves puede variar según el tipo de clave, evalué tres tipos de olor con diferente significado comportamental: un olor aversivo, un olor aprendido y el olor de avispas conespecíficas.

## **2. Metodología**

### **2.1. Olores**

Los estímulos olfativos evaluados fueron seleccionados en base a estudios previos en los que se demostró que estos olores pueden influenciar significativamente las preferencias de alimentos en *Vespula germanica* (D'Adamo et al. 2000; capítulo 3). El aceite esencial de lavanda fue usado como una clave olfativa aversiva (grupo olor aversivo) ya que se ha mostrado que la presencia de este olor alrededor de una fuente de alimento desencadena respuestas de evitación en avispas que no han sido expuestas previamente a dicho estímulo (Zhang et al. 2013; Capítulo 3). Por otro lado, también se usó el aceite esencial de lavanda como una clave olfativa aprendida (grupo olor aprendido) ya que en el capítulo anterior se encontró que este olor puede volverse atractivo luego de mediar un aprendizaje asociativo. El

aceite esencial de lavanda comercial fue obtenido de Swiss-Just (manufacturado bajo la supervisión y control de Ulrich Justrich AG, Walzenhausen, Switzerland).

El olor de avispas conespecíficas fue usado como una clave social atractiva (grupo olor conespecífico). Varios estudios han demostrado que extractos etanólicos obtenidos a partir de cabezas de forrajeras desencadenan una respuesta de atracción y potencian la atractividad de un recurso (D'Adamo et al. 2000, 2001, 2003, 2004). Los extractos de cabeza fueron obtenidos de acuerdo al protocolo establecido por D'Adamo y colaboradores (2004). Un total de 800 avispas de *Vespula germanica* fueron capturadas con la ayuda de un aspirador manual para insectos mientras recolectaban carne de un alimentador. Las avispas capturadas fueron inmediatamente transportadas al laboratorio y almacenadas a -20°C hasta la extracción. Las cabezas fueron separadas por medio de un cuchillo y trituradas mecánicamente en un mortero junto con 16 ml de etanol al 96%. El macerado fue pipeteado en un tubo Eppendorf y centrifugado durante 10 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante fue posteriormente transferido a un contenedor de vidrio de 20 ml y llevado nuevamente a un volumen de 16 ml. Los extractos fueron almacenados en freezer a -6°C hasta su uso.

## 2.2. Procedimiento general de los experimentos a campo

Durante los experimentos se trabajó con avispas provenientes de colonias silvestres, durante el periodo de mayor actividad de las colonias (febrero-abril de 2018 y 2021) en San Carlos de Bariloche (41°S, 71°O), Argentina. El área de trabajo fue la costa de los lagos Gutiérrez, Moreno y Nahuel Huapi, dónde es posible encontrar las avispas en busca de alimento y agua. En comparación a áreas con vegetación, las costas de lagos ofrecen hábitats más homogéneos y abiertos que podrían favorecer la formación y dispersión de la pluma de olor. Por tal motivo, consideramos que estas áreas constituyen un escenario favorable para el trabajo con estímulos olfativos bajo condiciones de campo. Los experimentos fueron llevados a cabo

entre las 10 y las 17 horas, en días soleados y bajo condiciones de viento moderado (4-7 km/h a nivel del suelo) con el fin de favorecer la dispersión del olor. La velocidad del viento fue medida por medio de un anemómetro digital (Mastech MS6252A, rango de medición: 1.4 ~ 108.0 ± 3% km/h).

Los experimentos consistieron en la observación de avispas que espontáneamente se acercaron a un alimentador situado a nivel del suelo. El alimentador fue idéntico al empleado en el capítulo 3 (ver página 63), el cual consistió de un contenedor cilíndrico plástico (2,5 cm de diámetro x 1 cm de alto) con 10 g de carne vacuna picada, que a su vez estuvo apoyado sobre un plato plástico blanco de mayor diámetro (de 9 cm de diámetro x 0,5 cm de alto) . En los grupos olor aversivo y olor aprendido, el alimentador tratado con olor consistió de un alimentador idéntico al detallado previamente pero que además contenía 100 µl de aceite esencial de lavanda puro. Este volumen de aceite esencial es el mismo que se utilizó bajo condiciones experimentales similares en los capítulos 2 y 3. El aceite esencial de lavanda fue aplicado en un papel filtro (7 cm de diámetro, Whatman N° 1) colocado entre el contenedor con carne y el plato blanco. De esta manera, las avispas fueron expuestas a los volátiles del olor sin entrar en contacto directo con el aceite esencial. En el caso del grupo olor conoespecífico, el alimentador tratado contenía 100 µl de extracto (equivalente a 5 avispas) aplicados en una pequeña pieza de papel filtro (1 cm x 1,5 cm) apoyada sobre la carne. De esta manera la pluma de olor fue emanada desde la fuente de alimento de una manera similar a lo que ocurriría naturalmente cuando las avispas están posadas sobre el alimento. El plato, el contenedor y la carne fueron completamente reemplazados entre réplicas de cada experimento. Una vez que el experimento se inició, los elementos plásticos y la carne fueron reemplazados cada 15 minutos. En aquellos experimentos que involucraron una fase de entrenamiento y una fase de prueba (ver secciones siguientes), el plato, el contenedor y la carne fueron reemplazados también antes del inicio de la fase de prueba. Una vez usadas, las piezas plásticas fueron lavadas con agua y detergente y luego limpiadas con etanol al 70%. Luego, se dejaron secar al aire libre durante al menos 24 horas antes de usarlas nuevamente.



Los contenedores y los platos fueron rotulados y siempre fueron usados con un olor específico (i.e., extracto de cabeza, aceite esencial de lavanda o ninguno). En los experimentos en los que se usó aceite esencial de lavanda (grupo olor aversivo y grupo olor aprendido), los papeles filtro con el olor fueron reemplazados cada 5 minutos. En aquellos experimentos en los que se usó el olor conespecífico, los papeles filtro con el extracto y el solvente fueron sustituidos cada dos minutos.

En cada experimento se trabajó con un solo individuo, y cualquier otra avispa que aterrizó en la fuente de alimento fue removida por medio de un aspirador para insectos con el fin de prevenir los efectos del incremento local. En los experimentos que requirieron trabajar con avispas con experiencia previa, al inicio del experimento el individuo fue marcado en el tórax con un pequeño punto de ténpera lavable, para facilitar su posterior identificación (D'Adamo y Lozada 2011) (Ver procedimiento de marcado en Anexo). En aquellos casos en los que la avispa se movió o alejó de la fuente durante el marcado, ésta fue removida y se trabajó con la siguiente avispa en aterrizar. De esta manera, descarté posibles disturbios sobre la avispa experimental como resultado del procedimiento de marcado. Para trabajar con avispas provenientes de diferentes colonias, las réplicas de un determinado experimento fueron llevadas a cabo en diferentes ubicaciones separadas al menos por 200 m (Edwards 1980; Moreyra et al. 2012).

### 2.3. Experimento 1: rol del olor durante el hallazgo del alimento (avispa sin experiencia)

En primer lugar, evalué la importancia del olor en la búsqueda de una nueva fuente de alimento. Para esto trabajé con avispas sin ninguna experiencia previa con el alimentador ofrecido. Se evaluaron dos tratamientos: olor aversivo y olor conespecífico. En el grupo olor aversivo, se ofrecieron simultáneamente dos alimentadores idénticos, uno de los cuales

contenía aceite esencial de lavanda (ver sub-sección “olores” descrita anteriormente) mientras que el otro alimentador no contenía ningún olor adicional. Ambos alimentadores fueron situados sobre el suelo, a 60 cm uno del otro, formando una línea perpendicular a la dirección del viento con la finalidad de prevenir cualquier solapamiento de las plumas de olor. En el grupo olor conespecífico los alimentadores se colocaron de la misma manera que se detalló anteriormente, excepto que uno de ellos contenía el extracto mientras que el otro contenía el solvente (100 µl de etanol). Una vez colocados sobre el suelo, se registró la elección de la primera avispa que arribó al área experimental. La elección fue registrada tanto en términos de dos variables respuesta: el primer acercamiento y el primer aterrizaje. Un "acercamiento" ocurrió cuando la avispa se aproximó a menos de 20 cm del alimentador. Un "aterrizaje" ocurrió cuando la avispa tocó la carne con sus seis patas.

#### 2.4. Experimento 2: rol del olor durante la relocalización de una fuente de alimento estacionaria (avispa con experiencia)

Luego de evaluar la preferencia por el olor en avispas sin experiencia, examiné el rol de un olor durante la relocalización de una fuente de alimento estacionaria, es decir, una fuente que permaneció en su ubicación original a lo largo de todas las visitas. Al trabajar con una fuente estacionaria, se incluyó la influencia de las claves visuales del terreno aprendidas durante las visitas previas. Para enriquecer visualmente el área experimental y favorecer el aprendizaje espacial, se insertaron 4 bastones de madera color amarillo (2,5 cm de diámetro x 50 cm de alto) formando una figura de un cuadrado (40 x 40 cm). Estudios en *V. germanica* conducidos bajo condiciones experimentales similares mostraron que la adición de claves visuales conspicuas en áreas abiertas, tales como costas de lagos, puede mejorar significativamente el reconocimiento del micrositio de alimentación (D'Adamo y Lozada 2007).

Se examinaron 3 tratamientos con olor: olor aversivo, olor aprendido y olor conoespecífico. Además, se llevó a cabo un tratamiento control en el que no se agregó ningún olor adicional al alimentador, a fin de evaluar el rol del micrositio aprendido en la elección de fuentes de alimento sin la influencia de claves olfativas adicionales. El experimento involucró dos fases: fase de entrenamiento y fase de prueba.

- *Fase de entrenamiento:* durante esta etapa se utilizó solo un alimentador, el cual fue situado a 10 cm de una de las aristas del cuadrado formado por los cuatro bastones. En los tratamientos olor aversivo y olor conoespecífico el alimentador de entrenamiento no fue tratado con ningún olor adicional, mientras que en el tratamiento olor aprendido el alimentador contenía aceite esencial de lavanda, con el fin de promover el aprendizaje asociativo del estímulo olfativo. El experimento comenzó cuando una avispa se acercó espontáneamente al área experimental. Luego de aterrizar, la avispa fue inmediatamente marcada de acuerdo al procedimiento detallado en la sección "Procedimiento general de los experimentos a campo" y se permitió que la avispa recolectara carne durante 3 visitas consecutivas.

- *Fase de prueba:* antes de la cuarta visita, el alimentador usado durante la fase de entrenamiento fue removido y dos nuevos alimentadores fueron instalados: uno de ellos fue situado en el sitio original de entrenamiento (i.e., sitio aprendido) mientras que el otro fue ubicado en el lado opuesto del cuadrado formado por los bastones de madera (i.e., lugar nuevo), a 60 cm del lugar original. Ambos alimentadores se posicionaron formando una línea perpendicular a la dirección del viento. Al igual que en los experimentos con avispas sin experiencia (ver sub-sección 2.2), uno de los alimentadores fue tratado con un olor (i.e., aceite esencial de lavanda o extracto, según el tratamiento) mientras que el otro permaneció sin tratar, excepto en el caso del grupo olor conoespecífico, en el cual se aplicó 100 µl de solvente. Dependiendo de la posición relativa del alimentador con el olor (i.e., lugar aprendido o lugar nuevo), se evaluaron dos subgrupos de avispas dentro de cada tratamiento. La fase de prueba

se inició cuando la avispa marcada retornó al área experimental. La elección de la avispa fue registrada en términos de su primer acercamiento y de su primer aterrizaje.

La posición relativa de los alimentadores (i.e., izquierda o derecha, en relación a la dirección del viento) fue invertida al azar entre los experimentos. Para prevenir una posible contaminación cruzada de olores, trabajé con tres conjuntos diferentes de bastones de madera, uno para cada tipo de olor empleado (i.e., extracto, aceite esencial de lavanda o ninguno). Adicionalmente, los bastones fueron limpiados con etanol al 70% entre experimentos.

## 2.5. Experimento 3: rol del olor durante la relocalización de una fuente de alimento desplazada (avispas con experiencia)

Aquí examiné el rol de un olor durante la relocalización de una fuente de alimento que ha sido desplazada de su lugar original. En contraposición al experimento 2 detallado en la subsección anterior, al trabajar con una fuente desplazada se buscó excluir la influencia de las claves visuales del terreno previamente aprendidas en la preferencia de las avispas. En este caso también evalúe 3 tipos de olores: olor aversivo, olor aprendido y olor conespecífico. Además, también llevé a cabo un tratamiento control en el que se evaluó la preferencia de las avispas por dos fuentes de alimento idénticas sin la adición de un olor. De manera similar al experimento de relocalización de la fuente estacionaria, el área experimental también fue enriquecida visualmente con 4 bastones de madera de color amarillo. Los experimentos involucraron una fase de entrenamiento y una fase de prueba.

- *Fase de entrenamiento:* esta etapa fue llevada a cabo como se detalló en los experimentos de relocalización de una fuente de alimento estacionaria.

- *Fase de prueba:* antes de la cuarta visita, el alimentador de entrenamiento fue removido y dos nuevos alimentadores fueron colocados a 1,5 m “viento arriba” del micrositio original de entrenamiento y a 60 cm de distancia uno del otro. Esta disposición espacial en

forma de V (similar a la empleada en el capítulo 3) me permitió desacoplar los alimentadores de prueba de las claves del lugar aprendido y evitar así la influencia de las claves espaciales en la preferencia de las avispas. De igual manera que en los experimentos 1 y 2, uno de los alimentadores estuvo tratado con un olor adicional (aceite esencial de lavanda o extracto), mientras que el otro permaneció sin ser tratado, excepto en el tratamiento del olor conespecífico en el cual este alimentador contenía etanol. Cuando la avispa marcada retornó al área experimental, registré el alimentador elegido en términos de su primer acercamiento y primer aterrizaje.

## 2.6. Análisis estadístico

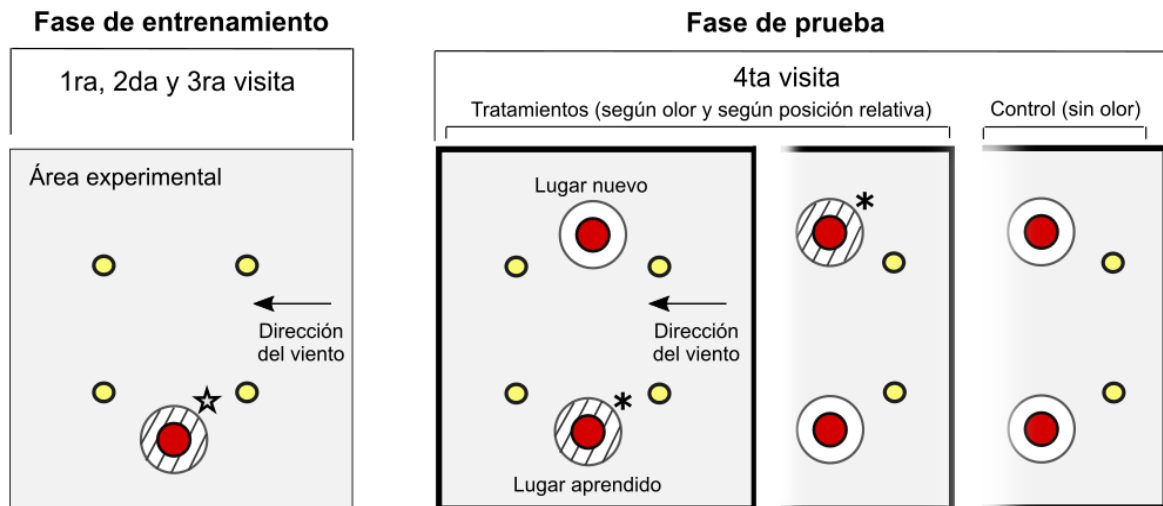
El test binomial exacto fue empleado para analizar la preferencia de las avispas por la fuente con olor versus la fuente sin olor y así determinar si la frecuencia de avispas en cada alimentador difirió de la frecuencia esperada del 50% en cada fuente. Se llevó a cabo un test para cada tratamiento (i.e., olor aversivo, olor aprendido, olor conespecífico y control) de cada experimento (i.e., hallazgo del alimento, relocalización de la fuente de alimento estacionaria y relocalización de la fuente de alimento desplazada). Las variables respuesta (primer acercamiento y primer aterrizaje) fue analizadas independientemente. Los análisis estadísticos fueron realizados por medio del software R versión 3.6.1 (R Core Team 2019), con un  $\alpha=0,05$ .

(a) Localización de una fuente de carroña (avispas sin experiencia)

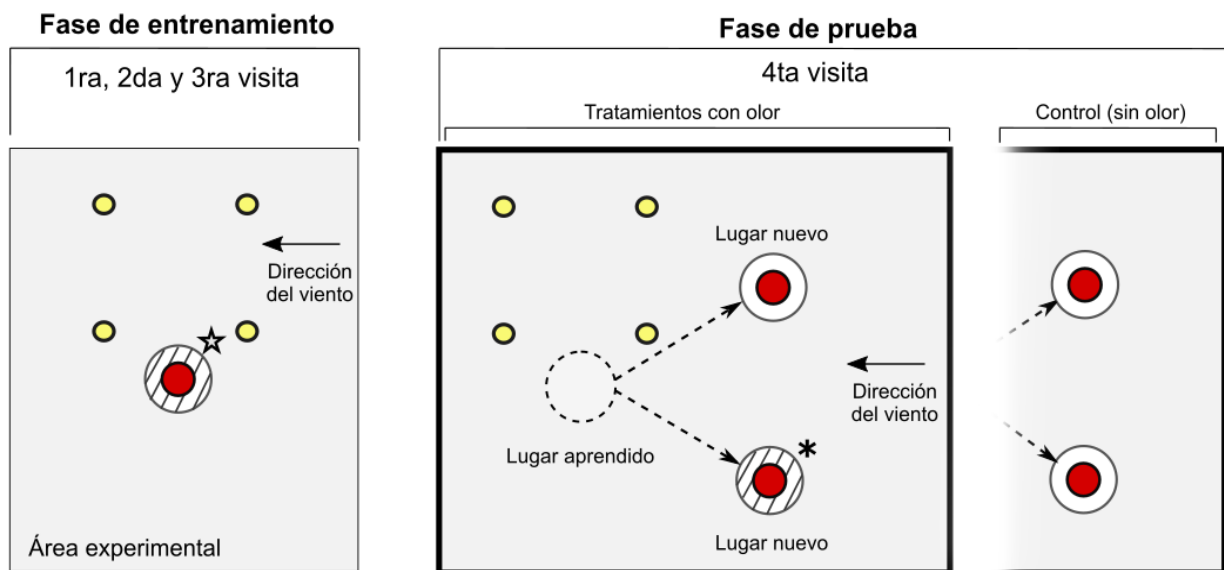


\* Lavanda (en el grupo Olor aversivo) o extracto de cabezas (en el grupo Olor co-específico)

(b) Re-localización de una fuente de carroña estacionaria (avispas con experiencia)



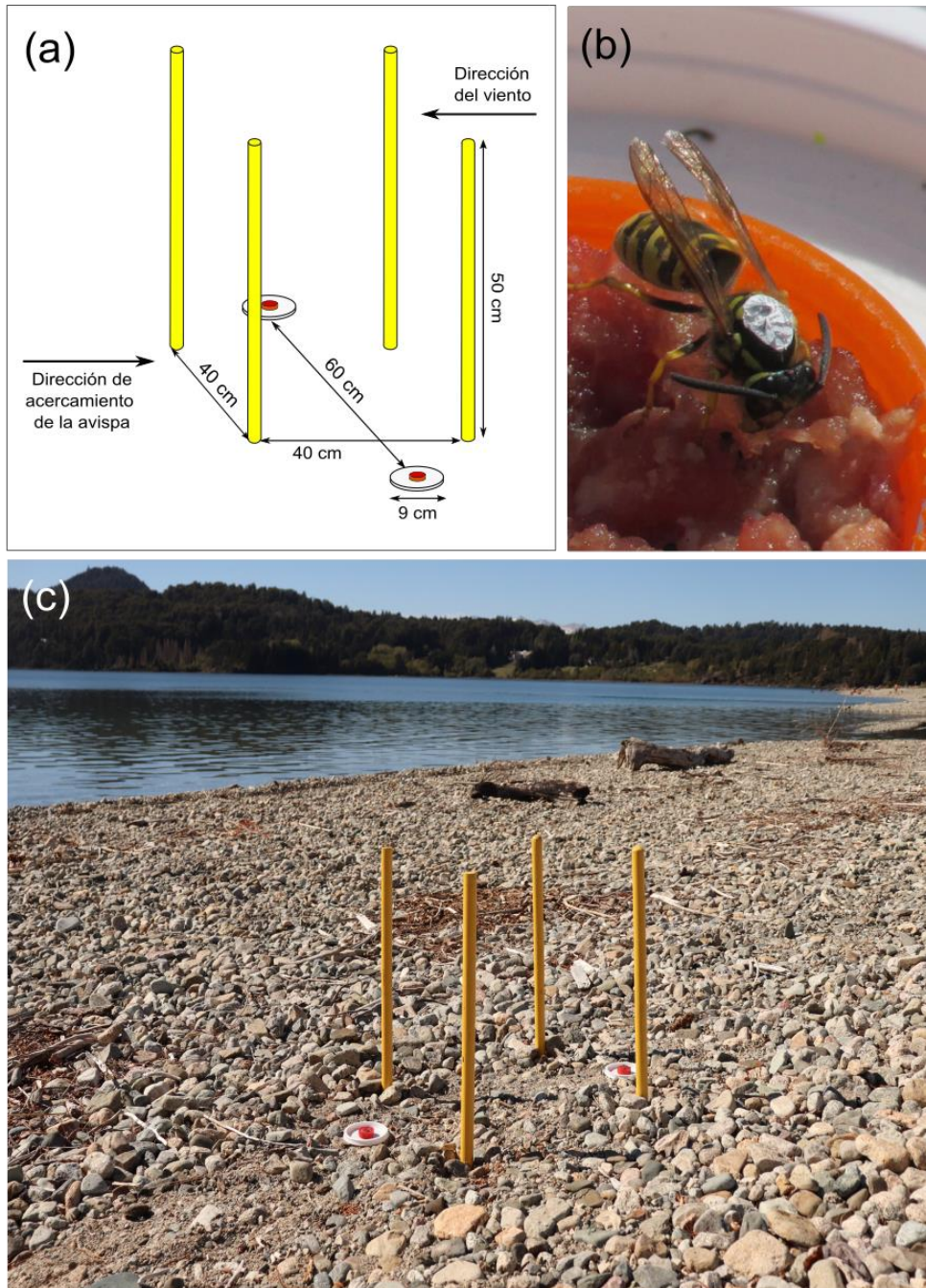
(c) Re-localización de una fuente de carroña desplazada (avispas con experiencia)



★ Lavanda (en el grupo Olor aprendido) o nada (en los grupos Olor aversivo y Olor co-específico).

\* Lavanda (en los grupos Olor aprendido y Olor aversivo) o extracto de cabezas (en el grupo Olor co-específico).

**Fig. 1** Diagrama del diseño experimental empleado para analizar el rol de las claves olfativas en las decisiones de forrajeo de las avispas bajo diferentes contextos. **a)** Preferencia de avispas sin experiencia por una fuente de alimento tratada con un olor no-alimenticio versus una fuente de alimento idéntica no tratada (i.e., escenario de hallazgo de una fuente de carroña). En este caso, se evaluaron dos tratamientos: olor aversivo (i.e., aceite esencial de lavanda) y olor conespecífico (i.e., extracto). Posteriormente, evalué la preferencia por una fuente tratada con un olor versus una fuente no tratada en avispas que tuvieron experiencia previa de forrajeo. Esto se evaluó bajo dos escenarios: **b)** relocalización de una fuente de carroña estacionaria y **c)** relocalización de una fuente de carroña que ha sido desplazada de su lugar original. Se evaluaron tres tratamientos: olor aversivo (i.e., aceite esencial de lavanda), olor conespecífico (i.e., extracto) y olor aprendido (olor de lavanda luego de aprendizaje asociativo). Ambos experimentos de relocalización involucraron dos fases: entrenamiento y prueba. La fase de entrenamiento consistió en tres visitas a una fuente sin tratar, excepto en el grupo olor aprendido, en el que la fuente estuvo tratada con lavanda a fin de promover el aprendizaje asociativo del olor. Durante la fase de prueba, ambas fuentes de alimento (tratada y no tratada) fueron colocadas en el lugar original (i.e., relocalización de carroña estacionaria) o en un lugar nuevo (i.e., relocalización de carroña desplazada). En la cuarta visita, se evaluó la preferencia de la avispa en términos del primer acercamiento y primer aterrizaje.



**Fig. 2** a) Detalle de la arena experimental utilizada durante la fase de prueba en los experimentos de relocalización de la fuente de carroña estacionaria. Ambos alimentadores fueron colocados a nivel del suelo formando una línea perpendicular a la dirección del viento. b) Fotografía de una avispa forrajera de *Vespula germanica* durante la manipulación del alimento y detalle de la marca de témpera sobre su tórax usada para su identificación. c) Fotografía de uno de los sitios donde se llevó a cabo el experimento de relocalización (crédito: M.B. Yossen)



### 3. Resultados

#### 3.1. Experimento 1: rol del olor durante el hallazgo del alimento (avispa sin experiencia)

En el grupo olor aversivo se observó un fuerte rechazo hacia la fuente tratada con lavanda, ya que sólo un pequeño porcentaje de las avispas evaluadas se acercaron y aterrizaron sobre la esta fuente (11% y 9% respectivamente) (test binomial exacto, primer acercamiento:  $p < 0,0001$ ; primer aterrizaje:  $p < 0,0001$ ;  $n = 44$ ). En el grupo de olor conespecífico, la mayoría de las avispas (72%) eligieron la fuente de alimento con el extracto, tanto en términos de primer acercamiento (test binomial exacto, primer acercamiento,  $p = 0,004$ ,  $n = 46$ ) como de su primer aterrizaje (test binomial exacto, primer aterrizaje,  $p = 0,004$ ,  $n = 46$ ) (Fig. 3).

#### 4.3. Experimento 2: rol del olor durante la relocalización de una fuente de alimento estacionaria (avispa con experiencia)

En la mayoría de los tratamientos en los que se evaluó la relocalización de una fuente de alimento estacionaria encontré una marcada preferencia por aquella fuente situada en el lugar aprendido, independientemente de si el alimentador contenía un olor adicional o no.

En el grupo olor aversivo, cuando el alimentador tratado con lavanda estuvo situado en el lugar aprendido y el alimentador no tratado en el lugar nuevo, el 86,5% de las avispas se acercó al alimentador tratado (test binomial exacto, primer acercamiento:  $p < 0,0001$ ,  $n = 37$ ). Luego se observó que algunas de las avispas que previamente se habían acercado a la fuente tratada situada en el lugar aprendido finalmente aterrizaron en la fuente no tratada situada en la posición nueva. A pesar de que hubo una tendencia hacia una preferencia por el sitio aprendido también en términos del primer aterrizaje (64,8%), esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (test binomial exacto, primer aterrizaje:  $p = 0,09$ ,  $n = 37$ ).

Cuando el olor aversivo de lavanda fue emanado desde el alimentador colocado en el sitio nuevo, todas las avispas que retornaron al área experimental se acercaron y aterrizaron en el lugar aprendido donde se encontraba el alimentador no tratado (test binomial exacto, primer acercamiento:  $p < 0,0001$ ; primer aterrizaje:  $p < 0,0001$ ;  $n = 35$ ; Fig. 4a).

En el grupo olor aprendido, se observó una fuerte preferencia por el lugar aprendido en ambos subgrupos de avispas. Cuando el alimentador tratado con el olor aprendido estuvo ubicado en el sitio aprendido y el alimentador no tratado estuvo en el lugar nuevo, el 94% de las avispas se acercaron y aterrizaron en la fuente de alimento con lavanda (test binomial exacto, primer acercamiento:  $p < 0,0001$ ; primer aterrizaje:  $p < 0,0001$ ,  $n = 33$ ). Por otro lado, cuando el alimentador con el olor aprendido estuvo ubicado en el sitio nuevo y el alimentador no tratado en el lugar aprendido, el 89,2% de las avispas se acercaron y aterrizaron en la fuente de alimento no tratada (test binomial exacto, primer acercamiento:  $p < 0,0001$ ; primer aterrizaje:  $p < 0,0001$ ,  $n = 37$ ; Fig. 4a).

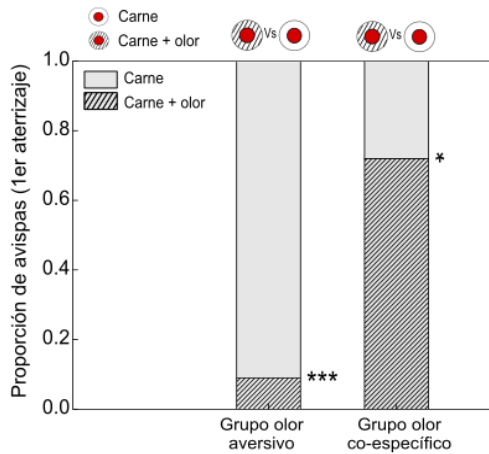
En el grupo olor conespecífico observé el mismo patrón que en el grupo olor aprendido. Cuando el alimentador con el olor conespecífico estuvo ubicado en el sitio aprendido y el alimentador no tratado en el sitio nuevo, las avispas mostraron una clara preferencia por el alimentador situado en el micrositio aprendido (90%), tanto en términos del primer acercamiento como del primer aterrizaje (test binomial exacto, primer acercamiento:  $p < 0,0001$ ; primer aterrizaje,  $p < 0,0001$ ;  $n = 39$ ). Por otro lado, cuando el alimentador con el olor conespecífico estuvo localizado en el sitio nuevo y el alimentador no tratado en el sitio aprendido, el 92% de las avispas se acercaron y aterrizaron en el alimentador no tratado (test binomial exacto, primer acercamiento,  $p < 0,0001$ ; primer aterrizaje,  $p < 0,0001$ ,  $n = 34$ ; Fig. 4a).

Las avispas también mostraron una fuerte preferencia por el sitio aprendido (89%) cuando no se agregaron olores adicionales a la fuente de alimento en ningún momento del experimento (grupo control). Esta preferencia fue observada tanto en términos del primer

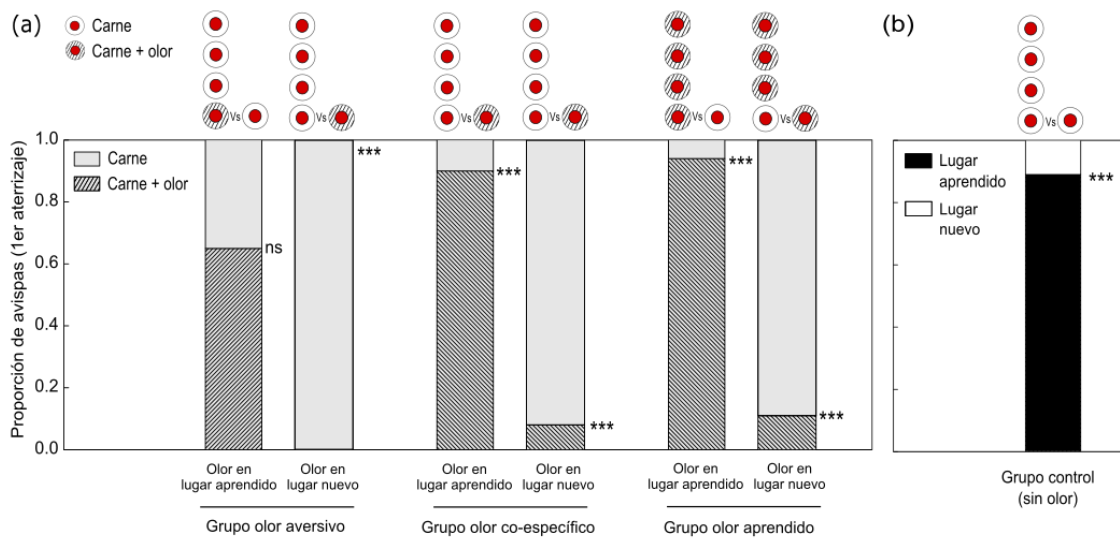
acercamiento (test binomial exacto, primer acercamiento:  $p < 0,0001$ ,  $n = 35$ ) como del primer aterrizaje (test binomial exacto, primer aterrizaje:  $p < 0,0001$ ,  $n = 35$ ; Fig. 4b).

#### 4.4. Experimento 2: rol del olor durante la relocalización de una fuente de alimento desplazada (avispa con experiencia)

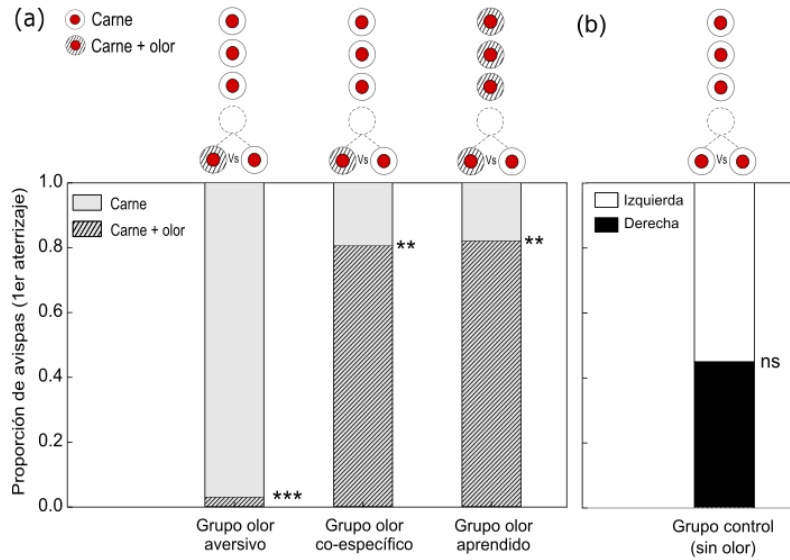
Cuando la fuente tratada con un olor y la no tratada fueron desacopladas del micro-sitio aprendido y situadas a 1,5 m “viento arriba” del sitio entrenamiento, encontré patrones de preferencia similares a aquéllos observados durante el hallazgo del alimento por parte de avispa sin experiencia. En el grupo olor aversivo, todas las avispas (100%) que habían sido entrenadas con carne sola luego evitaron la fuente de alimento con lavanda (test binomial exacto, primer acercamiento:  $p < 0,0001$ ; primer aterrizaje:  $p < 0,0001$ ;  $n = 35$ ; Fig. 5a). Por otro lado, las avispas que habían sido entrenadas en presencia del olor de lavanda (grupo olor aprendido) mostraron una marcada preferencia (81,6%) por la fuente de alimento con este olor (test binomial exacto, primer acercamiento:  $p < 0,001$ ; primer aterrizaje:  $p < 0,001$ ;  $n = 38$ ; Fig. 5a). En el grupo olor conespecífico, la presencia del extracto también promovió una preferencia por la fuente de alimento con olor conespecífico (82,4%) (test binomial exacto, primer acercamiento:  $p < 0,001$ ; primer aterrizaje:  $p < 0,001$ ,  $n = 34$ ; Fig. 5a). Finalmente, en el grupo control, en el que no se agregó ningún olor a la fuente de alimento, no se observó preferencia de lado (55% izquierda, 45% derecha) (test exacto binomial, primer acercamiento:  $p = 0,63$ ; primer aterrizaje:  $p = 0,63$ ;  $n = 40$ ; Fig. 5b); lo que demuestra que el arreglo en forma de V de los alimentadores permitió el correcto desacople espacial entre las fuentes de alimento y el sitio previamente aprendido.



**Fig. 3** Preferencia, evaluada en términos del primer aterrizaje, por una fuente de alimento + olor versus alimento solo, en avispas sin experiencia. Se evaluaron dos tratamientos: olor aversivo y olor conespecífico. (\*\*\*) indica  $p < 0.0001$ , (\*) indica  $p < 0,05$ .



**Fig. 4 a)** Preferencia (evaluada en términos del primer aterrizaje) por una fuente tratada versus una no tratada durante la re-localización de una fuente estacionaria de carroña. Durante la fase de prueba, uno de los alimentadores fue colocado en el sitio original (i.e., lugar aprendido) mientras que el otro fue colocado a 60 cm de distancia del primero, en el lado opuesto del cuadrado formado por los cuatro bastones (i.e., lugar nuevo). Se evaluaron tres tipos de olor: olor aversivo, olor conespecífico y olor aprendido. Dependiendo de la posición relativa del alimentador tratado con olor (i.e., lugar aprendido o lugar nuevo), se evaluaron dos grupos de avispas: olor en el lugar aprendido u olor en el lugar nuevo. **b)** Preferencia por el lugar aprendido versus el lugar nuevo cuando no se agregó olor a ninguna de las fuentes de alimento (grupo control). (\*\*\*) indica  $p < 0.0001$ , ns= indica diferencias estadísticamente no significativas.



**Fig. 5 a)** Preferencia, evaluada en términos del primer aterrizaje, por alimento + olor versus alimento durante la relocalización de una fuente de carroña que ha sido desplazada de su lugar original. Se evaluaron tres tipos de olor: olor aversivo, olor conoespecífico y olor aprendido. **b)** Preferencia por una fuente de alimento no tratada situada a la derecha o izquierda según la dirección del viento (grupo control). (\*\*\*) indica  $p < 0.0001$ , (\*\*) indica  $p < 0.001$ , ns=indica diferencias estadísticamente no significativas.

#### 4. Discusión

En este capítulo se demuestra que el rol de las claves olfativas durante el forrajeo de carroña en *V. germanica* varía considerablemente dependiendo de si las avispas están localizando o relocalizando una fuente de alimento. Los resultados obtenidos bajo las actuales condiciones experimentales revelan que, si bien los olores juegan un rol central en la búsqueda de alimento, carecen de relevancia en guiar el retorno de las avispas al sitio de forrajeo previamente aprendido. Durante la relocalización del alimento, las avispas experimentadas volaron hacia la fuente de alimento situada en el sitio previamente aprendido, independientemente de la presencia de una clave olfativa adicional. Interesantemente, cuando el alimento fue desacoplado del micrositio aprendido mediante su desplazamiento a una nueva posición, las avispas experimentadas usaron las claves olfativas para encontrar el recurso de manera similar a como lo hicieron las avispas sin experiencia previa. Estos

hallazgos sugieren la existencia de una jerarquía en el uso de claves, en la que las claves visuales/espaciales del terreno parecen ser más importantes para retornar a una fuente de alimento cuando el escenario de forrajeo permanecen constante, mientras que los olores serían útiles para localizar un nuevo recurso o para relocalizar un recurso conocido cuando las claves visuales/espaciales aprendidas se vuelven poco precisas (e.g., cuando los restos de animales son desplazados de su posición original).

Interesantemente, los tres tipos de olores evaluados fueron irrelevantes en guiar el primer acercamiento de las avispas durante la relocalización de una fuente estacionaria de carroña. Similares hallazgos fueron encontrados cuando se evaluó el olor del propio recurso (carne vacuna) (Lozada y D'Adamo 2011; D'Adamo y Lozada 2014). Al retornar, las forrajeras entrenadas de *V. germanica* volaron hacia el lugar aprendido incluso aunque la comida hubiera sido desplazada 60 cm de su posición original. Esta aparente irrelevancia de los estímulos olfativos en la relocalización del alimento, independientemente del tipo de clave olfativa implicada, sugiere que el olfato, como una modalidad de guía, podría no estar involucrado en la relocalización de una fuente de alimento estacionaria. Estos hallazgos difieren de los resultados obtenidos en hormigas, en los que la importancia relativa de la modalidad olfativa y visual pareció depender del tipo de clave olfativa implicada (e.g., clave aprendida o social). Por ejemplo, se ha visto que la relevancia de la feromona de rastro como mecanismo de orientación para *Lasius niger* disminuye a medida que la hormiga gana experiencia recorriendo el sendero y la memoria espacial va siendo adquirida (Grüter et al. 2011); sin embargo, también se ha visto que su relevancia se mantiene en senderos más complejos y con mayor número de bifurcaciones (Czaczkes et al. 2013). Por otra parte, también se encontró que la memoria olfativa es más importante que la memoria de ruta en guiar a las hormigas experimentadas a través del laberinto en Y (Oberhauser et al. 2019). Inclusive otros estudios indican que la combinación de ambas modalidades de orientación puede mejorar la precisión en el hallazgo del objetivo debido a que claves bimodales son a menudo más rápidamente aprendidas que claves unimodales (Steck et al. 2011; Buehlmann et

al. 2020b). Estudios posteriores podrían contribuir a dilucidar si estas discrepancias en el uso de claves están asociadas con diferencias en el estilo de vida y ecología, o simplemente causadas por las condiciones experimentales.

Los resultados sugieren que los olores son usados secundariamente durante la relocalización de carroña, cuando las claves visuales/espaciales del terreno fallan en predecir la ubicación de la recompensa. Un patrón similar en el uso de claves fue reportado previamente por Raveret Richter y Jeanne (1985) en *Polybia sericea*, una avispa estrictamente depredadora, mientras relocalizan restos de presas. Estos autores encontraron que las claves visuales asociadas a la posición del alimento desencadenaron una intensa respuesta de búsqueda en las avispas que retornaban al área de forrajeo, mientras que las claves olfativas de la presa fueron más propensas a desencadenar aterrizajes. Observaciones similares fueron posteriormente reportadas por Moreyra y colaboradores (2007) en avispas con experiencia de *V. germanica*. Posiblemente, estos paralelismos entre especies con diferentes estrategias de alimentación podrían indicar que la predominancia de la memoria espacial constituye un mecanismo de relocalización ampliamente distribuido entre una gran variedad de especies (e.g., Tolman 1948). Por otra parte, esta flexibilidad en el uso de claves podría permitir a las avispas lidiar con escenarios de forrajeo cambiantes, ya que el desplazamiento de recursos alimenticios es un evento frecuente en ambientes naturales (Lozada y D'Adamo 2011). Estos hallazgos concuerdan con investigaciones previas en las que se observó que la introducción de cambios contextuales (e.g., la adición de recursos novedosos o un cambio en el color de las marcas del terreno) durante la relocalización de una fuente de carroña facilitó el descubrimiento de nuevos recursos (D'Adamo y Lozada 2014; Moreyra et al. 2020).

Esta dependencia del contexto durante el uso de claves en avispas sociales también se ha demostrado en diversas especies de véspidos y bajo diferentes escenarios de forrajeo. Hendrichs et al. (1994) encontraron que *V. germanica* puede alternar el uso de las modalidades visuales y olfativas dependiendo de las características del hábitat. En condiciones de cobertura vegetal densa, el hallazgo de las presas fue guiado principalmente

por kairomonas emitidas por los machos, mientras que en hábitats más abiertos tanto las claves visuales como las olfativas tuvieron un rol relevante en direccionar el forrajeo de las avispas (Hendrichs et al. 1994). En otro trabajo se reportó que la atracción hacia conespecíficas (incremento local) puede ser afectada por varios factores como, por ejemplo, el grado de antropización del hábitat (Wilson-Rankin 2015). En este estudio también se encontró que la atracción hacia avispas conespecíficas parece ser mayor en ausencia de claves relacionadas al alimento, sugiriendo que el incremento local es más probable de ocurrir en avispas sin experiencia o aquéllas que carecen conocimiento individual del recurso, similar a lo observado en abejas sin aguijón (Slaa et al. 2003). Interesantemente, los resultados obtenidos aquí indican que las avispas sin experiencia son igualmente atraídas por el olor conespecífico que las avispas experimentadas en busca de un recurso que fue desplazado del lugar aprendido. Por lo tanto, el aprendizaje espacial puede ser considerado como un factor que también puede modular la respuesta a estímulos olfativos sociales.

Varios estudios han señalado que el comportamiento de búsqueda en avispas sociales depende del tipo de recurso siendo explotado (e.g., carbohidratos o proteínas) (D'Adamo y Lozada 2003; Moreyra et al. 2007; Wilson-Rankin 2014). Vale la pena destacar que los resultados de este estudio fueron obtenidos en el contexto de explotación de carroña. Sin embargo, *V. germanica* también explota recursos ricos en carbohidratos, como fruta, miel y exudados de áfidos, que representa la principal fuente de energía para los adultos (Edwards 1980). En contraposición a la carroña, que es un recurso típicamente efímero distribuido de manera puntual en el espacio, los carbohidratos son más bien un recurso semipermanente que se distribuye generalmente en forma de parches. Estudios previos en *V. germanica* han encontrado diferencias en la respuesta de búsqueda entre avispas entrenadas con proteínas y con carbohidratos (D'Adamo y Lozada 2003; Moreyra et al. 2007). Luego de la remoción de la fuente alimento, las avispas que habían sido entrenadas con proteínas realizaron un mayor número de sobrevuelos y aterrizajes sobre el micrositio aprendido que aquellas avispas que habían sido entrenadas con miel. De manera semejante, cuando las hormigas retornan a un



área de forrajeo y el alimento ya no estaba disponible, iniciaron una búsqueda sistemática en la que la amplitud de la caminata fue mayor para fuentes de proteínas que para carbohidratos (e.g., Traniello 1988; Fourcassié y Traniello 1994; Schultheiss y Cheng 2013). Estos patrones comportamentales están en línea con el hecho de que, en la naturaleza, las fuentes de proteínas tienden a distribuirse de manera más dispersa o menos agrupada que las fuentes de carbohidratos. Por lo tanto, estudios futuros podrían examinar la importancia relativa de claves visuales/espaciales aprendidas y de olores durante la relocalización de carbohidratos.

En conclusión, este capítulo proporciona nuevos hallazgos acerca del rol del olfato en la navegación de corto rango en *V. germanica* durante la explotación de fuentes abundantes de proteína. Por un lado, los resultados indican que el uso de claves olfativas depende del contexto y que su rol varía radicalmente de acuerdo a la actividad que la forrajera está realizando: ya sea buscando una nueva fuente de alimento, relocalizando una fuente de alimento estacionaria o relocalizando una fuente de alimento que fue desplazada del lugar aprendido. Por otro lado, estos hallazgos también corroboran que la memoria espacial constituye un mecanismo de guía primario durante la relocalización de carroña, como se sugirió en estudios previos (e.g., Lozada y D'Adamo 2014). Esto muestra que el uso de olores para la búsqueda de recursos es dependiente del contexto y que el aprendizaje espacial constituye un factor que puede modular en gran medida la respuesta a claves olfativas, lo que mejora nuestro entendimiento sobre la plasticidad comportamental de vespídos mientras explotan recursos en contextos dinámicos.

# Capítulo 5

Rol de la experiencia en la respuesta a olores:

Rol de la primera experiencia en el aprendizaje asociativo de claves olfativas

---

## Resumen

El aprendizaje de claves ambientales que ayuden a predecir la presencia del alimento es crucial durante el forrajeo. Si bien la mayor parte de las investigaciones sobre qué factores afectan la fuerza de una asociación se han enfocado en las propiedades inherentes a los componentes de la asociación (e.g., cantidad/calidad de la recompensa, saliencia del estímulo condicionado), la influencia de factores relacionados al individuo, como la experiencia previa, ha sido menos explorada. En este capítulo exploré el rol de la primera experiencia en el aprendizaje asociativo de un olor durante el forrajeo de carroña. A través de diferentes experimentos a campo evalué la fuerza de la asociación luego de la adición del olor en diferentes momentos. Primero evalué el rol de la primera visita en el aprendizaje del olor y luego, centrándome sólo en la primera visita, exploré la importancia de primer encuentro de la avispa con la fuente en el establecimiento de la asociación. Los resultados muestran que la primera experiencia influencia el subsecuente aprendizaje de un olor. Si bien las avispas fueron capaces de aprender el olor en todas las visitas, la mayor fuerza asociativa se observó durante la primera visita. Al analizar sólo la primera visita de forrajeo, encontré que la presencia del olor durante la etapa de encuentro con el alimento pareció ser imprescindible pero no fue suficiente para garantizar la formación de la asociación, ya que la adición de un pre-encuentro previo (i.e., primer encuentro) moduló fuertemente el posterior aprendizaje del olor. Estos hallazgos indican que el aprendizaje de claves olfativas es variable a lo largo del

forrajeo de carroña y que la fuerza de la asociación olor-alimento depende del momento en que el olor es percibido.

**PALABRAS CLAVE:** aprendizaje asociativo, claves olfativas, memoria olfativa, plasticidad comportamental, experiencia previa

## 1. Introducción

El aprendizaje de claves ambientales que ayuden a predecir la presencia del alimento es crucial durante la explotación de recursos en un ambiente que está en constante cambio. El aprendizaje asociativo permite al animal establecer relaciones predictivas entre eventos contingentes. En particular, el condicionamiento clásico apetitivo, permite el establecimiento de una contingencia temporal entre un estímulo neutro (i.e., estímulo condicionado, EC) y un estímulo que tiene una importancia biológica para el animal (i.e., recompensa o estímulo incondicionado, EI) (Gallistel et al. 2014). Como resultado, la presencia del estímulo condicionado se convierte en un predictor de la ocurrencia de la recompensa y la presentación de este estímulo sólo desencadena una respuesta condicionada similar a la que desencadena la recompensa (Rescorla 1988; Shettleworth 2010). Este mecanismo permite a un animal predecir la presencia de potenciales fuentes de alimento en base a claves ambientales previamente aprendidas.

El ambiente para un forrajero es típicamente dinámico (por ejemplo, cambios en la distribución de recursos, desplazamientos y/o desapariciones de la fuente de alimento, entre otros), por lo que es esperable que la fuerza de las asociaciones apetitivas también varíe en respuesta a cambios en el escenario de forrajeo. Se conocen varios factores que pueden

afectar la fuerza de una memoria asociativa, no obstante, la mayoría de los estudios se han enfocado en las propiedades inherentes a los estímulos condicionados e incondicionados, como por ejemplo, cantidad y calidad de la recompensa (Wright et al. 2009; Burke y Waddell 2011; Thane et al. 2019), saliencia del estímulo incondicionado (Mishra et al. 2013), o la confiabilidad de la asociación (i.e., qué tan bien el estímulo incondicionado predice la recompensa), dada por el número y frecuencia de las experiencias estímulo-recompensa (Menzel 1999; Hoedjes et al. 2011, 2014). La experiencia previa y el estado interno del animal son factores que también pueden modular la fuerza de una asociación (Lewis y Takasu 1990). Sin embargo, aunque estas variables se mantengan constantes, una simple presentación estímulo-recompensa puede dar lugar a memorias cuya robustez puede depender de la experiencia previa y del grado de novedad percibida por el animal.

El efecto de la primera experiencia en la cognición animal ha sido reportado a lo largo de décadas por numerosos estudios y desde diferentes enfoques. Se ha postulado que los eventos inesperados pueden favorecer los procesos de aprendizaje y memoria al mejorar la percepción y la motivación (Schomaker y Meeter 2015). La importancia del primer evento de aprendizaje también ha sido destacada en los estudios de Kamin (1969) sobre los efectos de bloqueo. El bloqueo es un proceso cognitivo donde el aprendizaje inicial puede interferir con la posterior asociación de un estímulo novedoso. Por ejemplo, si durante una primera instancia el animal aprende que un cierto estímulo (estímulo condicionado o EC) predice el alimento ( $EC1 \rightarrow EI$ ) pero, durante un segundo encuentro, se incorpora un nuevo estímulo (e.g., luz + sonido) ( $EC1 + EC2 \rightarrow EI$ ), el resultado será un aprendizaje reducido o nulo del nuevo estímulo (Kamin 1969). En esta fórmula, el estímulo condicionado puede ser un estímulo simple (e.g. luz azul) o un conjunto de estímulos (e.g. luz azul + olor), o incluso el contexto completo. Así, un primer evento de aprendizaje en un determinado contexto podría afectar el aprendizaje futuro en ese mismo contexto. Si bien este fenómeno parece ser bastante extendido en aves y mamíferos (Shettleworth 2010), la importancia de la primera

experiencia en el aprendizaje de claves contextuales en insectos sociales comprende un campo de estudio que aún no ha sido explorado en profundidad.

Comprender qué factores modulan el aprendizaje de claves ambientales a lo largo de encuentros sucesivos en un mismo sitio de forrajeo adquiere particular relevancia en insectos sociales, quienes a menudo realizan varios viajes entre la fuente de alimento y el nido donde alimentan a las larvas. Las avispas del género *Vespula*, como *V. germanica*, son un caso interesante para estudiar el rol de primera experiencia debido a su habilidad para explotar fuentes abundantes de proteína, como la carroña. A diferencia de las presas, la carroña constituye un recurso abundante y relativamente estacionario espacio-temporalmente, pero cuya aparición puede considerarse como un evento inesperado. Por lo tanto, si el escenario de forrajeo permanece inalterado, es esperable que el aprendizaje de una clave particular sea mayor durante la primera visita, ya que es durante el primer encuentro con la fuente cuando las forrajeras tienden a aprender y memorizar aquellas claves del contexto que le ayudarán a retornar a la fuente. Sin embargo, pequeños cambios en el contexto, tales como la aparición o desaparición de claves, también pueden ocurrir mientras las forrajeras revistan una fuente de carroña, e.g., debido a desplazamientos del recurso. Por lo tanto, analizar cómo el primer evento de aprendizaje puede modular el aprendizaje de claves novedosas resulta crucial para comprender cómo estas avispas responden ante cambios en el contexto de forrajeo.

En *V. germanica*, varios estudios han mostrado que la primera experiencia de forrajeo puede interferir con el aprendizaje de una nueva clave contextual en ese mismo sitio (e.g., Moreyra y Lozada 2020). Estos trabajos sugieren que es durante la primera visita de recolección cuando las avispas aprenden y memorizan aquellas claves contextuales que les permitirán relocalizar con éxito la fuente de alimento, mientras que en las visitas subsiguientes se produce el refuerzo de la asociación previamente establecida, dando lugar a memorias más robustas (D'Adamo y Lozada 2003, 2008, 2011; Lozada y D'Adamo 2009,

2011, 2014). Al analizar el número de vuelos de orientación<sup>7</sup> como un indicador de aprendizaje espacial, Moreyra y colaboradores (2012) demostraron que su número disminuye drásticamente luego de la primera visita. Recientemente, se demostró la existencia de un efecto de bloqueo asociativo durante el aprendizaje de claves contextuales, en el que se observó que el primer evento de aprendizaje parece interferir con el aprendizaje de una clave contextual añadida en el mismo sitio durante el segundo encuentro (Moreyra et al. 2020).

Los estudios que atribuyen importancia a la primera experiencia en el aprendizaje de claves contextuales en *V. germanica* han sido abordados principalmente en relación a estímulos visuales, sin embargo, la modalidad olfativa ha sido considerablemente menos estudiada. A lo largo de los diferentes capítulos de esta tesis, se ha mostrado que los olores juegan un rol primario durante la explotación de fuentes de carroña. En el capítulo 3 encontré que estas avispas pueden formar asociaciones entre un olor y una fuente de carroña durante la primera experiencia de recolección y que un mayor número de repeticiones estímulo-recompensa favoreció la consolidación de la memoria de la asociación. No obstante, aún quedan sin responder varios interrogantes en relación al rol del primer encuentro en el aprendizaje de una clave olfativa: ¿puede un olor ser aprendido luego de la primera visita? ¿La fuerza de la asociación olor-alimento depende del momento en el que el olor es experimentado (i.e., en la primera o en subsecuentes visitas)? ¿Qué rol desempeña la modificación del contexto en la fuerza de la asociación?

En este capítulo me propuse profundizar cómo la experiencia previa de forrajeo puede modular el aprendizaje asociativo de olores. En particular, analicé el papel que desempeña la primera experiencia con la fuente en la subsecuente asociación de claves olfativas novedosas durante sucesivas visitas a una fuente estacionaria de carroña. Debido a que la carroña es típicamente un recurso estacionario, la hipótesis es que la primera experiencia con la fuente

---

<sup>7</sup> Vuelos especializados realizados por la avispa mientras abandona la fuente de alimento y a través de los cuales aprenden la posición del alimento en relación a diversas claves del contexto (ver capítulo 1, subsección 3.3).

de alimento presenta una mayor fuerza asociativa que las subsiguientes. Por lo tanto, la predicción es que, si el escenario de forrajeo permanece relativamente constante, la fuerza de la asociación olor-alimento, evaluada en términos de la frecuencia de acercamientos hechos hacia el estímulo olfativo solo, será menor cuando un olor es introducido luego de la primera visita de la avispa a la fuente. Para evaluar esto, llevé a cabo diferentes experimentos a campo en los que evalué la fuerza de la asociación entre un olor neutro y una fuente de carroña, variando el momento en el que se introdujo el olor. Luego analicé la respuesta condicionada de las avispas frente al olor solo. En primer lugar, evalué la fuerza de la asociación a lo largo de sucesivas visitas de recolección. Posteriormente, centrándome sólo en la primera visita, exploré el rol del primer encuentro con la fuente de alimento (i.e., el momento en que la avispa se acerca a la fuente por primera vez y aterriza en ella) en la formación de la posterior asociación del olor. Adicionalmente, también evalué el rol de la incorporación de un cambio contextual en el aprendizaje del olor.

## **2. Metodología**

### **2.1. Sitio de estudio e insectos**

Los experimentos fueron llevados a cabo con avispas de *Vespula germanica* provenientes de colonias silvestres cercanas a las costas de los lagos Nahuel Huapi y Moreno, en San Carlos de Bariloche (41°S, 71°O), Argentina. El trabajo de campo fue llevado a cabo durante el período de mayor demanda energética de la colonia y de mayor abundancia local de forrajeras (marzo a mediados de mayo) durante 2019 y 2021. Los experimentos fueron conducidos a lo largo de las costas de los lagos mencionados anteriormente, que constituyen hábitats abiertos y relativamente uniformes (en comparación a áreas con vegetación), lo que los hace particularmente convenientes para trabajar con claves olfativas en condiciones de campo al favorecer la propagación de la pluma de olor. Los experimentos fueron llevados a

cabo entre las 9:00 y 18:00 horas, en días soleados y bajo condiciones de viento leve/moderado (3 a 7 km/h a nivel del suelo). La velocidad del viento fue medida con un anemómetro digital (Mastech MS6252A, rango: 1.4 ~ 108.0 ± 3% km/h).

## 2.2. Fuente de alimento y estímulo olfativo

Como recompensa alimenticia se ofreció una fuente de proteína de alta calidad que consistió en carne bovina triturada por medio de una procesadora. Como modelo de estímulo olfativo utilicé vainilla, un olor neutro comúnmente empleado en experimentos de aprendizaje olfativo en avispas (e.g., Lewis y Takasu 1990; Hoedjes et al. 2014; Santoro et al. 2015). Cabe aclarar que en este capítulo se optó por trabajar con un olor neutro en lugar de uno repelente debido a que un olor repelente podría ocasionar respuestas diferenciales de evitación y de abandono del recurso dependiendo del momento en el que este es introducido, lo cual podría interferir con los resultados de los experimentos. Por ese motivo se consideró adecuado trabajar con un olor neutro que no desencadenara respuestas de atracción ni de evitación hacia la fuente de alimento. El tratamiento consistió en 0,8 ml de una solución al 50% de extracto natural comercial de vainilla y agua.

Antes de evaluar el aprendizaje asociativo del olor de vainilla, primero llevé a cabo ensayos de preferencia para corroborar que la dosis de vainilla empleada no desencadenara respuestas espontáneas de repelencia ni de atracción en las avispas. Durante este experimento, dos alimentadores idénticos con carne fueron simultáneamente situados sobre el suelo, 60 cm uno del otro y formando una línea perpendicular a la dirección del viento. El alimentador consistió en un pequeño contenedor cilíndrico (2,5 cm de diámetro por 1 cm de alto) con 10 gramos de carne picada en su interior. A su vez, el contenedor fue situado sobre un plato plástico de color blanco (9 cm de diámetro por 0,5 cm de alto). Uno de los alimentadores contenía además 0,8 ml de la solución de vainilla aplicados en un papel filtro (7 cm de



diámetro) situado entre el pequeño contenedor y el plato. Una vez colocado en el suelo, registré el número de avispas que aterrizaron en cada alimentador durante 10 minutos. Cada avispa que aterrizó fue inmediatamente removida por medio de un aspirador manual para insectos, a fin de evitar los efectos del incremento local.

### 2.3. Procedimiento general de los experimentos

Para analizar el rol de la primera experiencia en el posterior aprendizaje de un olor novedoso, se llevaron a cabo diferentes experimentos que consistieron en la adición de una clave olfativa neutra en diferentes momentos durante el forrajeo de una fuente de carroña y luego evaluar la memoria asociativa del olor a través de la cuantificación de la respuesta de atracción hacia el olor de vainilla no recompensado (Fig. 1). En el primer conjunto de experimentos se evaluó el rol de la primera visita de recolección en el aprendizaje del olor durante las visitas subsiguientes. En el segundo conjunto de experimentos, me centré sólo en la primera visita de recolección y analicé qué rol desempeña el encuentro con el alimento (i.e., el momento que la avispa se acerca y aterriza sobre el alimento) en la formación de la asociación olor-alimento. Posteriormente, analicé la importancia del primer encuentro con la fuente (i.e., el momento en que la avispa se acerca y aterriza sobre el alimento por primera vez) en la modulación del subsecuente aprendizaje del olor, lo cual se realizó mediante la adición de un pre-encuentro antes de la visita completa. Todos los experimentos involucraron dos fases: entrenamiento y prueba. La fase de prueba, en la cual se evaluó la memoria del olor, fue común en todos los experimentos, mientras que los experimentos se diferenciaron entre sí por su fase de entrenamiento (Fig. 1).

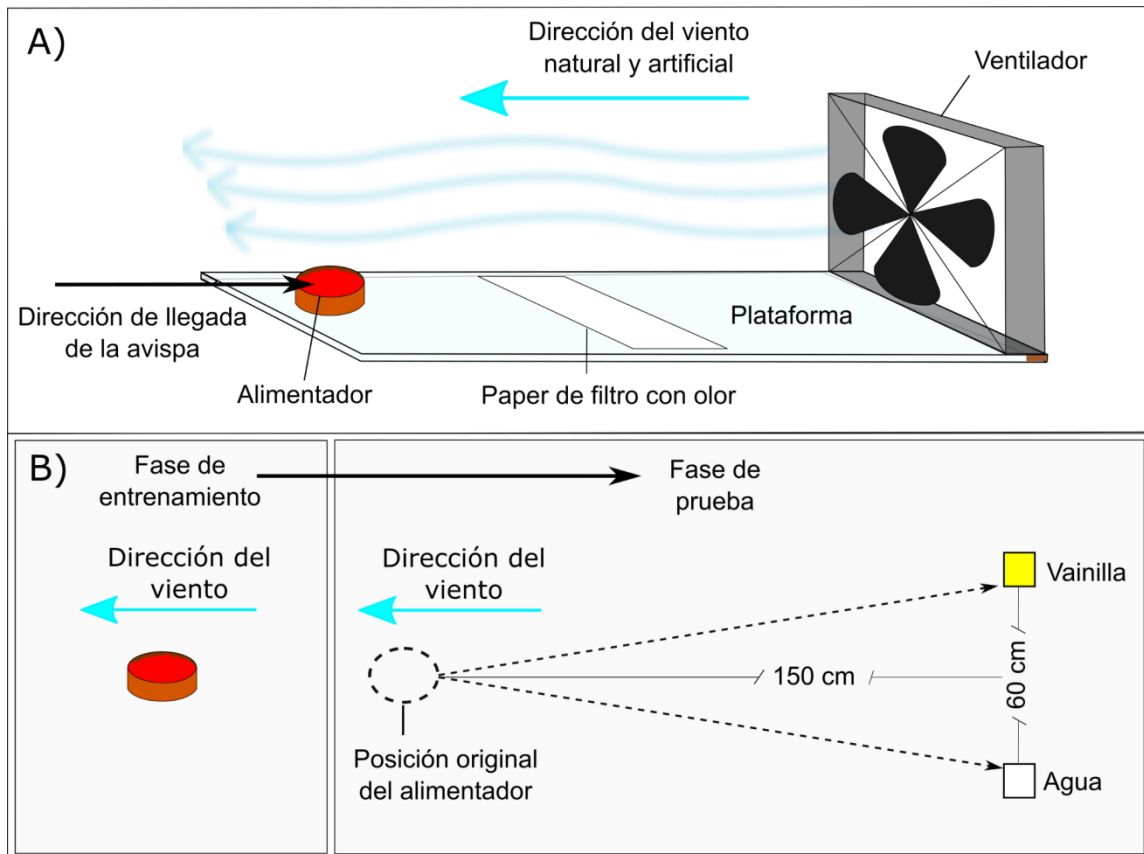
- *Fase de entrenamiento:* Durante esta etapa, se utilizó una estación de alimentación compuesta por tres elementos (Fig. 2a): un pequeño contenedor cilíndrico (2,5 cm de diámetro por 1 cm de alto) repleto hasta el límite con carne vacuna; una pieza de papel filtro

(5 x 5 cm) que contenía 0,8 ml de la solución de vainilla; y un ventilador de PC (12 x 12 cm, 9 v). Estos elementos fueron montados linealmente sobre una plataforma rectangular de vidrio transparente (35 x 15 cm) (Fig. 1a). La plataforma fue situada a nivel del suelo y orientada de manera tal que los tres elementos estuvieran alineados con la dirección del viento. El ventilador, situado a 25 cm de distancia de la fuente de alimento, suministró una corriente de viento continua (5 a 6 km/h medidos bajo condiciones de no-viento) sobre la fuente de olor y sobre la fuente de alimento. Esta corriente artificial suministró una fuente de viento adicional al viento natural y sirvió para favorecer la propagación de la pluma de olor incluso ante repentinas fluctuaciones en la velocidad del viento. Además, esta disposición lineal de los diferentes elementos permitió manipular la fuente de olor sin causar disturbios en las avispas mientras permanecían posadas sobre el alimento. La fase de entrenamiento comenzó cuando una avispa sin experiencia arribó espontáneamente a la estación de alimentación. Luego del aterrizaje, la avispa fue rápidamente marcada con un punto de ténpera en su tórax de acuerdo al procedimiento de D'Adamo y Lozada (2011) y sin causar disturbios (Ver procedimiento de marcado en Anexo). Se permitió que la avispa marcada recolectara alimento y volase en dirección al nido durante  $k$  veces, dependiendo del tratamiento (ver subsecciones 2.4 - 2.6) (Fig. 1b). Para evitar efectos del incremento local, se trabajó con una sola avispa por experimento y ese mismo individuo no fue usado en experimentos posteriores. Cualquier otra avispa que aterrizó en el recurso fue removida por medio de un aspirador manual. Una vez que el experimento se inició, el papel filtro con el olor fue reemplazado cada 3 minutos, mientras que el contenedor con el alimento fue reemplazado entre visitas consecutivas para evitar disturbar a las avispas.

- *Fase de Prueba:* Luego de completar la sesión de entrenamiento y antes de que la avispa retornase para la siguiente visita de recolección, la estación de alimentación fue removida y se colocaron dos piezas de papel filtro (5 x 6 cm) a 150 cm de distancia del lugar donde se encontraba el alimento, en dirección contraria a la del viento y a 60 cm una de la otra (Fig. 1b). Ambas piezas de papel filtro estuvieron suspendidas a 10 cm sobre el nivel del

suelo por medio de una pinza sujetadora de papel. Uno de los papeles filtro contenía 0.8 ml de la solución de vainilla mientras que el otro contenía el mismo volumen de agua. Este arreglo en forma de V (idéntico al detallado en el experimento 3 de subsección 2.5) me permitió evaluar la respuesta al olor sin la influencia del micrositio previamente aprendido. En el capítulo 3 se demostró que este procedimiento es útil para cuantificar la respuesta de atracción hacia un estímulo olfativo aprendido bajo condiciones de campo. La fase de prueba se inició cuando la avispa marcada retornó al sitio de entrenamiento (lo que ocurrió generalmente luego de unos pocos minutos después de su partida) y consistió en registrar el número de acercamientos realizados hacia cada uno de los papeles filtro durante un lapso de 10 minutos. Un "acercamiento" ocurrió cuando la avispa se aproximó a menos de 10 cm del papel filtro, a favor del viento (Ver comportamiento de acercamiento en Anexo). Durante esta fase, ambos papeles de filtro fueron reemplazados cada 3 minutos. A su vez, la posición relativa de los papeles de filtro fue alternada aleatoriamente entre experimentos.

Cada réplica de un determinado experimento fue llevada a cabo en diferentes ubicaciones separadas al menos por 200 m, a fin de trabajar con avispas de diferentes nidos (Edwards 1980; Moreyra et al. 2012).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo de los elementos usados durante las fases de entrenamiento y de prueba en los experimentos. a) Estación de alimentación empleada durante el entrenamiento de las avispas. b) Diagrama simplificado del arreglo espacial empleado durante la fase de prueba.

## 2.4 Importancia relativa de la primera experiencia de recolección en el aprendizaje de un olor

En este punto, analicé la fuerza de la memoria asociativa de un olor que fue introducido en diferentes visitas de recolección. Es decir, se evaluó la fuerza de la asociación que resultó de una simple presentación olor-recompensa en diferentes visitas de recolección. Para esto, llevé a cabo dos tipos de experimentos:

### 2.4.1. Experimento 1.

En el primer experimento, se evaluaron 6 tratamientos con diferente nivel de experiencia, ya sea con o sin vainilla (Fig. 1).

**Grupo CV:** La avispa fue entrenada con 1 visita de recolección en presencia de vainilla. Al ser introducida al inicio del experimento, el olor estuvo presente desde el momento que la avispa arribó a la fuente de alimento hasta que partió en dirección al nido llevando un trozo de carne. De acuerdo a mi hipótesis, en este tratamiento se espera observar el mayor nivel de respuesta de atracción al olor de vainilla.

**Grupo C,C,CV:** la avispa fue entrenada con 3 visitas de recolección y la vainilla estuvo presente sólo en la última visita. El olor fue introducido al experimento entre la segunda y la tercera visita.

**Grupo C,C,C,C,CV:** la avispa fue entrenada con 5 visitas de recolección y la vainilla estuvo presente sólo en la última visita. El olor fue incorporado al experimento entre la cuarta y la quinta visita.

**Grupo C:** La avispa fue entrenada con 1 visita de recolección en ausencia de vainilla. En este tratamiento se espera que no haya una respuesta de atracción hacia el olor de vainilla.

**Grupo C,C,C:** La avispa fue entrenada con 3 visitas de recolección en ausencia de vainilla.

**Grupo C,C,C,C,C:** La avispa fue entrenada con 5 visitas de recolección en ausencia de vainilla.

#### 2.4.2. Experimento 2

También examiné la importancia relativa de la primera visita de recolección en la formación de la asociación olor-alimento en avispas con el mismo nivel de experiencia (i.e., dos visitas de recolección). En este caso, evalúe 4 tratamientos (Fig. 2a):

**CV,C:** La avispa fue entrenada con dos visitas de recolección y la vainilla estuvo presente sólo durante la primera visita.

**C,CV:** La avispa fue entrenada con dos visitas de recolección y la vainilla estuvo presente sólo durante la segunda visita.

**C,CVd:** La avispa fue entrenada con dos visitas de recolección y la vainilla estuvo presente sólo durante la segunda visita. Sin embargo, en este caso, la estación de alimentación fue desplazada del lugar aprendido antes de la segunda visita, con el fin de evaluar si el aprendizaje de un olor novedoso puede ser favorecido por la introducción de un cambio contextual adicional. Antes de que la avispa retornase, la estación de alimentación fue movida 2 m de su posición original, en dirección opuesta a la dirección de viento, y luego desplazada 1,25 m lateralmente, siguiendo un arreglo de en forma de L.

## 2.5 Aprendizaje del olor durante la primera visita

Aquí me propuse analizar el rol del encuentro con el alimento en el aprendizaje del olor. Para esto, evalué en qué momento de la visita (encuentro con el alimento o recolección del alimento) es crucial la presencia del olor para que se forme la asociación entre el olor y la recompensa. La visita de forrajeo fue hipotéticamente dividida en dos etapas: 1) encuentro: el lapso desde que la avispa se acerca a la fuente y aterriza sobre ella; 2) recolección: lapso que abarca desde que la avispa empieza a manipular el alimento hasta que abandona la fuente llevando una pieza de carne en sus mandíbulas. Cabe aclarar que la etapa de encuentro involucró un breve lapso de manipulación del alimento durante el cual se llevó a cabo el marcado de la avispa. Sin embargo, este tiempo en general no excedió los 15 segundos y podría ser considerado insignificante en comparación al tiempo de manipulación promedio de la carne bajo condiciones experimentales similares (media±error estándar: 154±11.2 segundos, ver capítulo 3). En total, se evaluaron 5 tratamientos en los cuales la avispa fue entrenada con una sola visita de forrajeo y la presencia del olor fue manipulada mediante su adición/remoción en diferentes momentos (Fig. 2b)

**CV[e-r]:** En este tratamiento la vainilla estuvo presente desde el inicio del experimento hasta que la avispa recolectó el alimento, i.e., que la avispa encontró y recolectó alimento en presencia del olor a vainilla. En este tratamiento se espera observar el mayor nivel de respuesta de atracción al olor de vainilla.

**CV[e]:** En este tratamiento la vainilla también estuvo presente desde el inicio del experimento, pero fue removida inmediatamente luego del marcado de la avispa, i.e., la avispa encontró el alimento en presencia de vainilla, pero luego lo manipuló y recolectó alimento en ausencia del olor.

**CV[m-c]:** En este grupo, la vainilla fue agregada luego del procedimiento de marcado, i.e., la avispa encontró la fuente de alimento sin vainilla, pero manipuló y recolectó carne en presencia del olor a vainilla.

**CV[e]sinCorte:** En este tratamiento se permitió que una avispa aterrizase en una fuente de alimento con olor de vainilla, pero, luego del marcado, la estación de alimentación fue cuidadosamente removida, impidiendo que la avispa manipulase y recolectase exitosamente carne.

**CV[e+r]impreg:** En este tratamiento evalué si el olor de vainilla puede permanecer en el recurso luego de la remoción del papel filtro con vainilla, por ej. al haberse impregnado en la carne. Para probar esto, analicé si una fuente de alimento que ha sido previamente expuesta al olor en la estación de alimentación puede promover una respuesta de atracción significativa hacia el olor de vainilla durante la fase de prueba. El experimento consistió en colocar el contenedor con carne en la estación de alimentación con vainilla durante 5 minutos, para permitir que la pluma de olor cubriese la superficie del recurso. Posteriormente, el contenedor fue llevado a una plataforma idéntica pero sin vainilla. En el experimento, se permitió que una avispa aterrice y recolecte alimento de dicha fuente.

**C[e+r]:** En este tratamiento la vainilla estuvo ausente durante toda la visita, i.e., que la avispa encontró y recolectó alimento en ausencia del olor a vainilla. En este tratamiento se espera que no haya una respuesta de atracción hacia el olor de vainilla.

La fase de prueba fue llevada a cabo cuando la avispa marcada retornó al área de entrenamiento en su segunda visita. En el caso del grupo en el que no se permitió la recolección del alimento (CV[e]sinCorte), los papeles de filtro fueron insertados 3 minutos después de la remoción de la estación de alimentador, ya que este tiempo es el que las avispas suelen demorar entre visitas sucesivas (observación personal).

## 2.6. Importancia del primer encuentro con el alimento en el aprendizaje del olor

En la sub-sección previa se analizó el papel que desempeña el encuentro con la fuente de alimento en la formación de la asociación. Aquí examiné el rol del primer encuentro con el alimento al evaluar si éste puede modular el subsecuente aprendizaje de un olor novedoso. Para evaluar esto, llevé a cabo un experimento en el cual agregué un pre-encuentro anterior la visita completa a la fuente (Fig. 2c). En un segundo experimento, llevé a cabo el mismo experimento, pero sustituyendo el tipo de recurso entre ambos encuentros (Fig. 2c).

### 2.6.1. Experimento 1

En este experimento evalué si la adición de un pre-encuentro anterior a la visita completa de recolección puede interferir con el aprendizaje del olor en dicha visita. El propósito de agregar un encuentro previo fue evaluar si esa breve primera experiencia (que no involucrase la recolección de alimento) puede modular el posterior aprendizaje del olor. Se llevaron a cabo 5 tratamientos en los que la avispa fue entrenada con una sola visita de recolección y la fase de prueba fue llevada a cabo cuando la avispa retornó en su segunda visita. (Fig. 2c).



**CV:** En este tratamiento la vainilla estuvo presente durante la visita completa (i.e., encuentro y recolección) en presencia del olor. En este tratamiento se espera observar el mayor nivel de respuesta de atracción al olor de vainilla.

**cv\_CV:** En este caso, las avispas también tuvieron una visita completa (i.e., encuentro y recolección) en presencia de vainilla, pero esta visita fue precedida por un breve pre-encuentro con la fuente de alimento con el olor. La fase de entrenamiento fue dividida en dos etapas: pre-encuentro con vainilla seguido de una visita completa (encuentro + recolección) también con vainilla. El entrenamiento consistió en permitir que una avispa se acerque y aterrice sobre una fuente de alimento con vainilla. Luego del aterrizaje, la avispa fue marcada rápidamente como se detalló en las sub-secciones anteriores. Luego del proceso de marcado, la estación de alimentación fue cuidadosamente removida causando mínimo disturbio en la avispa. Luego de 3 minutos, la estación de alimentación (junto con la vainilla) fue reinsertada en la misma ubicación y se esperó a que la avispa espontáneamente retornara al área experimental. Cuando la avispa retornó, se le permitió acercarse y recolectar alimento de la fuente con vainilla.

**c\_CV:** Este tratamiento fue idéntico al anterior, con la diferencia en que el olor de vainilla estuvo presente solamente durante la visita completa.

**cv\_C:** Este tratamiento también fue idéntico a los dos anteriores, con la diferencia de que el olor de vainilla estuvo presente solamente durante el pre-encuentro.

**C:** En este tratamiento no se agregó vainilla, por lo que la avispa tuvo una visita completa (i.e., encuentro y recolección) en ausencia de este olor. En este tratamiento se espera que no haya una respuesta de atracción hacia el olor de vainilla.

También llevé a cabo dos tratamientos adicionales para evaluar la persistencia a largo plazo de la memoria del pre-encuentro con el alimento. En este caso, el pre-encuentro con la fuente ocurrió 24h antes de la visita completa (encuentro + recolección) con vainilla.

Dependiendo de la presencia o ausencia del olor de vainilla durante el pre-encuentro, se evaluaron dos tratamientos:

**cv\_CV24h:** En este tratamiento la vainilla estuvo presente durante el pre-encuentro y durante la visita completa (encuentro + recolección). El experimento fue llevado a cabo cómo se detalló previamente en el tratamiento cv\_CV, con la diferencia que la estación de alimentación fuera insertada en la misma ubicación 24 ( $\pm 1$ ) horas luego de concluida la fase de entrenamiento. La fase de prueba se inició cuando la avispa marcada retornó espontáneamente al área experimental. Si la avispa no fue observada en el área experimental dentro de un periodo de 30 minutos, se consideró que no retornó y por lo tanto fue excluida del experimento.

**c\_CV24h:** Este tratamiento fue idéntico al anterior, con la diferencia que la vainilla estuvo presente solamente durante la visita completa (encuentro + recolección).

### 2.6.2. Experimento 2

Este experimento fue similar a los detallados previamente, pero en este caso me propuse evaluar si la asociación de una clave olfativa novedosa durante la visita completa puede ser favorecida por la introducción de un cambio en el escenario de forrajeo (tipo de recurso). Llevé a cabo 4 tratamientos usando carne bovina y pescado como recompensa alimenticia (Fig. 2c).

**CV:** En el primer tratamiento evalué la memoria asociativa del olor luego de una visita completa (encuentro + recolección) a una fuente de carne vacuna con vainilla. En este tratamiento se espera observar el mayor nivel de respuesta de atracción al olor de vainilla.

**PV:** En este tratamiento se entrenó a la avispa con una visita completa (encuentro + recolección) a una fuente de pescado con vainilla. Este tratamiento fue usado también como control positivo con el fin de corroborar que el pescado tiene un valor, y por lo tanto una

fuerza asociativa, similar a la de la carne bajo las condiciones experimentales evaluadas de este trabajo.

**p\_CV:** En este tratamiento la avispa tuvo una visita completa (encuentro + recolección) a una fuente de carne con vainilla, pero luego de haber tenido un pre-encuentro previo en ausencia de vainilla y con un recurso diferente (pescado). El entrenamiento consistió en permitir que una avispa se acerque y aterrice sobre una fuente de pescado. Luego del aterrizaje, la avispa fue marcada rápidamente y la estación de alimentación fue cuidadosamente removida. Luego de 3 minutos, la estación de alimentación (junto con la vainilla) fue reinsertada en la misma ubicación, pero en este caso contenía carne vacuna. Cuando la avispa retornó, se le permitió acercarse y recolectar alimento de la fuente con carne vacuna y vainilla. La fase de prueba comenzó cuando la avispa retornó al área experimental en su segunda visita.

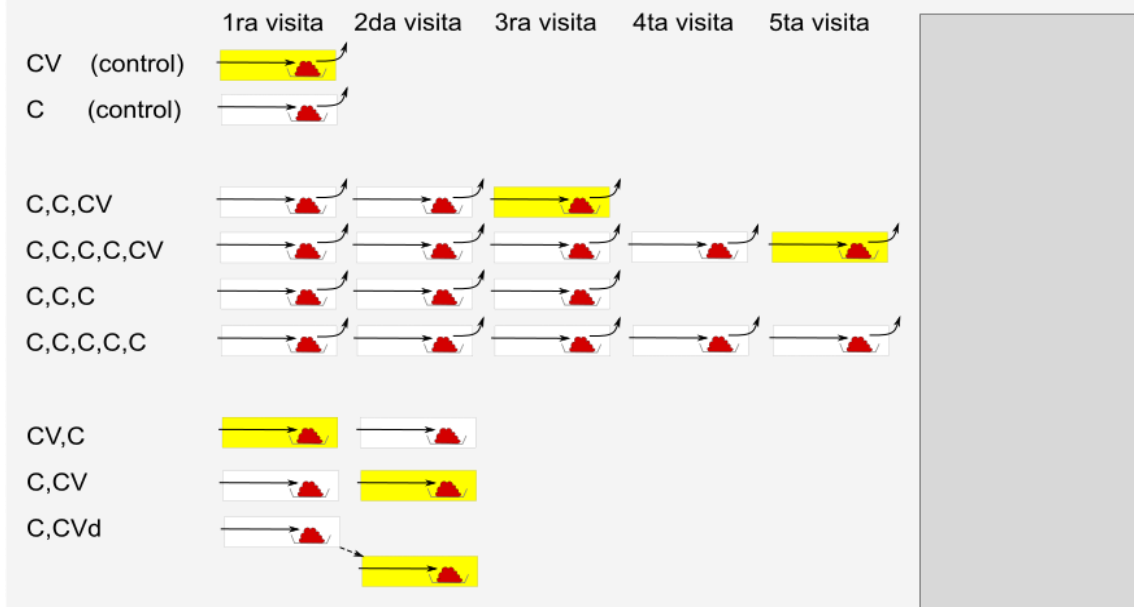
**c\_PV:** Este tratamiento fue el recíproco del anterior. En este caso, la avispa tuvo una visita completa (encuentro + recolección) a una fuente de pescado con vainilla, luego de haber tenido un pre-encuentro previo en ausencia de vainilla y con un recurso diferente (carne). Las fases de entrenamiento y prueba se llevaron a cabo de la misma manera que en el tratamiento p\_CV, con la diferencia de que en este caso se utilizó carne vacuna durante el pre-encuentro y pescado durante la visita completa.

A)

Abreviaturas de los tratamientos

Fase de entrenamiento

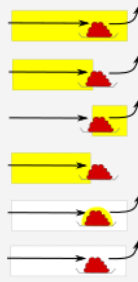
Fase de prueba



B)

CV[e+r] (control)  
 CV[e]  
 CV[r]  
 CV[e]sinCorte  
 CV[e+r]impreg  
 C[e+r] (control)

1ra visita



Vainilla



Agua



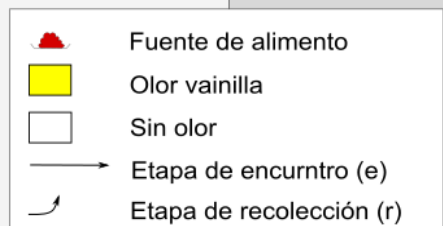
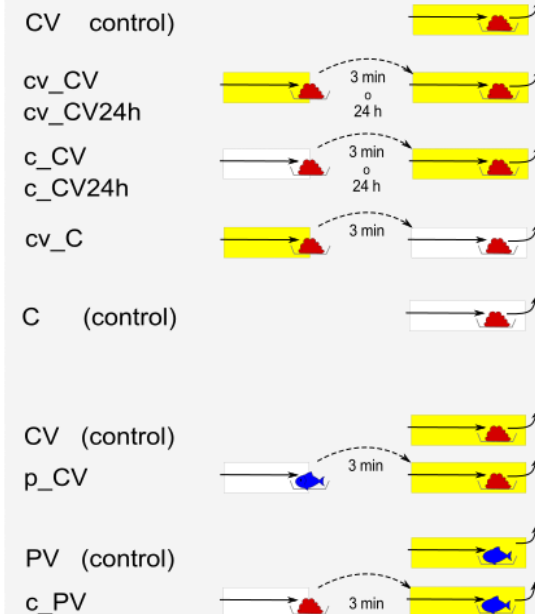
Variable respuesta:

N° de acercamientos en 10 min

C)

1ra visita

pre-encuentro [e]      visita completa [e+r]



**Figura 2.** Esquema de los diferentes conjuntos experimentales donde se detallan las diferencias en la fase de entrenamiento de los diferentes experimentos. a) experimentos para evaluar la fuerza de la memoria asociativa de un olor que fue agregado en diferentes visitas de recolección en avispas con diferente e igual nivel de experiencia. b) Experimentos para evaluar el rol del encuentro con el alimento en el aprendizaje del olor. c) Experimentos para evaluar el rol del primer encuentro con la fuente de alimento en el subsecuente aprendizaje de un olor novedoso.

## 2.7. Análisis estadístico

Para corroborar que la dosis utilizada de solución de vainilla no modificó las preferencias alimenticias de las avispas sin experiencia, apliqué el test Chi-cuadrado de bondad de ajuste para determinar si la frecuencia de avispas en cada alimentador difirió de la frecuencia esperada aleatoria del 50%.

La fuerza de la memoria de la asociación entre el olor y el alimento fue estimada en términos del número total de acercamientos realizados sobre el papel de filtro impregnado con vainilla y sobre el papel de filtro con agua durante 10 minutos. Para determinar si hubo una respuesta de atracción significativa hacia el olor a vainilla en la fase de prueba, comparé el número de acercamientos entre ambos papeles filtro por medio del test de Wilcoxon para muestras pareadas. En el caso de encontrar una respuesta de atracción significativa hacia el olor a vainilla, comparé el número total de acercamientos realizados hacia el papel filtro tratado con vainilla entre diferentes tratamientos por medio del test de Kruskal-Wallis o Wilcoxon para dos muestras independientes, dependiendo del número de grupos a comparar. En caso de que fuera necesario, se llevaron a cabo comparaciones múltiples usando el test de Dunn, con valores p ajustados por el método de Sidák. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo en R versión 4.1.0 (R Core Team 2021) at  $\alpha = 0,05$ .

## 3. Resultados

### 3.1. Importancia relativa de la primera experiencia de recolección en el aprendizaje de un olor

#### 3.1.1 Experimento 1

Cuando se evaluó la respuesta de atracción al olor de vainilla durante la fase de prueba, observé que aquéllos tratamientos en los cuales no se agregó vainilla en ninguna de las visitas no se registró una respuesta de atracción significativa hacia el olor ya que el número de acercamientos hacia el papel filtro con vainilla fue similar a los del papel filtro con agua (test de Wilcoxon, grupo C:  $v = 149,5$ ,  $p = 0,09$ ,  $n=29$ ; grupo C,C,C:  $v = 104,5$ ,  $p = 0,41$ ,  $n=26$ ; grupo C,C,C,C,C:  $v = 103$ ,  $p = 0,44$ ,  $n=25$ ; Fig. 3). Sin embargo, la vainilla sí desencadenó una respuesta de atracción significativa en avispa que tuvieron una visita de recolección en presencia de vainilla (test de Wilcoxon, grupo CV:  $v = 528$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=32$ ; grupo C,C,CV:  $v = 401$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=30$ ; grupo C,C,C,C,CV:  $z = 298,5$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=26$ ).

Interesantemente, el nivel de la respuesta de atracción al olor varió considerablemente dependiendo de la visita en la que se agregó el olor (i.e., primera, tercera o quinta) (Kruskal Wallis test,  $\chi^2 = 37,34$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,0001$ ; Fig. 3). Las avispas que tuvieron una única visita de recolección en presencia de vainilla (grupo CV) exhibieron una respuesta de atracción mayor que aquellas avispas que fueron expuestas a la vainilla durante la tercera o quinta (Tabla 1; Fig. 3).

**Tabla 1.** Resultados de comparaciones *pos hoc* entre diferentes tratamientos (CV, C,C,CV, C,C,C,C,CV) (Dunn test,  $\alpha=0,05$ ). La variable respuesta fue el número de número de episodios de atracción (i.e., n° de acercamientos) hacia el papel de filtro impregnado con vainilla

Comparación	z	Valor p
CV - C,C,CV	-5,87	<
CV - C,C,C,C,CV	-4,22	<
C,C,CV - C,C,C,C,CV	1,4	0,4

### 3.1.2. Experimento 2

Cuando se evaluó la fuerza de la asociación olor-alimento en avispas con el mismo nivel de experiencia (i.e., dos visitas de recolección), encontré un patrón similar al observado en el experimento 1. Las avispas que tuvieron el olor de vainilla en alguna de las visitas mostraron una respuesta de atracción significativa hacia el olor solo (test de Wilcoxon, CV,C:  $v = 496$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=34$ ; C,CV:  $v = 528$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=39$ ; C,CVd:  $z = 858,5$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=41$ ; Fig. 4). No obstante, las avispas que encontraron el olor a vainilla durante la primera visita de recolección (CV,C) mostraron una mayor respuesta de atracción que aquellas avispas que estuvieron expuestas al olor durante la segunda visita (Kruskal Wallis test,  $\chi^2 = 49,39$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,0001$ ; Tabla 2). De hecho, el nivel de respuesta de las avispas que tuvieron el olor de vainilla durante la primera visita (CV,C) fue similar al observado en avispas con una única visita de recolección en presencia del olor (grupo CV del experimento 1). Cuando el olor a vainilla estuvo presente durante la segunda visita (grupos C,CV y C,CVd), no encontré diferencias en el nivel de atracción al olor entre avispas que recolectaron alimento en el lugar aprendido (C,CV) y aquéllas que recolectaron carne de una fuente que había sido desplazada del lugar original (C,CVd) (Tabla 2; Fig. 4).

**Tabla 2.** Resultados de comparaciones *pos hoc* entre diferentes tratamientos (CV, CV,C, C,CV, CVd) (Dunn test,  $\alpha=0,05$ ). La variable respuesta fue el número de episodios de atracción (i.e., n° de acercamientos) hacia el papel de filtro impregnado con vainilla

Comparación	z	Valor p
CV - CV,C	1,6	0,5
CV,C - C,CV	-3,96	< 0,001
CV,C - C,CVd	-4,09	< 0,001
C,CV - C,CVd	0,08	0,99

### 3.2. Aprendizaje del olor durante la primera visita

Cuando analicé el rol de la etapa de encuentro con el recurso en la formación de la asociación olor-alimento, encontré que en todos los tratamientos en los cuales las avispas estuvieron

expuestas al olor de vainilla, aunque sea por un periodo muy breve, hubo una respuesta de atracción hacia el olor (test de Wilcoxon, CV[e+r]:  $v = 630$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=35$ ; CV[e]:  $v = 595$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=34$ ; CV[r]:  $v = 322$ ,  $p < 0,001$ ,  $n=30$ ; CV[e]sinCorte:  $v = 348$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=30$ ; CV[e+r]impreg:  $v = 122$ ,  $p < 0,01$ ,  $n=30$ ). No obstante, el nivel de la respuesta de atracción varió considerablemente dependiendo del momento en que el olor fue agregado a la fuente de alimento (test de Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 111,68$ ,  $df = 4$ ,  $p < 0,0001$ ; Fig. 5). El mayor nivel de atracción hacia el olor se observó en el tratamiento CV[e+r], en el que la vainilla estuvo presente toda la visita (i.e., encuentro y recolección). Interesantemente, las avispas que encontraron el alimento con vainilla, pero manipularon y recolectaron carne en ausencia de este olor (CV[e]), también mostraron un alto nivel de respuesta al olor, similar al observado en avispas que tuvieron una visita completa en presencia del olor (Tabla 3). Sin embargo, cuando la vainilla fue añadida al comienzo de la etapa de manipulación y estuvo presente durante toda la etapa de recolección (CV[r]), las avispas mostraron un bajo nivel de atracción al olor, e inferior al observado cuando el olor estuvo presente solamente durante la etapa de encuentro (Tabla 3). También se observó un bajo nivel de atracción en aquellas avispas que, a pesar de haber encontrado el alimento con el olor, no lograron manipular ni recolectar alimento (CVsinCorte) (Tabla 3). La menor respuesta de atracción hacia el olor de vainilla se observó en aquellas avispas que tuvieron una visita completa (i.e., encuentro y recolección) a una fuente de alimento que previamente había sido expuesta al olor (CV[e+r]impreg) (Tabla 3). Finalmente, las avispas que tuvieron una visita completa de recolección en ausencia total de vainilla (grupo C[e+r]) no mostraron una respuesta de atracción significativa hacia el olor (test de Wilcoxon, C[e+r]:  $v = 149$ ,  $p = 0,9$ ; Fig. 5).



**Tabla 3.** Resultados de comparaciones *pos hoc* entre diferentes tratamientos (CV[e+r]; CV[e]; CV[r]; CV[e]sinCorte; CV[e+r]impreg) (Dunn test,  $\alpha=0,05$ ). La variable respuesta fue el número de número de episodios de atracción (i.e., n° de acercamientos) hacia el papel de filtro impregnado con vainilla

Comparación	z	Valor p
CV[e+r] – CV[e]	-0,18	1
CV[e] – CV[r]	5,96	<
CV[e] - CV[e]sinCorte	5,96	<
CV[e+r] – CV[e+r]impreg	-7,92	<
CV[e] – CV[e+r]impreg	7,69	<
CV[r] – CV[e+r]impreg	-1,61	0,67
CV[e]sinCorte – CV[e+r]impreg	-1,67	0,62

### 3.3. Importancia del primer encuentro con el alimento en el aprendizaje del olor

#### 3.3.1. Experimento 1

En todos los tratamientos que involucraron el olor de vainilla, ya sea durante el pre-encuentro, durante la visita completa o durante ambos, se observó una respuesta de atracción significativa hacia el olor (test de Wilcoxon, CV:  $v = 528$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=32$ ; cv\_CV:  $v = 496$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=31$ ; c\_CV:  $v = 429$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=30$ ; cv\_C:  $v = 406$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=32$ ). Sin embargo, el nivel de la respuesta de atracción varió considerablemente entre los diferentes tratamientos (test Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 78,02$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,0001$ ; Fig. 6). Las avispas que encontraron y recolectaron carne en presencia de vainilla luego de haber experimentado un pre-encuentro previo con el alimento con el olor (cv\_CV) mostraron un nivel alto de respuesta hacia la vainilla sola, similar al observado en aquellas avispas que tuvieron una visita completa en presencia de vainilla pero sin pre-encuentro previo (CV) (Tabla 4). Interesantemente, cuando una visita completa en presencia de vainilla fue precedida por un pre-encuentro con el alimento sin dicho olor (c\_CV), las avispas exhibieron una respuesta de atracción débil hacia el olor en comparación con aquellas avispas que tuvieron un pre-encuentro con el alimento con vainilla (cv\_CV) (Tabla 4). Cuando analicé la fuerza de la asociación que resultó de una visita completa en ausencia de vainilla luego de un pre-

encuentro previo con la fuente de alimento con olor (cv\_C), observé un muy bajo nivel de respuesta al olor, similar al observado en el tratamiento recíproco (c\_CV) (Tabla 4). Similar a lo observado a los experimentos anteriores, cuando la visita completa de recolección ocurrió en ausencia de vainilla (grupo C), no se observó una respuesta de atracción significativa hacia el olor (test de Wilcoxon, C:  $v = 172,5$ ,  $p = 0,13$ ,  $n=29$ ; Fig. 6).

Cuando el intervalo entre el pre-encuentro y la visita completa en presencia de vainilla se amplió a 24 h, encontré que el pre-encuentro no tuvo efecto en el posterior aprendizaje del olor. En todos los tratamientos se observó una respuesta de atracción significativa al olor de vainilla durante la fase de prueba (test de Wilcoxon, cv\_CV24h:  $v = 325$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n = 25$ ; c\_CV24h:  $v = 325$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n = 25$ ). Ya sea que el pre-encuentro previo haya ocurrido en presencia o en ausencia de vainilla (cv\_CV24h y c\_CV24h, respectivamente), una visita completa con vainilla condujo a una asociación fuerte del olor en ambos tratamientos, ya que el nivel de respuesta fue similar a la observada en avispas que no tuvieron un pre-encuentro previo (CV) (Tabla 4; Fig. 7).

**Tabla 4.** Resultados de comparaciones entre diferentes tratamientos (CV; cv\_CV; c\_CV; cv\_C; cv\_CV24h; c\_CV24h) ( $\alpha=0,05$ ). La variable respuesta fue el número de número de episodios de atracción (i.e., n° de acercamientos) hacia el papel de filtro impregnado con vainilla

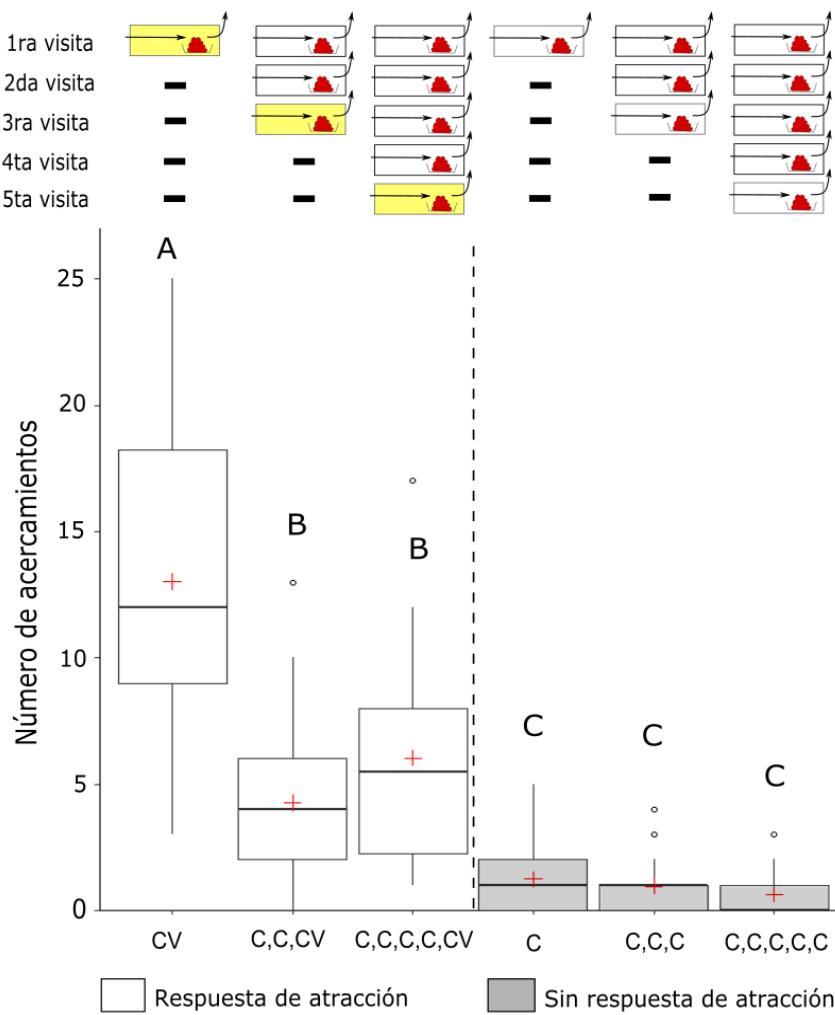
Comparación			
Test de Dunn		z	Valor p
	CV - cv_CV	-0,37	0,99
	cv_CV - c_CV	-6,38	< 0,0001
	cv_CV - cv_C	-6,42	< 0,0001
	c_CV - cv_C	-0,07	1
Test de Wilcoxon		w	Valor p
	CV - cv_CV24h	407	0,92
	CV - c_CV24h	395,5	0,95

### 3.3.2. Experimento 2

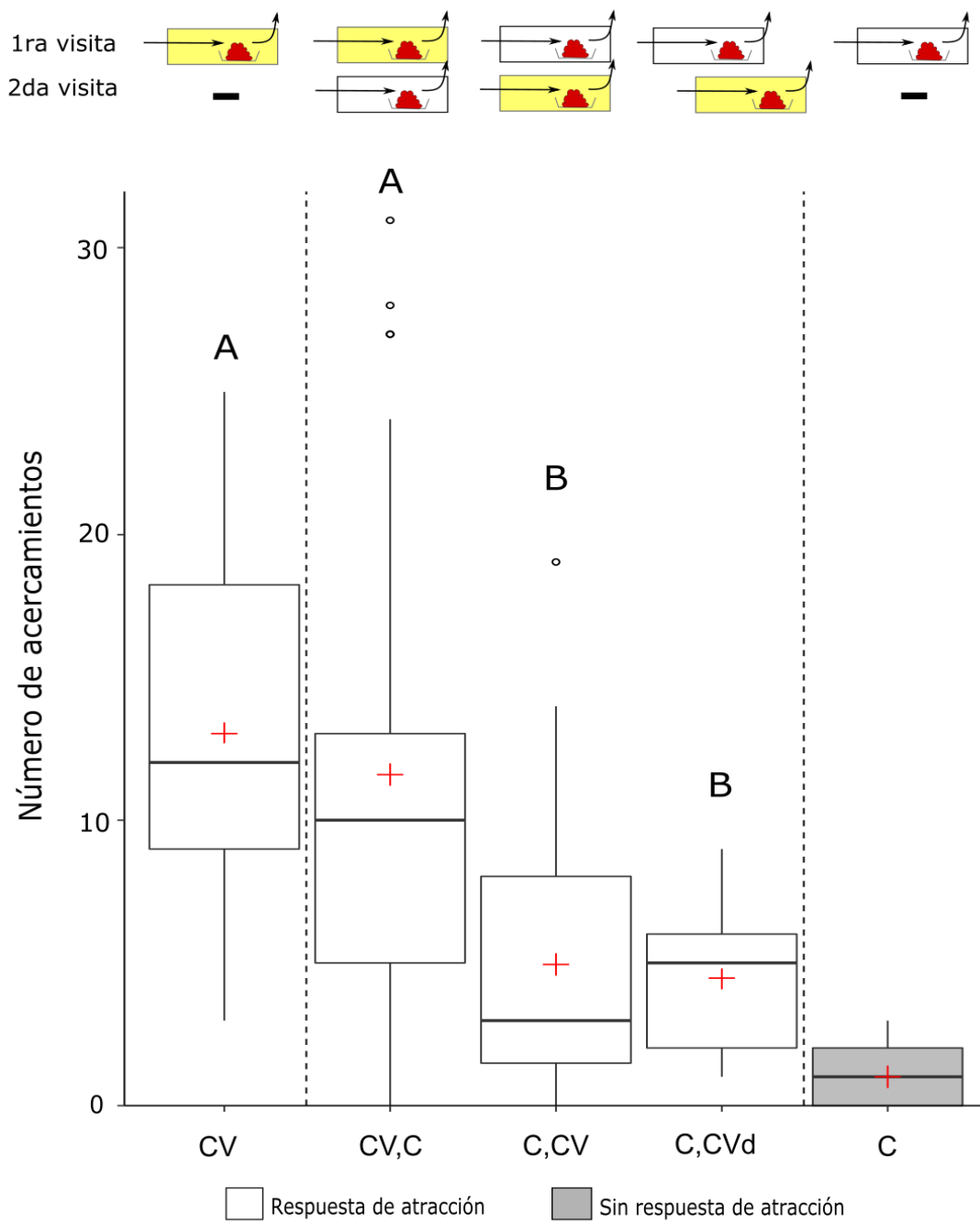
En los experimentos en los cuales el pre-encuentro fue en ausencia de vainilla y con un recurso diferente al que se ofreció durante la visita completa con vainilla, observé el mismo patrón general que en los experimentos anteriores, en los que el recurso (carne vacuna) fue constante entre ambas etapas. En todos los tratamientos, observé una respuesta de atracción significativa hacia el olor durante la fase de prueba (test de Wilcoxon, CV:  $v = 406$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=28$ ; p\_CV:  $v = 253$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=25$ ; PV:  $v = 325$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=25$ ; c\_PV:  $v = 171$ ,  $p < 0,001$ ,  $n=25$ ; Fig. 8). Cuando la visita completa a una fuente de carne con vainilla fue precedida por un pre-encuentro con una fuente de pescado sin vainilla, la respuesta de atracción al olor fue muy baja comparada a la observada en avispas que no experimentaron dicho pre-encuentro (p\_CV y CV, respectivamente) (Tabla 5). El mismo se observó en el tratamiento recíproco, en que se ofreció carne durante el pre-encuentro y pescado durante la visita completa (Tabla 5; Fig. 8).

**Tabla 5.** Resultados de comparaciones entre los diferentes tratamientos (CV; PV; p\_CV; c\_PV) (Test de Wilcoxon,  $\alpha=0,05$ ). La variable respuesta fue el número de número de episodios de atracción (i.e., n° de acercamientos) hacia el papel de filtro impregnado con vainilla

Comparación	w	Valor p
p_CV - CV	670,5	<
c_PV - PV	24	<

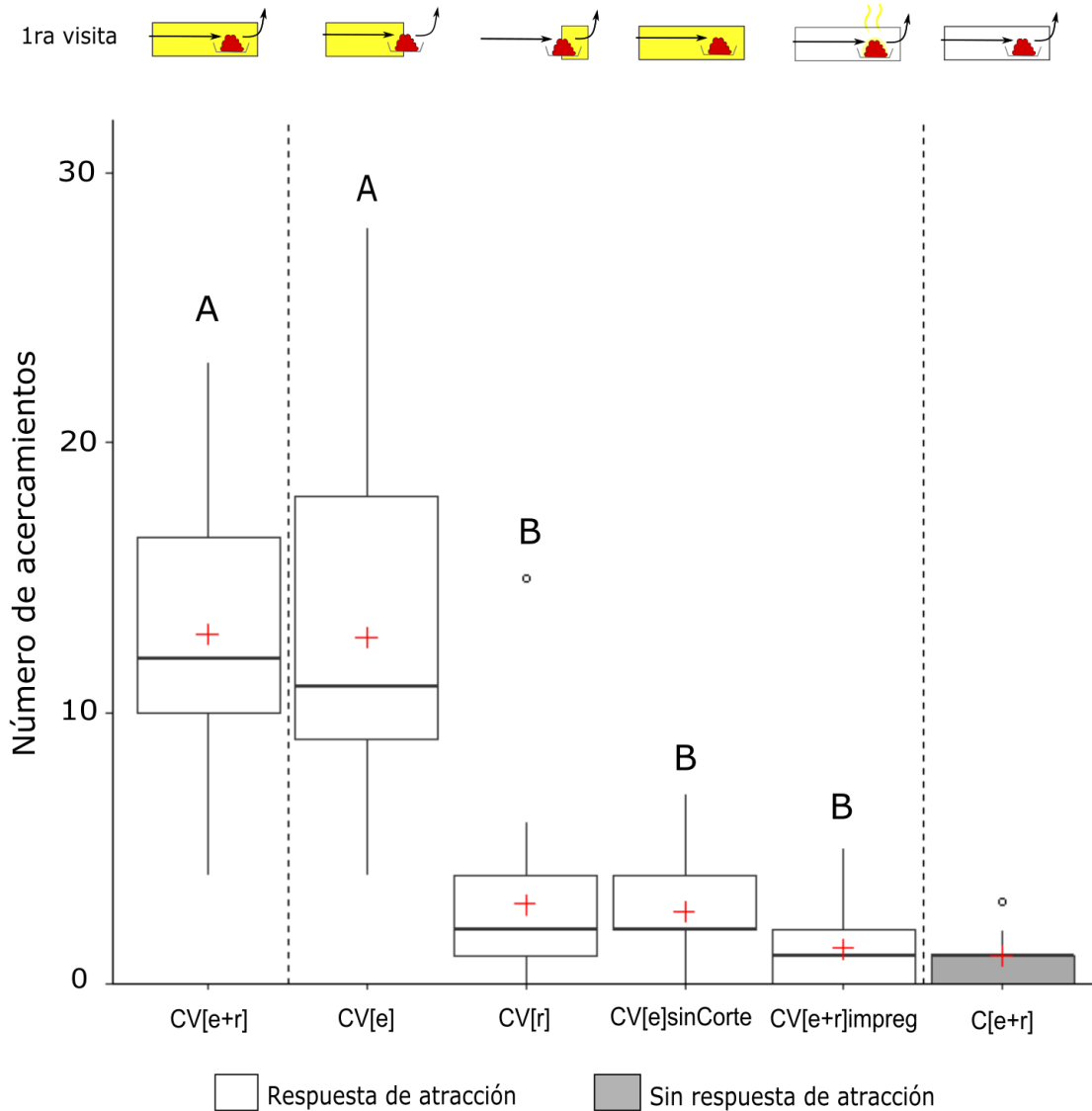


**Figura 3.** Respuesta de atracción hacia el olor de vainilla en avispas que tuvieron experiencia de recolección en presencia de vainilla (izquierda) o en ausencia de vainilla (derecha). A la izquierda de la figura se ilustran los tratamientos en los que las avispas tuvieron una experiencia de recolección en presencia del olor, durante ya sea durante la primera visita (CV), en la tercera visita (C,C,CV) o en la quinta visita (C,C,C,C,CV). A la derecha se ilustran los tratamientos con una, tres y cinco visitas de recolección en ausencia de olor de vainilla. indican la mediana, cuartiles y valores alejados. Los datos se representan en mediana, cuartiles y valores alejados. La cruz roja dentro de cada box indica el valor de la media. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en el nivel de atracción al olor de vainilla solo, evaluado en términos de número total de acercamientos hechos hacia el papel filtro impregnado con vainilla ( $\alpha = 0,05$ ).



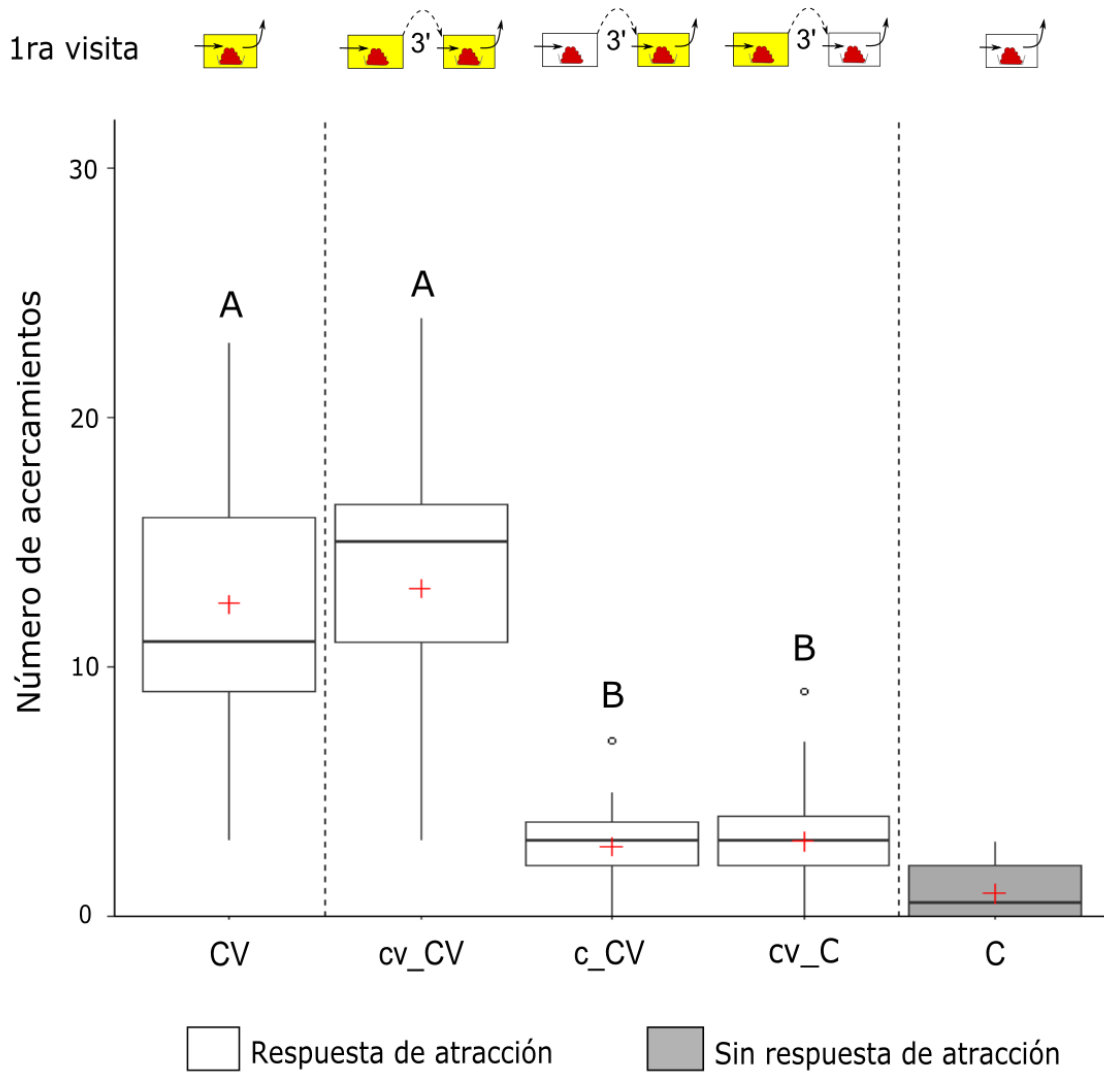
**Figura 4.** Respuesta de atracción al olor de vainilla en avispas que experimentaron el olor durante la primera o la segunda visita, pero todas ellas tuvieron el mismo nivel de experiencia (2 visitas). En el grupo CV,C el olor estuvo presente durante la primera visita y ausente durante la segunda. En el grupo C,CV el olor estuvo ausente durante la primera visita y presente durante la segunda. En el grupo C,CVd el olor estuvo ausente durante la primera visita y presente durante la segunda, pero en este caso la fuente fue desplazada entre ambas visitas. El grupo CV corresponde a una visita simple en presencia de vainilla (control). El grupo C corresponde a una visita simple en ausencia de vainilla (control). Los datos se representan en mediana, cuartiles y valores alejados. La cruz roja dentro de cada box indica el valor de la media. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente

significativas en el nivel de atracción al olor de vainilla solo, evaluado en términos de número total de acercamientos hechos hacia el papel filtro impregnado con vainilla ( $\alpha = 0,05$ ).

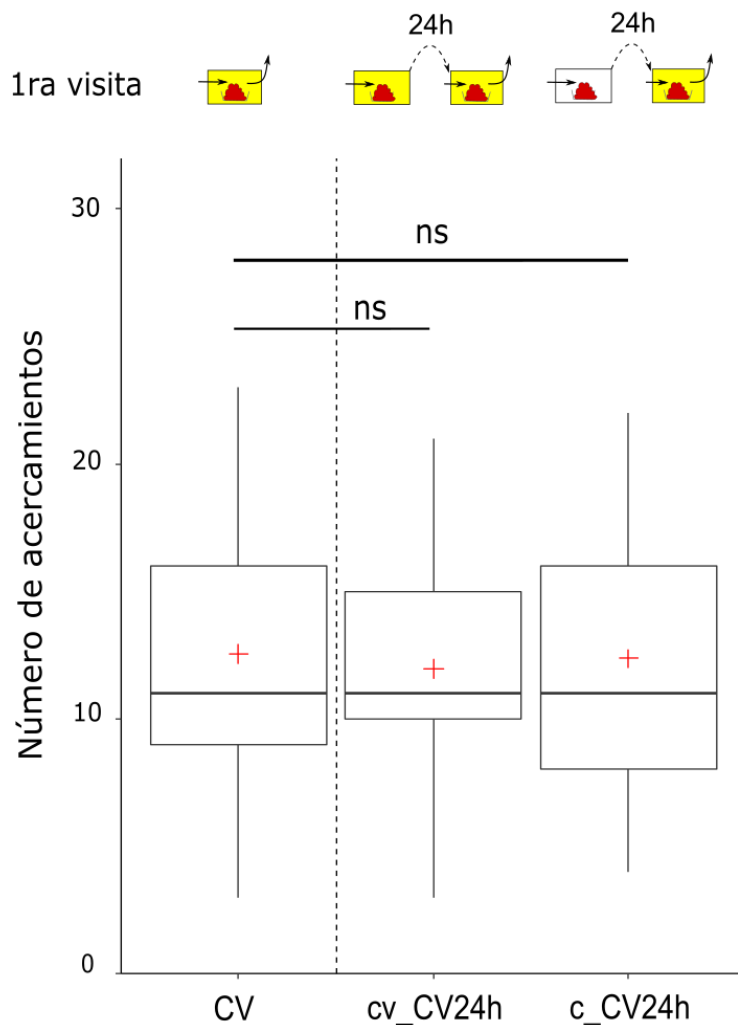


**Figura 5.** Respuesta de atracción al olor de vainilla en avispas que experimentaron el olor en diferentes momentos dentro de la primera visita de recolección. En el grupo CV[e+r] el olor estuvo presente durante toda la visita (etapas de encuentro + recolección) (control +). En el grupo CV[e] el olor estuvo presente solamente durante la etapa de encuentro con el alimento. En el grupo CV[r] el olor estuvo presente solamente durante la etapa de recolección del alimento. En el grupo CV[e]sinCorte el olor estuvo presente durante la etapa de encuentro, pero se evitó que la avispa recolectara alimento. En el grupo CV[e+r]impreg la avispa tuvo una experiencia completa (encuentro + recolección) en una estación de alimentación sin vainilla pero con una fuente que estuvo expuesta previamente al olor. En el grupo C[e+r] la avispa tuvo una visita completa (encuentro + recolección) en ausencia total de vainilla (control -). La cruz roja dentro de cada box indica el valor de la media.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en el nivel de atracción al olor de vainilla solo, evaluado en términos de número total de acercamientos hechos hacia el papel filtro impregnado con vainilla ( $\alpha = 0,05$ ).

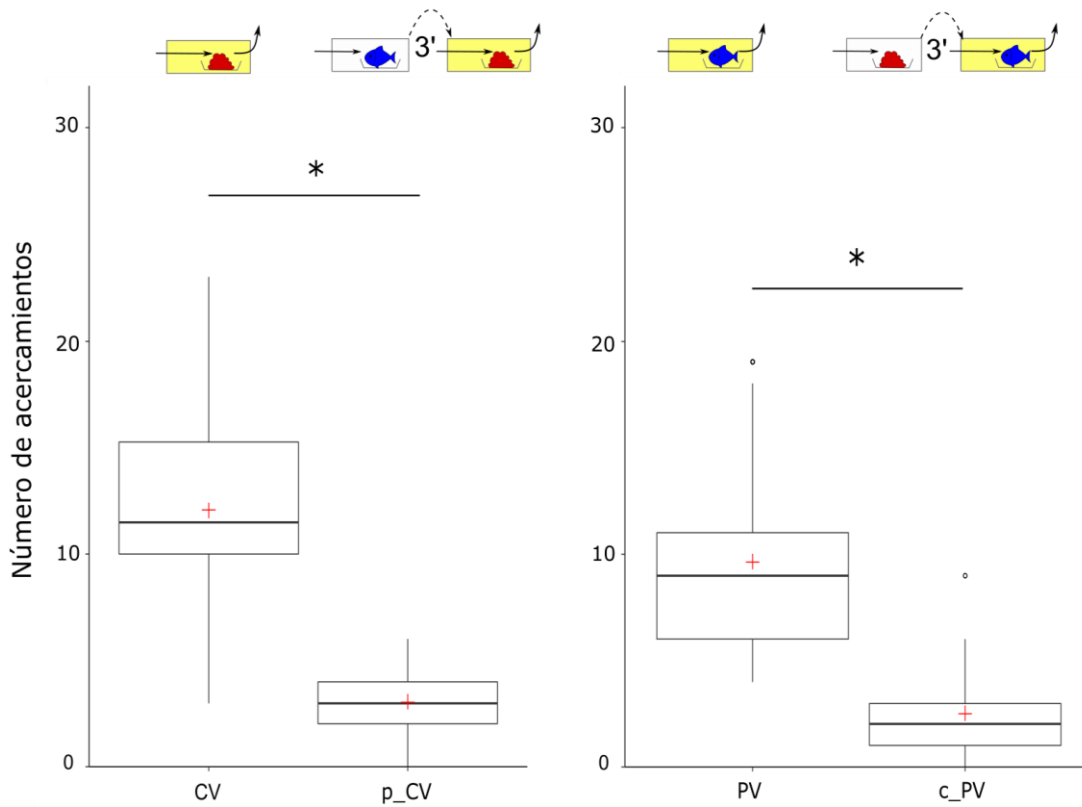


**Figura 6.** Respuesta de atracción al olor de vainilla en avispas que tuvieron un pre-encuentro antes de la visita completa. En el grupo CV las avispas tuvieron una visita completa en presencia de vainilla, sin pre-encuentro previo (control). En el grupo cv\_CV las avispas tuvieron una visita completa con vainilla luego de haber tenido un pre-encuentro con la fuente con vainilla. En el grupo c\_CV las avispas también tuvieron una visita completa con vainilla pero en este caso el pre-encuentro previo fue en ausencia de vainilla. En el grupo cv\_C las avispas tuvieron una visita completa en ausencia de vainilla luego de un pre-encuentro previo en presencia del olor. Finalmente, el grupo C las avispas tuvieron una visita completa en ausencia de vainilla sin pre-encuentro previo (control). La cruz roja dentro de cada box indica el valor de la media. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en el nivel de atracción al olor de vainilla solo, evaluado en términos de número total de acercamientos hechos hacia el papel filtro impregnado con vainilla ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figura 7.** Respuesta de atracción al olor de vainilla en avispas que tuvieron un pre-encuentro 24 h antes de la visita completa. En el grupo CV las avispas tuvieron una visita completa en presencia de vainilla sin pre-encuentro previo (control +). En el grupo cv\_CV las avispas tuvieron una visita completa con vainilla 24 h después de haber tenido un pre-encuentro con la fuente con vainilla. En el grupo c\_CV las avispas tuvieron una visita completa con vainilla 24 h después de haber tenido un pre-encuentro con una fuente sin vainilla. La respuesta de atracción fue evaluada en términos del número total de acercamientos hechos hacia el papel de filtro impregnado con vainilla. Los datos se representan en mediana, cuartiles y valores alejados. La cruz roja dentro de cada box indica el valor de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas en el nivel de respuesta al olor de vainilla entre cada tratamiento y el control ( $\alpha = 0,05$ ).





**Figura 8.** Respuesta de atracción al olor de vainilla en avispas que tuvieron un pre-encuentro antes de la visita completa con un recurso diferente. En el grupo CV las avispas tuvieron una visita completa a una fuente de carne vacuna con vainilla, sin pre-encuentro previo. En el grupo p\_CV las avispas tuvieron una visita completa a una fuente con carne y vainilla pero luego de haber tenido un pre-encuentro con una fuente de pescado en ausencia de vainilla. En el grupo PV las avispas tuvieron una visita completa con una fuente de pescado con vainilla, sin pre-encuentro previo. En el grupo c\_PV las avispas tuvieron una visita completa a una fuente con pescado con vainilla pero luego de haber tenido un pre-encuentro con una fuente de carne en ausencia de vainilla. La respuesta de atracción fue evaluada en términos del número total de acercamientos realizados hacia el papel filtro impregnado con vainilla. Los datos se representan en mediana, cuartiles y valores alejados. La cruz roja dentro de cada box indica el valor de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas en el nivel de respuesta al olor de vainilla entre cada tratamiento y el control ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4. Discusión

Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales de este capítulo y en el contexto específico de forrajeo de carroña, revelan que la primera experiencia de las avispas con una

fuente de alimento puede modular el posterior aprendizaje de una clave olfativa nueva. Si bien las avispas fueron capaces de aprender a asociar un olor con la fuente de alimento en todas las visitas de forrajeo, la fuerza de la asociación decreció considerablemente luego de la primera visita. Al analizar el rol del olor en las diferentes etapas dentro de la primera visita, encontré que la presencia de vainilla durante la etapa de encuentro con el alimento (i.e., el momento en el que la avispa se aproxima a la fuente y aterriza sobre ella) es crucial para se produzca la asociación. Sin embargo, cuando se agregó un pre-encuentro anterior a la visita completa, observé el primer encuentro de la avispa con el recurso pareció ser determinante en la posterior asociación del olor durante la visita completa. Esto sugiere que la primera experiencia con el recurso puede modular el aprendizaje de una clave olfativa novedosa, curiosamente, aunque ésta no haya implicado la recolección y traslado del alimento al nido. Si bien un encuentro aislado con la fuente no fue suficiente para el establecimiento de la asociación, sí fue suficiente para modular el posterior aprendizaje del estímulo olfativo. Este hallazgo constituye el primer reporte sobre la importancia de este tipo de experiencia sin recolección en los procesos de aprendizaje de *V. germanica*. Este estudio demuestra que una simple presentación estímulo-recompensa, en una misma contigüidad temporal y sin modificar la concentración del olor, la cantidad/calidad de la recompensa o el número de experiencias recompensadas, puede dar lugar a memorias asociativas cuya robustez dependen del momento en que el olor fue experimentado.

La teoría indica que el aprendizaje asociativo depende de la discrepancia entre la ocurrencia de la recompensa y su predicción, es decir, que ocurrirá aprendizaje cuando la recompensa no sea perfectamente predicha por el estímulo condicionado (Schultz 2009). El efecto de bloqueo propuesto por Kamin (1969) se basa en cierta forma en esta discrepancia, ya que predice que el aprendizaje de nuevas características luego de un aprendizaje inicial será reducido o nulo, a menos que esta nueva característica introduzca algún grado de novedad. Un efecto de bloqueo fue reportado recientemente por Moreyra y colaboradores (2020) en relación al aprendizaje de claves visuales novedosas. Estas autoras demostraron que

la primera visita de recolección interfiere con la asociación de una nueva clave durante la segunda visita. Aquí, observé que el primer episodio de aprendizaje, que tuvo lugar durante la primera visita, interfirió con el aprendizaje de un estímulo olfativo añadido durante las visitas posteriores. Este hallazgo es consistente con un efecto de bloqueo dado por el contexto actuando como estímulo condicionado durante el primer episodio de aprendizaje (Shettleworth 2010; Griffin et al. 2016). Cuando el olor estuvo presente durante la primera y única visita ([claves contextuales + olor -> alimento]), se observó una memoria asociativa robusta. Cuando el olor estuvo ausente durante la primera visita ([claves contextuales -> alimento]) la respuesta condicionada fue nula. Sin embargo, cuando el olor fue introducido en la segunda visita (1ra visita: [claves contextuales -> alimento], 2da visita: [claves contextuales + olor -> alimento]) hubo un aprendizaje del olor, pero el nivel de respuesta fue menor al observado cuando el olor fue presentado en la primera visita (Fig. 4). Así, este aprendizaje contextual durante la primera visita de forrajeo puede bloquear la asociación de claves nuevas que no incorporaron cambios suficientemente novedosos en el escenario de forrajeo.

Si la reducción en el aprendizaje de una clave olfativa luego del aprendizaje inicial se debiese a un efecto de bloqueo, la introducción de cierto grado de novedad en el escenario de forrajeo podría favorecer el aprendizaje del olor novedoso (Shettleworth 2010). Cuando la adición del olor durante la segunda visita fue acompañada de un desplazamiento de la fuente de alimento (2.35 m del lugar inicial), la adición de ese cambio contextual no se tradujo en un incremento de la fuerza de la asociación (Fig. 4). Es probable que este cambio no haya sido lo suficientemente novedoso o significativo para favorecer el aprendizaje del olor durante la segunda visita. Un estudio previo en *V. germanica* demostró que el número de vuelos de aprendizaje se incrementó luego de que la fuente de alimento hubiera sido desplazada sólo 60 cm de su posición original (Moreyra et al. 2012), sugiriendo que las avispas son capaces de reconocer pequeños cambios contextuales ligados al desplazamiento de recursos. Por lo tanto, también es posible que, durante el contexto de relocalización de carroña, los cambios en claves olfativas del contexto sean menos salientes que los cambios en las claves

visuales/espaciales que indican la ubicación del alimento. También podría ocurrir que el debilitamiento de la asociación luego de la primera visita se deba, por ejemplo, a otro tipo de procesos cognitivos (por ej. cambios en la atención) y no a un efecto de bloqueo asociativo. Se necesitan nuevos estudios para dilucidar cuáles son los mecanismos fisiológicos y comportamentales que subyacen a este fenómeno.

Si bien los resultados obtenidos en este trabajo indican que el aprendizaje de una clave olfativa es mayor durante la primera visita, las avispas fueron capaces de aprender un estímulo olfativo novedoso en todas las visitas de forrajeo (Fig. 3 y 4). Los hallazgos obtenidos en el capítulo 3 corroboran que las avispas son capaces de reconocer estímulos olfativos en cada visita, ya que se observó que un mayor número de experiencias apetitivas en presencia del olor de lavanda promovieron una mayor respuesta de atracción hacia el olor solo y memorias olfativas más robustas que persistieron al menos 24h. Estudios previos en *V. germanica* revelaron un patrón similar en relación a claves visuales del contexto. En estos trabajos se demostró que el aprendizaje de claves contextuales novedosas decrece luego de la primera experiencia de recolección y que un mayor número de experiencias recompensadas se traduce en memorias espaciales más robustas (Lozada y D'Adamo 2006; Moreyra et al. 2016, 2020). También encontré que la fuerza de la asociación entre el olor y la recompensa no fue afectada por el número de experiencias previas en ausencia de olor, ya que el nivel de respuesta al olor fue similar entre las avispas que experimentaron el olor durante la segunda, tercera o quinta visita. La ausencia del olor durante la visita previa a la fase de prueba tampoco pareció interferir significativamente con respuesta al olor, ya que las avispas que tuvieron una primera visita con vainilla seguida y una visita en ausencia de este olor tuvieron un desempeño similar a aquéllas que tuvieron una única visita en presencia del olor. Además, la consistencia entre los hallazgos obtenidos al comparar la respuesta al olor entre avispas con diferente nivel de experiencia total (i.e., 1,3 y 5 visitas) y entre avispas con el mismo nivel de experiencia (2 visitas) me permitió excluir la influencia de este factor en la respuesta al olor solo.

Cuando examiné en detalle cómo se produce la asociación del olor durante la primera visita, encontré que la presencia de vainilla durante la etapa de encuentro con la fuente de alimento (i.e., el lapso desde que la avispa se aproxima a la fuente hasta que aterriza sobre ella) es crucial en se establezca la asociación; sin embargo, la presencia del olor durante el resto de la visita (i.e., etapa de recolección) parece no jugar un papel relevante en el aprendizaje del olor. Cuando el olor estuvo presente durante la visita completa (i.e., encuentro y recolección) la fuerza de la asociación fue similar a la observada cuando el olor estuvo presente solamente durante la etapa de encuentro, es decir, cuando fue removido antes de que la avispa comenzara a recolectar carne (Fig. 5). ¿Podría el olor haber continuado estando presente luego de la remoción del papel filtro con vainilla, por ejemplo, al haberse impregnado en el recurso? Al evaluar el tratamiento de vainilla impregnada (CV[e+r]impreg) encontré que la respuesta condicionada al olor fue apenas significativa y muy similar a la observada cuando la visita completa ocurrió en ausencia total de vainilla. Por lo tanto, aunque el olor hubiera quedado parcialmente impregnado en el recurso, resulta poco probable que hubiera tenido la saliencia suficiente como para promover una asociación fuerte. La irrelevancia del olor durante la etapa de recolección del alimento también se observó en el experimento en el que el olor fue añadido luego del aterrizaje de la avispa, ya que la respuesta condicionada a la vainilla fue muy baja. Aunque la presencia del olor durante la etapa de recolección pareció ser irrelevante, la acción de manipular y llevar el alimento al nido parece ser indispensable para que se produzca el aprendizaje del olor. Cuando la avispa se encontró con la fuente de alimento con el olor pero se impidió que recolectara alimento mediante la remoción de la estación de alimentación, la memoria de olor fue muy débil. Por lo tanto, la presencia del olor durante el encuentro y la acción de recolectar alimento exitosamente, parecen ser eventos imprescindibles para promover una asociación robusta del olor. Debido a que no fue el objetivo de este estudio, no analicé el rol de la manipulación del alimento y del traslado al nido por separado, lo cual sería una pregunta interesante a evaluar en futuros estudios a fin de elucidar en cuál de estas acciones constituyen la “recompensa”.

La adición de un pre-encuentro antes de la visita completa reveló que el primer encuentro de la avispa con la fuente de alimento puede modular el posterior aprendizaje de un olor nuevo. En estos experimentos se observó que un primer encuentro aislado con la fuente de alimento fue suficiente para interferir con la asociación de un olor durante la visita completa. Cuando se evaluó la respuesta a olor en avispas que tuvieron una visita completa (i.e., encuentro + recolección) en presencia del olor pero luego de haber experimentado un pre-encuentro con la fuente de alimento, observé que la fuerza de asociación varió considerablemente dependiendo de la presencia o ausencia del olor durante ese pre-encuentro (Fig. 6). Cuando el pre-encuentro y la visita completa fueron en presencia de vainilla (grupo cv\_CV), se observó una asociación fuerte y similar a la observada en avispas que no tuvieron pre-encuentro previo (grupo CV). Sin embargo, cuando olor estuvo ausente durante el pre-encuentro pero estuvo presente en la visita completa (grupo c\_CV), la memoria asociativa del olor fue débil. Esto es interesante, ya que en ambos casos las avispas tuvieron la misma visita completa en presencia del olor, sin embargo, la fuerza de la asociación resultante cambió considerablemente dependiendo de la presencia/ausencia del olor durante el breve primer encuentro.

Los experimentos en los que se agregó un pre-encuentro antes de la visita completa muestran que el primer encuentro con el alimento es crucial en el posterior aprendizaje del olor, curiosamente, aunque esta experiencia no haya involucrado la recolección de alimento. Interesantemente, esta primera experiencia no involucró un evento de recolección, ya que sólo abarcó el lapso desde que la avispa se acercó a la fuente por primera vez hasta que aterrizó sobre ella. Este hallazgo resulta interesante ya que, hasta el momento, la evaluación de aprendizaje en el contexto de forrajeo de carroña en *Vespula* spp. se ha llevado a cabo luego de al menos un evento de recolección exitoso (Lozada y D'Adamo 2014). En este caso, un simple encuentro aislado con el recurso fue suficiente para modular drásticamente la subsecuente asociación del olor. Esto sugiere que esta breve experiencia con el alimento, aunque no haya implicado la acción de recolectar y trasladar alimento al nido, generó una

memoria del contexto que es la que posteriormente interfirió en el aprendizaje. Incluso, durante el trabajo de campo observé que cuando avispas sin experiencia aterrizan sobre una fuente de alimento que luego es removida, permanecen durante un cierto tiempo frecuentando el lugar donde se encontraba el alimento (observación personal). Sin embargo, al no involucrar recolección exitosa ni vuelos de aprendizaje, es probable que esta memoria persista sólo en el corto plazo. Cuando el intervalo entre el pre-encuentro y la visita completa se amplió a 24 h (grupo cv\_CV24h y grupo c\_CV24h) el nivel de respuesta al olor fue similar a cuando no hubo pre-encuentro previo (grupo CV), independientemente de la presencia/ausencia del olor durante el pre-encuentro (Fig. 7). Esto corrobora que la memoria del pre-encuentro es una memoria de corta duración; no obstante, sería interesante evaluar intervalos más breves de tipo (e.g., 1, 3 o 6 h) para determinar con mayor exactitud tiempo de extinción.

Si bien un encuentro aislado con el alimento parece ser suficiente para interferir con el posterior aprendizaje de un olor novedoso, los experimentos sugieren que esta experiencia por sí sola no es suficiente para que se produzca la asociación entre el olor y la recompensa. Cuando se permitió que una avispa se encuentre con una fuente de alimento con vainilla pero luego se le impidió que recolecte alimento mediante la remoción del alimentador, observé la memoria del olor fue muy débil. El mismo patrón se observó en el experimento con pre-encuentro. Cuando un pre-encuentro en presencia del olor fue seguido por una visita completa sin el olor, el aprendizaje del olor también fue muy reducido. Esto indica que la experiencia de recolectar alimento y su posterior traslado al nido es necesaria para que se establezca la asociación.

Al analizar los resultados de las diferentes combinaciones entre pre-encuentro y visita completa, el único caso en que se observó una memoria robusta del olor similar a la observada en el control + (grupo CV) fue cuando ambos encuentros ocurrieron en presencia del olor. Por el contrario, cuando el olor estuvo presente sólo durante uno de los encuentros (ya sea el primero o el segundo) la fuerza de la asociación resultante fue muy débil. En otras

palabras, la asociación exitosa del olor se produjo sólo cuando hubo una consistencia en la presencia de olor en ambos encuentros. Esto indica que las avispas fueron capaces de reconocer el olor en cada uno de los encuentros y reafirma que el primer encuentro con el alimento (aunque no haya involucrado recolección) promueve una memoria de corto plazo del contexto. Estos hallazgos demuestran que el aprendizaje de claves olfativas en *V. germanica* es complejo y que la presentación pareada de dos estímulos no es suficiente para que se produzca el aprendizaje del olor.

Los resultados de los experimentos en los que se agregó un pre-encuentro previo a la visita completa indican que las avispas fueron capaces de reconocer el olor tanto en el primer encuentro como en el segundo. Sin embargo, ¿podría la remoción/reinserción del alimento haber provocado algún efecto negativo en el comportamiento de forrajeo? Por un lado, la desaparición/aparición del alimento son eventos frecuentes durante la explotación de carroña en su ambiente natural. Por otro lado, tampoco encontré evidencia de que la remoción y posterior reinserción de la estación de alimentación tuviera algún efecto disruptivo en el comportamiento de las avispas, ya que todas ellas retornaron a la fuente luego de haber sido reinstalada. Tampoco observé efectos negativos en el desempeño de las avispas durante el aprendizaje del olor, ya que las avispas que tuvieron un primer encuentro con la fuente con vainilla seguido de una visita completa (i.e., encuentro y recolección) a la misma fuente (cv\_CV) mostraron un nivel de respuesta similar a la observado en avispas que no experimentaron un pre-encuentro previo (CV). Otra pregunta válida es si el segundo encuentro fue similar al primero en cuanto a la percepción del olor. Durante el entrenamiento observé que, durante los 3 minutos en los cuales la fuente de alimento no estuvo disponible, la mayoría de las avispas abandonaron al área experimental y luego retornaron cuando la estación de alimentación fue reinsertada, por lo que podría considerarse como un nuevo evento de encuentro. Por otra parte, si el olor hubiera sido menos percibido durante el segundo encuentro, las avispas que experimentaron ambos encuentros en presencia de vainilla, deberían haber exhibido una respuesta condicionada débil, similar a la observada en



el grupo que tuvo el pre-encuentro con vainilla seguido de una visita completa en ausencia de olor. Sin embargo, en el primer caso se observó un alto nivel de respuesta mientras que en el segundo la respuesta al olor fue muy baja. Por lo tanto, los resultados sugieren que las diferencias observadas entre tratamientos se deben al tipo de experiencia y no a una falta de detección del olor durante el segundo encuentro.

Los cambios en los escenarios de forrajeo son comunes para las forrajeras de *V. germanica*. Además de la modificación de claves del entorno (e.g., por desplazamiento de la fuente de alimento), también pueden ocurrir cambios en las características del recurso. Por ese motivo, además de la modificación de claves visuales contextuales, también analicé si el aprendizaje de un olor novedoso puede ser favorecido si va acompañado de un cambio en el tipo de recurso. Similar a lo que se observó cuando se analizó el rol del desplazamiento del alimento (Fig. 4), la sustitución del recurso durante el segundo encuentro con la fuente tampoco provocó un aumento en la respuesta condicionada al olor. Interesantemente, la carne de pescado mostró una fuerza asociativa similar a la de la carne vacuna cuando se evaluó la respuesta de las avispas luego de una visita completa (i.e., encuentro + recolección) en presencia del olor (Fig. 8). No obstante, cuando la visita completa con carne vacuna y en presencia de vainilla ocurrió luego de un pre-encuentro con pescado y ausencia de olor (grupo p\_CV), la memoria del olor fue muy débil. El mismo patrón se observó en el tratamiento recíproco (grupo c\_PV). El hecho de que ninguno de los dos tipos de cambios contextuales aplicados en este trabajo hayan favorecido el aprendizaje del olor novedoso podría estar relacionado a la significancia de esos cambios para la avispa. Es posible que estos cambios no hayan introducido la novedad suficiente para promover un mayor aprendizaje del olor debido a que ambos fueron relativamente puntuales comparados a la complejidad de estímulos del contexto. Futuros estudios podrían profundizar en el rol de la introducción de cambios contextuales en el aprendizaje de estímulos olfativos durante la relocalización del alimento, por ejemplo, aplicando modificaciones a mayor escala o modificando un mayor número de claves del entorno.

La mayor relevancia de la primera experiencia durante el aprendizaje de claves del contexto adquiere sentido si se tiene en cuenta que es precisamente durante el primer encuentro con la nueva fuente de alimento cuando se produce el aprendizaje de las claves que luego guiarán el retorno de la avispa. La carroña, típicamente, puede ser considerada como una fuente estacionaria espacio-temporalmente y cuyo hallazgo por parte de las forrajeras puede ser considerado como un evento inesperado. La importancia de la novedad en la cognición animal ha sido resaltada a lo largo de las décadas por numerosos estudios (e.g., Kamin 1969; Tulving 2007; Barto et al. 2013; Schomaker 2019). Los eventos inesperados a menudo pueden favorecer la percepción y la motivación, el aprendizaje y la memoria (Schomaker y Meeter 2015). Es probable que el primer encuentro del animal con la nueva fuente presente una mayor “novedad” que los subsiguientes, provocando que la saliencia de los estímulos del entorno sea mayor durante ese encuentro. No obstante, el diseño experimental utilizado aquí no me permite dilucidar los mecanismos fisiológicos detrás de este fenómeno, para lo cual son necesarios nuevos estudios en los que se utilicen protocolos estandarizados para probar estas hipótesis.

El hecho de que el aprendizaje asociativo de olores a lo largo del forrajeo sea variable y que dependa fuertemente del momento en el cual la avispa experimenta el olor (i.e., localización o relocalización del alimento), resalta la importancia del estudio del comportamiento en un escenario natural de forrajeo. En ciertos casos, el ambiente natural puede proporcionar un escenario ideal para el estudio de factores que modulan el aprendizaje pero que emergen del comportamiento del animal en su contexto habitual de forrajeo, como en el caso de este estudio en particular. Por lo tanto, es posible que el fenómeno observado aquí haya sido más difícil de detectar en condiciones de laboratorio, que en general involucran la captura de animales que luego se desenvuelven en un ambiente artificial que difiere considerablemente de su ambiente natural. Además, los resultados de los diferentes conjuntos de experimentos muestran que el análisis de la frecuencia de acercamientos a la fuente de olor como un estimador de la fuerza de la memoria asociativa de un olor constituye

una metodología útil y sensible para estudiar variaciones en la fuerza de una asociación olor-alimento, como se observó en el capítulo 3.

Los hallazgos obtenidos en este estudio denotan la gran plasticidad comportamental de las avispas de *V. germanica* y aportan nueva evidencia a favor de la hipótesis de que la primera experiencia tiene un rol preponderante en los procesos de aprendizaje de estas avispas. Por un lado, los resultados sugieren que las forrajeras tienen la habilidad de formar memorias asociativas de diferente robustez dependiendo del grado de novedad percibida por la avispa. Si bien encontré que el primer episodio de aprendizaje interfiere con el posterior aprendizaje de claves olfativas, los resultados también indican que las avispas son permeables a percibir y aprender estímulos olfativos novedosos a lo largo de todo el forrajeo. Esto sugiere que las forrajeras serían capaces de re-evaluar el escenario de forrajeo en cada visita a la fuente de alimento. Este hallazgo es relevante ya que ayuda a comprender cómo estas avispas lidian con cambios contextuales durante la relocalización de fuentes de carroña, por ejemplo, la aparición/desaparición de claves asociadas al alimento. En conclusión, este estudio contribuye a un mejor entendimiento sobre los factores que modulan el aprendizaje olfativo en *V. germanica* y también destaca la importancia del estudio del comportamiento en contextos naturales como un enfoque necesario para mejorar nuestra comprensión de la complejidad que subyace durante el comportamiento de forrajeo de estas avispas sociales.

# Capítulo 6

## Discusión general y conclusiones

---

Los estímulos olfativos tienen un rol central en la percepción del mundo y guían múltiples aspectos de la vida de un animal, como el forrajeo. Sin embargo, en un ambiente que está en constante cambio, los insectos sociales deben ser capaces de ser flexibles y de modificar sus respuestas comportamentales de acuerdo a las particularidades de la situación. La plasticidad comportamental dada por el aprendizaje permite a los animales modificar su comportamiento en respuesta a cambios del ambiente. En esta tesis investigué cómo las avispas eusociales de *V. germanica* usan claves olfativas durante la búsqueda del alimento y cómo la experiencia individual puede influir en la respuesta hacia los olores. Los resultados obtenidos a lo largo de los diferentes capítulos pueden ser interpretados desde diferentes puntos de vista. A continuación, se discutirán los hallazgos que considero más relevantes desde el punto de vista del comportamiento de avispas eusociales, sus implicancias desde un punto de vista aplicado y también las ventajas, desafíos y dificultades del estudio de comportamiento en condiciones de campo.

### **1. Aportes al conocimiento de la plasticidad comportamental de avispas eusociales**

La mayoría de los estudios sobre las habilidades cognitivas de himenópteros se han llevado a cabo en organismos modelo como *Apis mellifera* y en menor medida en otros grupos, como abejorros, hormigas y avispas parasitoides, debido en parte al rol que desempeñan en los ecosistemas como polinizadores, plagas de la agricultura o controladores biológicos (e.g., Dukas y Duan 2000; Giurfa 2007, 2015; Carcaud et al. 2009; Josens et al. 2009; Arenas y Farina 2012; Benelli et al. 2014; Jones et al. 2015). A pesar de su rol ecológico y como plaga

en muchos de los ecosistemas invadidos, las avispas eusociales han recibido considerablemente menos atención y en la actualidad se sabe muy poco sobre su plasticidad comportamental en relación a estímulos olfativo. Al tener un rol saliente como especie plaga, la mayoría de los estudios en *Vespula* spp. se han llevado a cabo con fines de control y manejo, dejando de lado el estudio de aspectos claves de su comportamiento de forrajeo.

Los resultados obtenidos a lo largo de los capítulos de esta tesis brindan nuevo conocimiento sobre aspectos relevantes de su comportamiento del forrajeo de *V. germanica* y sobre las habilidades de aprendizaje y memoria de esta especie eusocial, que hasta el momento permanecían inexplorados. Encontré que el rol de los estímulos olfativos durante la búsqueda del alimento en *V. germanica* está influenciado fuertemente por la experiencia previa. Si bien estudios previos han demostrado que el aprendizaje espacial parece tener un rol primario durante la relocalización de una fuente de carroña (e.g., D'Adamo y Lozada 2007, 2008, 2011, 2014; Lozada y D'Adamo 2014), en esta tesis se ha descubierto que las claves olfativas no solo desempeñan un rol importante en el hallazgo de nuevas fuentes de alimento, sino también durante su relocalización.

Los hallazgos derivados de esta tesis también profundizan sobre aprendizaje asociativo de estímulos olfativos durante la explotación de fuentes de carroña, un campo de estudio que ha sido poco explorado en avispas eusociales. Hasta el momento, son muy pocos los estudios que han evaluado el aprendizaje de claves olfativas, y los pocos trabajos que se llevaron a cabo en esta área (casi en paralelo al desarrollo de esta tesis), lo han realizado en un contexto de forrajeo de carbohidratos (El-Sayed et al. 2018; Gong et al. 2019). Como se explicó en el capítulo 1, las proteínas, a diferencia de los carbohidratos, son recolectadas y trasladadas al nido donde finalmente son procesadas como alimento primario para las larvas en desarrollo (Edwards 1980). Aquí encontré que las avispas pueden aprender a asociar olores con recompensas basadas en proteínas, como carne vacuna y pescado (capítulos 3 y 5). Similar a lo que se demostró durante el aprendizaje de claves visuales contextuales, *V. germanica* exhibe un aprendizaje rápido de claves olfativas, ya que las forrajeras demostraron

ser capaces de formar asociaciones entre un olor y una recompensa proteica luego de una sola visita de recolección (capítulos 3 y 5). El aprendizaje luego de una simple experiencia apetitiva parece ser una característica de esta especie durante el forrajeo de carroña y podría estar ligado a la naturaleza impredecible del recurso (Lozada y D'Adamo 2014). No obstante, los resultados indican que una sola visita recolección promueve memorias olfativas que persisten sólo en el corto plazo (capítulo 3). Similar a lo que se observó durante el aprendizaje espacial (Moreyra et al. 2017), observé que las forrajeras pueden formar memorias olfativas más robustas que pueden ser evocadas luego de 24 h, como se ha demostrado en avispones, *Vespa velutina* (Gong et al. 2019) y en poblaciones naturales de *Vespula* spp. en Nueva Zelanda (El-Sayed et al. 2018).

Otro resultado relevante derivado de esta tesis es que la experiencia apetitiva puede modificar sustancialmente el significado comportamental de ciertos estímulos olfativos. Encontré que el aprendizaje asociativo puede conducir a que un estímulo olfativo neutro adquiriera relevancia comportamental para la avispa el volverse un predictor de la presencia del alimento, como ocurrió en el caso del olor de vainilla (capítulo 5). Más radicalmente, un olor que inicialmente desencadenaba una respuesta espontánea de evitación puede volverse atractivo luego de la experiencia apetitiva en presencia de dicho olor, como ocurrió en el caso del olor de lavanda (capítulo 3). Estos cambios en la valencia de un estímulo olfativo como resultado de simples mecanismos asociativos también han sido reportados en otros insectos, tanto en contextos apetitivos como aversivos (e.g., Benelli et al. 2014; Vinauger et al. 2014; Mengoni et al. 2017).

Interesantemente, el hecho de que estos experimentos hayan sido llevados a cabo en el contexto natural de forrajeo de *V. germanica*, hizo que fuera posible evaluar el impacto de del aprendizaje asociativo den un olor en los procesos de toma de decisiones. Encontré que las avispas experimentadas confían fuertemente en claves olfativas aprendidas para decidir qué recursos explotar (capítulo 3 y 5). Además de guiar las decisiones de forrajeo en el corto plazo (i.e., inmediatamente luego de finalizada la sesión de entrenamiento), los resultados

indican que las claves olfativas aprendidas también pueden guiar la búsqueda de alimento incluso 24 h después de la experiencia con el olor, tal como se observó en el capítulo 3 cuando la sola presencia del olor aprendido incrementó la tasa de retorno de las avispas al sitio donde habían recolectado alimento 24 h antes. Otro aspecto interesante que revela el capítulo 3 es que una asociación olor-alimento que se estableció con proteína como recompensa puede ser generalizada a un recurso diferente y menos atractivo. En ese experimento observé que la presencia de un olor que fue asociado con una fuente carroña desencadenó respuestas de consumo de una solución de sacarosa. Esto sugiere que las memorias olfativas son un componente central en el comportamiento de forrajeo de estas avispas y que el aprendizaje puede moldear la explotación de recursos.

Si bien en el capítulo 3 se demostró que las claves olfativas aprendidas tienen un rol guiando a las avispas hacia fuentes de alimento, cuando se evaluó su importancia en relación a claves visuales del contexto previamente aprendidas, encontré que los olores parecen ser irrelevantes en guiar a las avispas durante su retorno a la fuente de alimento. Si bien esta aparente irrelevancia de las claves olfativas durante la relocalización del alimento ya había sido sugerida en estudios previos en *V. germanica* (e.g., Lozada y D'Adamo 2014; Moreyra et al. 2018), en esta tesis trabajé con olores que aluden diferentes contextos olfativos lo que me permitió evaluar el rol de las claves olfativas independientemente del tipo de clave involucrada (capítulo 4). Sin embargo, aunque los olores no sean usados para retornar a la fuente de alimento, los resultados obtenidos en los capítulos 3 y 5 indican que las avispas son capaces de detectar y aprender estímulos olfativos mientras retornan a una fuente de alimento estacionaria. En el capítulo 3 se encontró que la presencia de olor a lo largo de visitas sucesivas promueve el refuerzo de la asociación. Esto también se evidenció en el capítulo 5, ya que las avispas fueron capaces de percibir la adición de un olor novedoso entre visitas consecutivas. Esto sugiere que, aunque los olores no tengan un rol guiando a las avispas durante su retorno a la fuente de alimento, el hecho de que sean detectados y aprendidos sugiere que sí tienen una importancia durante la relocalización del alimento.

Otro hallazgo relevante de este trabajo surge de evaluar el rol de la experiencia previa en el aprendizaje de claves olfativas novedosas, i.e., un olor que es introducido luego de un aprendizaje inicial con la fuente de alimento en un contexto determinado. Cuando una nueva fuente de carroña es descubierta, el aprendizaje inicial de claves contextuales resulta crucial para garantizar el retorno de la avispa a la fuente. La importancia de una sola experiencia de recolección en los procesos cognitivos de *V. germanica* ha sido destacada por numerosos estudios previos, y recientemente se ha demostrado que la primera experiencia en particular puede afectar el aprendizaje de claves visuales del contexto (Moreyra et al. 2020). En el capítulo 5 encontré que la primera experiencia con la fuente de alimento dificulta el aprendizaje de un olor durante las visitas subsiguientes. Este efecto de la primera experiencia, que en general ha sido poco explorado en insectos sociales, puede ser explicado por un efecto de bloqueo dado por el contexto (Shettleworth 2010). Curiosamente, el primer encuentro con la fuente pareció ser suficiente para interferir con el aprendizaje posterior de un olor, lo cual sugiere que la memoria que resulta de esa “impregnación”, aunque sea de corta duración, implica un aprendizaje del contexto sin que necesariamente ocurra un evento de recolección del alimento. Este es un hallazgo novedoso que tiene posibles implicancias para futuros estudios de comportamiento en esta especie, ya que un simple encuentro aislado con una fuente de alimento en un contexto particular puede afectar el posterior desempeño de la avispa. La importancia de este tipo de experiencia breve sin recolección exitosa de alimento, permanecía ignorado hasta el momento.

Desde mi punto de vista, estos hallazgos constituyen un aporte valioso al conocimiento de las habilidades cognitivas de avispas eusociales y el rol de los estímulos olfativos en el forrajeo de carroña. Estos hallazgos demuestran que la importancia de los olores en guiar el comportamiento de las forrajeras es sumamente variable y depende de la “situación” con que las avispas deben lidiar. Se ha sugerido que la plasticidad comportamental es un atributo clave de especies que logran prosperar en ambientes periurbanos y urbanos altamente intervenidos por el ser humano (Griffin et al. 2016; Barrett et



al. 2018). Los mecanismos asociativos que subyacen en la mayoría de los hallazgos reportados en esta tesis, como el aprendizaje olfativo y el aprendizaje contextual, demuestran que simples experiencias apetitivas pueden moldear la explotación de recursos y ayudar a las avispas a lidiar con escenarios cambiantes.

## **2. Implicancias para el manejo de esta especie exótica invasora**

En Argentina, *V. germanica* reviste carácter de plaga, causando impactos tangibles en actividades económicas como la apicultura y también en ambientes urbanos y periurbanos donde entra en conflicto con las personas debido a sus hábitos carroñeros pudiendo provocar daños severos debido a su potente picadura (Beggs 2011). Debido a que sus poblaciones ya se encuentran establecidas en la Patagonia, los esfuerzos de investigación en esta especie están abocados a su manejo con el propósito de desarrollar nuevas estrategias de manejo que permitan mitigar sus impactos. Si bien no fue objetivo de esta tesis evaluar herramientas de manejo, considero que los hallazgos de este trabajo son un aporte valioso para la comprensión del comportamiento de forrajeo de estas avispas y que podrían ayudar a optimizar las estrategias de manejo empleadas en la actualidad y al desarrollo de nuevas herramientas de bajo impacto para el ambiente.

En el capítulo 2 se evaluó el efecto de repelentes a base de compuestos vegetales en el comportamiento de forrajeo de las avispas, encontrando resultados prometedores. Tanto el aceite esencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*), como el del paico (*Dysphania multifida*) y su componente activo, el alfa-terpineno, demostraron tener potencial para disuadir el forrajeo de estas avispas en las inmediaciones de un recurso proteico, incluso cuando ocurre comunicación social en el recurso (i.e., incremento local) y en el nido (reclutamiento en nido). Incluso, el aceite esencial de lavanda demostró ser eficaz en prevenir los ataques de estas avispas en la piquera de colmenas de *A. mellifera*. Estos resultados sugieren que los repelentes pueden ser una estrategia prometedora para disminuir el impacto de las avispas en

las colmenas y que además tiene la ventaja de poseer baja toxicidad para el ambiente. Si bien cabe destacar que este estudio es muy preliminar, constituye el primer paso para comenzar a evaluar herramientas alternativas de manejo amigables con al ambiente que complementen a las usadas en la actualidad para el manejo de las poblaciones de *V. germanica*, como los cebos tóxicos, la eliminación de los nidos o las trampas cebadas. Entre las estrategias más prometedoras en la que se podría incluir el uso de repelentes, se encuentra los escenarios “push-pull” (capítulo 1, Cook et al. 2007). Así, los repelentes podrían ser combinados con trampas cebadas con feromonas, como por ejemplo heptil butirato (Buteler et al. 2017) con el fin de mantener a las avispa alejadas de los recursos a proteger al mismo tiempo que son redirigidas hacia trampas donde son capturadas y finalmente removidas.

Además de las ventajas del uso de estos repelentes a base de aceites esenciales para el manejo de plagas, también poseen ciertas desventajas. Uno de los obstáculos más importantes a superar para el desarrollo de estrategias basadas en aceites esenciales o terpenos individuales, es controlar su alta volatilidad. El desarrollo de formulaciones que permitan potenciar y prolongar su efecto repelente podría ser una posible solución (Nerio et al. 2010; Maia y Moore 2011). Durante los experimentos en colmenas, se utilizó vaselina para retardar su evaporación y favorecer su liberación controlada. En la actualidad se han desarrollado técnicas como nano-encapsulación (Werdin González et al. 2014a, 2014b) o la impregnación en films de polímeros (Goñi et al. 2017; Herrera et al. 2017) que pueden ayudar a lidiar con estos obstáculos. Sin embargo, el uso de estas tecnologías en grandes cantidades puede resultar muy costoso. Sin embargo, debido a la creciente tendencia hacia el uso de compuestos de origen vegetal para el manejo de insectos plaga en la agricultura, es probable que estas tecnologías se vuelvan más accesibles con el tiempo. Otra desventaja de los aceites esenciales que se han evaluado hasta el momento en *V. germanica* (Buteler et al. 2016; capítulo 2) es que su radio de acción es corto, lo que implica que las avispa se aproximan a una distancia muy pequeña del recurso antes de ser disuadidas (capítulo 3). Por tal motivo

resulta fundamental continuar evaluando la actividad repelente de nuevos productos que tengan radio de acción de mayor alcance.

Los hallazgos obtenidos en los capítulos 3, 4 y 5 que muestran que la plasticidad comportamental de las avispas en relación a las claves olfativas, tienen implicancias para el uso potencial de los repelentes en el marco de estrategias de manejo. En el capítulo 3 se encontró que las avispas que lograron aterrizar y recolectar alimento de la fuente tratada con olor de lavanda, continuaron retornando a la fuente de alimento y forrajearon normalmente debido a que el olor se volvió una clave atrayente como resultado del aprendizaje asociativo. Además, la asociación del olor resultó en memorias olfativas de largo plazo que guiaron la búsqueda de recursos incluso 24 h luego de la experiencia apetitiva. Sin embargo, como se observó en los capítulos 2 y 3, el porcentaje de avispas que logró traspasar la barrera del repelente y aterrizar en los cebos tratados fue muy bajo (en general  $< 10\%$ ). En este escenario, resulta poco probable que el aprendizaje pueda tener un efecto considerable en la eficacia de un repelente. Sin embargo, si la cantidad de avispas que logran recolectar alimento en fuentes tratadas se incrementa, es posible que el aprendizaje sí ocasione una disminución significativa en la eficacia del repelente, ya que el olor no solo dejaría de ser aversivo sino que también podía atraer a las avispas hacia recursos, generando un efecto contrario al deseado. Sumado a esto, hay que tener en cuenta que las claves olfativas relacionadas a los recursos también pueden mediar procesos de comunicación en el nido y, por lo tanto, promover una respuesta colectiva a fuentes de alimento con el mismo olor. Por lo tanto, trabajar con dosis de compuestos repelentes que desencadenen una respuesta de evitación en la mayoría de las avispas resulta crucial para prevenir una posible disminución en la eficacia del repelente como resultado del aprendizaje. Otra herramienta que podría utilizarse sería la aplicación de compuestos disuasivos en el recurso a nivel del gusto y que interfieran con la recolección del alimento una vez que el insecto arribó al recurso (Foster y Harris 1997; Clapperton et al. 2012), como por ejemplo ciertos compuestos alcaloides como la quinina o la cafeína. Esta

opción podría reducir el número de avispas que logran recolectar alimento, sin embargo, se necesitan estudios para evaluar su potencial en un escenario real de manejo.

Teniendo en cuenta que es el comportamiento de forrajeo el que interfiere con las actividades humanas, los hallazgos obtenidos en relación a la plasticidad comportamental de *V. germanica*, también podrían resultar útiles para mejorar las estrategias actuales de manejo basadas en la manipulación de su comportamiento. Por ejemplo, la habilidad de formar memorias olfativas de largo plazo, el rol de estas memorias en las decisiones de forrajeo y la habilidad de generalizar asociaciones a recursos diferentes y menos apetitivos podría ser empleada para mejorar la eficacia de cebos con insecticida (Josens et al. 2016). Esto permitiría mejorar la eficacia de los cebos y al mismo tiempo disminuir la cantidad de insecticidas que ingresa al ambiente. Por otra parte, los hábitos carroñeros y oportunistas de estas avispas también interfieren con actividades humanas al aire libre, en campings o áreas recreacionales, sobre todo durante los meses de verano. Un mejor conocimiento sobre las habilidades de aprendizaje y memoria de estas avispas también podría brindar información útil a la población sobre cómo interactuar con estos insectos para disminuir las molestias causadas y sus potenciales perjuicios en la salud. Sin embargo, se necesita profundizar más en la plasticidad comportamental de estas avispas tener una mejor comprensión de su comportamiento de forrajeo que permita mitigar sus impactos.

### **3. Importancia del estudio del comportamiento “en situación”: ventajas, desafíos y problemas**

Para desarrollar una comprensión de la complejidad que involucra el estudio de la cognición animal, resulta esencial entender a los organismos como entidades que son inseparables de su entorno. Para ilustrar esto, presento una cita de Lewontin, R y de Varela, F:

*"...el organismo y el medio ambiente no se determinan por separado. El medio no es una estructura impuesta a los seres vivos desde afuera; en realidad, es una creación de esos seres. El medio no es un proceso autónomo, sino un reflejo de la biología de las especies. Así como no existe un organismo sin un medio, tampoco hay un medio sin un organismo"*

Richard Lewontin (1983)

*"... las especies generan y especifican su propio campo de problemas por 'resolver' y este campo no existe 'afuera', en un medio que operaría como cancha de aterrizaje para organismos que caen o se lanzan en paracaídas sobre el mundo. En lugar de eso, sucede que los seres vivientes y sus entornos se posicionan con relación a sí mismos a través de una especificación mutua o co-determinación."*

Francisco Varela (2000)

En línea con esta idea, en esta tesis me propuse resaltar el valor del estudio del comportamiento "en situación" como un complemento necesario a los estudios de laboratorio (Cuthill 1991). Por medio de diferentes tipos de experimentos a campo investigué el rol de las claves olfativas en el forrajeo y cómo la experiencia puede modular dicha respuesta en un contexto de forrajeo natural que refleje la complejidad de los escenarios con los cuales ellas deben lidiar habitualmente. Los diferentes aspectos del comportamiento que evalué a lo largo de la tesis corresponden a contextos frecuentes con los cuales las avispas se enfrentan día a día para conseguir el alimento, e.g., olores desagradables, aprendizaje de claves que predicen la presencia del alimento, aprendizaje contextual, cambios en la posición de alimentos, etc.

Muchos de los hallazgos obtenidos en esta tesis, si bien no habían sido reportados previamente en avispas eusociales, han sido objeto de estudio en otros insectos sociales por décadas como, por ejemplo, el aprendizaje asociativo de estímulos olfativos (para una revisión ver Giurfa 2015). Por ese motivo, en esta tesis me propuse no solo evaluar la importancia de los olores y la habilidad de las avispas de aprender claves olfativas, sino también como éstos pueden ser modulados por factores del contexto que son inseparables de la actividad de forrajeo y que emergen del comportamiento del animal en su contexto de forrajeo. El comportamiento de relocalización de carroña, que puede parecer una actividad simple, involucra numerosas habilidades cognitivas relacionadas principalmente con el

aprendizaje espacial y contextual (Lozada y D'Adamo 2014). Por lo tanto, para evaluar cómo los olores entran en juego en ese comportamiento es necesario hacerlo en un escenario en el cual los factores contextuales estén operando. En el capítulo 4 se mostró que el olfato constituye un mecanismo de orientación clave en el hallazgo de fuentes de alimento novedosas o de aquéllas que fueron accidentalmente desplazadas del lugar aprendido, pero parece ser irrelevante en guiar el retorno de las avispas a la fuente de alimento in situ. Esto indica que la memoria espacial de la ubicación del alimento puede interferir con el uso de claves olfativas. Por otra parte, en el capítulo 5 encontré que la primera experiencia apetitiva con la fuente de alimento en un lugar determinado puede interferir con la posterior asociación de una clave olfativa novedosa, sugiriendo que el aprendizaje inicial del contexto puede modular el aprendizaje de olores. Los resultados de ambos capítulos ilustran dos casos diferentes en los que la respuesta a estímulos olfativos puede ser modificadas por factores del contexto que pueden ser evaluados sólo en un escenario semejante al contexto natural de forrajeo.

El estudio del comportamiento en contextos naturales también permite evaluar el correlato de la plasticidad comportamental en la toma de decisiones. En el caso de esta tesis, evaluar cómo las avispas usan claves olfativas y en qué contextos son usadas me permitió evaluar el impacto que puede tener el aprendizaje en la explotación de recursos. En el capítulo 3 demostré que las avispas pueden aprender a asociar un olor (repelente) con carroña como recompensa alimenticia y que tres o más experiencias apetitivas pueden promover procesos de memoria de largo plazo. Los diferentes escenarios evaluados, como elección, no-elección, consumo de un recurso diferente, también me permitieron evaluar cómo los cambios en la respuesta al olor como resultado de la experiencia apetitiva se trasladaron a las decisiones de forrajeo.

El estudio a campo, por otro lado, también planteó desafíos desde el punto de vista metodológico. Los resultados obtenidos a lo largo de los diferentes capítulos muestran que es posible llevar a cabo experimentos “controlados” con estímulos olfativos en el campo. Los

experimentos se llevaron a cabo en ambientes semejantes entre sí, dentro de un rango de condiciones climáticas y con condiciones de viento leve a moderado, lo cual me permitió disminuir la variabilidad debido a los factores abióticos. Por otro lado, también tuve que trabajar con tamaños de muestra relativamente grandes para reducir la variabilidad entre individuos y entre diferentes colonias. El diseño de los experimentos también planteó un desafío, ya que al trabajar con individuos que nunca fueron capturados ni forzados, las avispas tenían la libertad de abandonar el experimento en cualquier momento. Por ese motivo, cada conjunto de experimentos destinados a evaluar un aspecto particular del comportamiento tuvo que ser meticulosamente planeado para causar la mínima interferencia en las avispas y en su comportamiento de retorno. Esto hizo que fuera necesario realizar múltiples tratamientos similares entre sí y también diversos controles para excluir la potencial influencia de variables que no eran de interés. Por ejemplo, estudios previos en *V. germanica* indican que el micrositio aprendido ejerce una gran influencia en las decisiones de forrajeo de *V. germanica* (e.g., Lozada y D'Adamo 2011; Moreyra y Lozada 2018) y constituye una variable que puede solaparse al evaluar la respuesta de las avispas a estímulos olfativos. Por lo tanto, tuve que idear experimentos que permitieran desacoplar la influencia del aprendizaje espacial, como el arreglo en forma de V que se usó para evaluar la respuesta de atracción a un olor aprendido. Otra dificultad que surgió durante el diseño de los experimentos, en particular los del capítulo 5, fue la imposibilidad de emplear más de un olor durante el entrenamiento de la avispa debido a posibles efectos de deposición de volátiles en el suelo del área experimental (Elkinton y Cardé 1984) lo cual podría haber afectado los resultados. En ese caso, podría haber ocurrido que volátiles de un olor usado durante la primera visita hayan quedado impregnados en el suelo y, de esa forma habría, haber estado también presente (aunque sea en una concentración muy baja) durante la segunda visita, generando un refuerzo asociación durante la segunda visita. Como resultado, se observaría una mayor respuesta de atracción hacia el olor usado en la primera visita que hacia el olor usado durante la segunda, sin embargo, dicho resultado no sería causado por un efecto del orden de visita. Ante esto, se optó por trabajar con solo un olor, que en la mayoría de los experimentos fue agregado en la

última visita, a excepción del experimento 2 del primer conjunto de experimentos (pag 126), por lo que se adicionan el experimento 1 para responder la pregunta.

La evaluación del aprendizaje asociativo de olores en avispas “libres”, i.e., avispas que provienen de colonias silvestres y que no son capturadas para los fines del experimento, también planteó un desafío. Hasta el momento, no se habían desarrollado estudios sobre el aprendizaje asociativo de estímulos olfativos en avispas eusociales, por lo que fue necesario desarrollar una metodología que me permitiera evaluar (y cuantificar) cambios en la respuesta al olor en avispas “libres” y, a su vez, que permitiera atribuir dichos cambios a mecanismos asociativos. Por tal motivo, en el capítulo 3 llevé a cabo diferentes conjuntos de experimentos destinados a evaluar la respuesta al olor en un abanico de contextos. Por un lado, analicé la respuesta al olor acoplado a una fuente de alimento en diferentes escenarios (e.g., elección y no-elección). Por otro lado, evalué la respuesta al olor no recompensado usando dos piezas de papel de filtro (una de las cuales contenía el olor) situadas a 1,5 m de distancia del sitio de entrenamiento, en dirección contraria a la dirección de viento. La ubicación de la fuente del olor en contra del viento y alejada del lugar aprendido favoreció la detección de la pluma de olor por parte de las avispas que retornaban al lugar aprendido. Este arreglo en forma de V también me permitió cuantificar el nivel de respuesta condicionada al olor por medio de la observación del número de acercamientos hacia la fuente del estímulo. La consistencia en los resultados obtenidos en los diferentes tipos de experimentos fue lo que me permitió atribuir los cambios en la respuesta al olor al condicionamiento clásico. Este arreglo en forma de V fue posteriormente empleado en el capítulo 5 para evaluar la fuerza de la memoria asociativa del olor a lo largo de diferentes visitas a una fuente de alimento. En este caso, las diferencias halladas entre los tratamientos y sus respectivos controles positivos y negativos, como así también la consistencia en los resultados de los diferentes experimentos demostraron que el arreglo en forma de V constituye una metodología útil y sensible para cuantificar cambios en la fuerza de la memoria asociativa del olor en condiciones de campo con avispas “libres”.



Otra variable que debió ser controlada en los diferentes experimentos fue el cambio de motivación por el recurso como resultado de la fenología de la colonia. A lo largo de la temporada, las forrajeras de *V. germanica* experimentan cambios en su motivación por recursos proteicos debido a cambios en la demanda nutricional de la colonia como consecuencia del aumento en el número de individuos y la producción de los individuos reproductores (Edwards 1980). Este cambio en la motivación de las forrajeras puede ser una fuente de variabilidad adicional a las mencionadas en los párrafos anteriores. Para lidiar con esto, los experimentos fueron replicados a lo largo de la temporada para que esta potencial fuente de variabilidad sea incluida en todos los tratamientos. En el caso de los experimentos del capítulo 5, en el que hubo un cierto desfase temporal entre los experimentos, se llevó a cabo un control positivo (grupo CV) y un control negativo (grupo C) para cada conjunto de experimentos, que sirvió como punto de referencia para las comparaciones entre los diferentes tratamientos de este conjunto experimental.

La logística y la interferencia con las personas que frecuentaban las costas de los lagos también fue un inconveniente durante el desarrollo de los experimentos. En ocasiones, debí trasladarme de sitio (incluso varias veces en un mismo día) en busca de condiciones climáticas adecuadas y con baja concurrencia de personas. Los hábitos carroñeros y oportunistas de las forrajeras provocan que sean atraídas por los alimentos, por lo que fue realmente difícil encontrar lugares apropiados para la realización de los experimentos, principalmente durante la temporada de verano. De hecho, un alto número de experimentos debieron ser interrumpidos y/o descartados debido a que las avispas abandonaron el alimentador experimental y se dirigieron a los alimentos de las personas que estaban en la playa.

#### **4. Perspectivas de trabajo futuro**

Un aspecto interesante a evaluar en estudios futuros es la influencia de la fenología de la colonia en el valor relativo de los diferentes tipos de recursos (carbohidratos y proteínas) al incluirlo como variable en los diferentes estudios que se lleven a cabo y que abarquen la recolección de datos a lo largo de toda la temporada. Un mejor conocimiento sobre cómo la creciente motivación por el alimento puede afectar el comportamiento de las avispas podría resultar de gran utilidad metodológica, ya que permitiría mejorar el diseño de los experimentos.

Como se mencionó en los diferentes capítulos de esta tesis, los resultados fueron obtenidos en el contexto de explotación de carroña. Tanto en avispas sociales, como en otros insectos sociales como hormigas, las forrajeras despliegan estrategias de búsqueda de alimento que dependen del tipo de recurso explotado: proteína o carbohidratos (e.g., Fourcassié y Traniello 1994; Raveret Richter 2000; Moreyra et al. 2007; Schultheiss y Cheng 2013). Por lo tanto, es posible que los hallazgos obtenidos aquí no puedan ser generalizados al forrajeo de carbohidratos, como la importancia relativa de la primera experiencia y la jerarquía de claves observada en el capítulo 3. Investigar si estos hallazgos también ocurren durante la explotación de carbohidratos podría ayudar a dilucidar si están ligados al tipo de recurso o es una característica de la especie.

También podría resultar valioso continuar con la evaluación de los repelentes a base de compuestos vegetales para proteger colmenas de *A. mellifera* en la Patagonia. Como primer paso, habría que mejorar la persistencia del repelente mediante formulaciones que retarden su liberación. Posteriormente, se podría analizar el efecto de los repelentes sobre las avispas a mediano y largo plazo, para determinar si hay cambios en su eficacia como resultado del aprendizaje de las avispas. Por último, sería interesante evaluar si la eficacia de los repelentes puede potenciarse por medio de su uso combinado con trampas con feromona, que permitan la remoción de las avispas al mismo tiempo que se mantienen alejadas de la colmena.

## 5. Conclusión final

Esta tesis constituye un aporte valioso al conocimiento de la plasticidad comportamental de avispas eusociales en relación a claves olfativas y los factores que modulan el aprendizaje de olores en un contexto natural de forrajeo. Teniendo en cuenta que las habilidades cognitivas de estas avispas han sido propuestas como una de las características que podría estar ligada a su éxito como especie invasora, los hallazgos obtenidos aquí permiten comprender mejor cómo estas avispas lidian con situaciones cambiantes e impredecibles que son típicas de los ambientes nuevos. A su vez, esta tesis brinda información útil que podría contribuir a mejorar las estrategias de manejo empleadas actualmente para esta especie en ambientes agrestes y urbanos, en los cuales *V. germanica* no solo entra en conflicto con otras especies sino también con la población humana. Si bien, en comparación con otros insectos sociales modelo, *V. germanica* parece ser simple en cuanto a sus habilidades cognitivas, lo cierto es que ha recibido poca atención dado que la mayoría de los estudios se han enfocado en su control. Este trabajo, sumado a las contribuciones hechas por estudios previos, demuestra que *V. germanica* tiene un comportamiento de forrajeo altamente especializado y una gran plasticidad comportamental que la convierte en un modelo interesante y con un alto potencial para investigar el rol del aprendizaje y la memoria en ambientes cambiantes.

## Referencias Bibliográficas

- Akre, R. D., Ramsay, C., Grable, A., Baird, C., & Stanford, A. (1989). Additional range extension by the German yellowjacket, *Paravespula germanica* (Fabricius), in North America (Hymenoptera: Vespidae). *The Pan-Pacific entomologist (USA)*.
- Alaniz, A. J., Carvajal, M. A., & Vergara, P. M. (2021). Giants are coming? Predicting the potential spread and impacts of the giant Asian hornet (*Vespa mandarinia*, Hymenoptera: Vespidae) in the USA. *Pest Management Science*, 77(1), 104-112.
- Ali, M. F., & Morgan, E. D. (1990). Chemical communication in insect communities: a guide to insect pheromones with special emphasis on social insects. *Biological Reviews*, 65(3), 227-247.
- Archer, M. E. (1998). The world distribution of the Euro-Asian species of *Paravespula* (Hym., Vespinae). *Entomologists Monthly Magazine*, 134, 279-283.
- Arenas, A., & Farina, W. M. (2012). Learned olfactory cues affect pollen-foraging preferences in honeybees, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour*, 83(4), 1023-1033.
- Bacandritsos, N., Papanastasiou, I., Saitanis, C., & Roinioti, E. (2006). Three non-toxic insect traps useful in trapping wasps enemies of honey bees. *Bulletin of Insectology*, 59(2), 135-145.
- Badel, L., Ohta, K., Tsuchimoto, Y., & Kazama, H. (2016). Decoding of context-dependent olfactory behavior in *Drosophila*. *Neuron*, 91(1), 155-167.
- Baker, T. C., & Cardé, R. T. (1979). Analysis of pheromone-mediated behaviors in male *Grapholitha molesta*, the oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental entomology*, 8(5), 956-968.
- Balança, G., & De Visscher, M. N. (1997). Effects of very low doses of fipronil on grasshoppers and non-target insects following field trials for grasshopper control. *Crop Protection*, 16(6), 553-564.
- Barrett, L. P., Stanton, L. A., & Benson-Amram, S. (2019). The cognition of 'nuisance' species. *Animal Behaviour*, 147, 167-177.
- Barrozo, R. B., Gadenne, C., & Anton, S. (2010). Switching attraction to inhibition: mating-induced reversed role of sex pheromone in an insect. *Journal of Experimental Biology*, 213(17), 2933-2939.
- Barto, A., Mirolli, M., & Baldassarre, G. (2013). Novelty or surprise?. *Frontiers in Psychology*, 907.

- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2014). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:1406.5823*.
- Bateson, M. (2004). Mechanisms of decision-making and the interpretation of choice tests. *Animal Welfare-potters Bar then wheathampstead-*, *13*, S115-S120.
- Beggs JR, Brockerhoff EG, Corley JC *et al.* 2011. Ecological effects and management of invasive Vespidae. *BioControl* *56*, 505–526.
- Benelli, G., Stefanini, C., Giunti, G., Geri, S., Messing, R. H., & Canale, A. (2014). Associative learning for danger avoidance nullifies innate positive chemotaxis to host olfactory stimuli in a parasitic wasp. *Naturwissenschaften*, *101*(9), 753-757.
- Binder, M. D., Hirokawa, N., & Windhorst, U (2009). *Encyclopedia of Neuroscience*, Springer, Berlin.
- 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.
- Boevé, J. L., Honraet, K., & Rossel, B. (2014). Screening of repellents against vespid wasps. *Insects*, *5*(1), 272-286.
- Broussalis, A. M., Ferraro, G. E., Martino, V. S., Pinzón, R., Coussio, J. D., & Alvarez, J. C. (1999). Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, *67*(2), 219-223.
- Buehlmann, C., Aussel, A., & Graham, P. (2020a). Dynamic multimodal interactions in navigating wood ants: what do path details tell us about cue integration?. *Journal of Experimental Biology*, *223*(7), jeb221036.
- Buehlmann, C., Mangan, M., & Graham, P. (2020b). Multimodal interactions in insect navigation. *Animal Cognition*, *23*(6), 1129-1141.
- Burke, C. J., & Waddell, S. (2011). Remembering nutrient quality of sugar in *Drosophila*. *Current Biology*, *21*(9), 746-750.
- Buteler, M., Fernandez, P., Stadler, T., Weaver, D. K., Yossen, B., & Lozada, M. (2018). Heptyl butyrate, a putative pheromone involved in social communication of *Vespula germanica* wasps. *Insectes sociaux*, *65*(1), 95-101.
- Buteler, M., Lozada, M., D'adamo, P., Melo, R. A. L., & Stadler, T. (2016). Behavioural responses of *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) wasps exposed to essential oils. *Austral Entomology*, *55*(3), 308-315.

- Buteler, M., Yossen, M. B., Alma, A. M., & Lozada, M. (2021). Interaction between *Vespula germanica* and *Apis mellifera* in Patagonia Argentina apiaries. *Apidologie*, 52(4), 848-859.
- Carcaud, J., Roussel, E., Giurfa, M., & Sandoz, J. C. (2009). Odour aversion after olfactory conditioning of the sting extension reflex in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 212(5), 620-626.
- Clapperton, B. K., Alspach, P. A., Moller, H., & Matheson, A. G. (1989). The impact of common and German wasps (Hymenoptera: Vespidae) on the New Zealand beekeeping industry. *New Zealand Journal of Zoology*, 16(3), 325-332.
- Clapperton, B. K., Porter, R. E., Day, T. D., Waas, J. R., & Matthews, L. R. (2012). Designer repellents: combining olfactory, visual or taste cues with a secondary repellent to deter free-ranging house sparrows from feeding. *Pest Management Science*, 68(6), 870-877.
- Collett, T. S., & Baron, J. (1995). Learnt sensori-motor mappings in honeybees: interpolation and its possible relevance to navigation. *Journal of Comparative Physiology A*, 177(3), 287-298.
- Collett, T. S., & Rees, J. A. (1997). View-based navigation in Hymenoptera: multiple strategies of landmark guidance in the approach to a feeder. *Journal of Comparative Physiology A*, 181(1), 47-58.
- Cook, S. M., Khan, Z. R., & Pickett, J. A. (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, 52, 375-400.
- Czaczkes, T. J., Grüter, C., Ellis, L., Wood, E., & Ratnieks, F. L. (2013). Ant foraging on complex trails: route learning and the role of trail pheromones in *Lasius niger*. *Journal of Experimental Biology*, 216(2), 188-197.
- Czaczkes, T. J., Schlosser, L., Heinze, J., & Witte, V. (2014). Ants use directionless odour cues to recall odour-associated locations. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(6), 981-988.
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2005). Conspecific and food attraction in the wasp *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae), and their possible contributions to control. *Annals of the Entomological Society of America*, 98(2), 236-240.
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2011). Cognitive plasticity in foraging *Vespula germanica* wasps. *Journal of Insect Science*, 11(1), 103.
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2014). How context modification can favor the release of past experience in *Vespula germanica* wasps, enabling the detection of a novel food site. *Journal of Insect Behavior*, 27(3), 395-402.

- D'Adamo, P., Corley, J. C., & Lozada, M. (2001). Attraction of *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) foragers by conspecific heads. *Journal of Economic Entomology*, *94*(4), 850-852.
- D'Adamo, P., Lozada, M., & Corley, J. (2003). Conspecifics enhance attraction of *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) foragers to food baits. *Annals of the Entomological Society of America*, *96*(5), 685-688.
- D'Adamo, P. & Lozada, M. (2007). Foraging behavior related to habitat characteristics in the invasive wasp *Vespula germanica*. *Insect Science*, *14*(5), 383-388.
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2003). The importance of location and visual cues during foraging in the German wasp (*Vespula germanica* F.)(Hymenoptera: Vespidae). *New Zealand Journal of Zoology*, *30*(3), 171-174.
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2008). Foraging behaviour in *Vespula germanica* wasps re-locating a food source. *New Zealand Journal of Zoology*, *35*(1), 9-17.
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2009). Flexible foraging behavior in the invasive social wasp *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *102*(6), 1109-1115.
- D'Adamo, P., Corley, J., Sackmann, P., & Lozada, M. (2000). Local enhancement in the wasp *Vespula germanica* Are visual cues all that matter?. *Insectes Sociaux*, *47*(3), 289-291.
- D'Adamo, P., Lozada, M., & Corley, J. C. (2004). An attraction pheromone from heads of worker *Vespula germanica* wasps. *Journal of Insect Behavior*, *17*(6), 809-821.
- Dara, S. K. (2019). The new integrated pest management paradigm for the modern age. *Journal of Integrated Pest Management*, *10*(1), 12.
- Dukas, R. (2008). Evolutionary biology of insect learning. *Annual Review of Entomology*, *53*, 145-160.
- Dukas, R. (2013). Effects of learning on evolution: robustness, innovation and speciation. *Animal Behaviour*, *85*(5), 1023-1030.
- Dukas, R., & Duan, J. J. (2000). Potential fitness consequences of associative learning in a parasitoid wasp. *Behavioral Ecology*, *11*(5), 536-543.
- Edwards, R. (1980). *Social wasps: Their biology and control*. Rentokil Ltd, London, U.K.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., ... & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, *483*(1-2), 220-243.

- Elkinton, J. S., & Cardé, R. T. (1984). Odor dispersion. In *Chemical ecology of insects* (pp. 73-91). Springer, Boston, MA.
- Elmqvist, D. C., & Landolt, P. J. (2018). Associative learning of food odors by the European paper wasp, *Polistes dominula* Christ (Hymenoptera: Vespidae). *Environmental Entomology*, 47(4), 960-968.
- El-Sayed, A. M., Jósваи, J. K., Brown, R. L., Twidle, A., & Suckling, D. M. (2018). Associative learning of food odor by social wasps in a natural ecosystem. *Journal of Chemical Ecology*, 44(10), 915-921.
- Farina, W. M., Grüter, C., & Díaz, P. C. (2005). Social learning of floral odours inside the honeybee hive. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1575), 1923-1928.
- Foster S. P., & Harris, M. O. (1997). Behavioral manipulation methods for insect pest-management. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 123-146.
- Fourcassié, V., & Traniello, J. F. (1994). Food searching behaviour in the ant *Formica schaufussi* (Hymenoptera, Formicidae): response of naive foragers to protein and carbohydrate food. *Animal Behaviour*, 48(1), 69-79.
- Fukushi, T., & Wehner, R. (2004). Navigation in wood ants *Formica japonica*: context dependent use of landmarks. *Journal of Experimental Biology*, 207(19), 3431-3439.
- Gadenne, C., Dufour, M. C., & Anton, S. (2001). Transient post-mating inhibition of behavioural and central nervous responses to sex pheromone in an insect. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1476), 1631-1635.
- Gallistel, C. R., Craig, A. R., & Shahan, T. A. (2014). Temporal contingency. *Behavioural Processes*, 101, 89-96.
- Gheusi, G. (2009). Behavioral Methods in Olfactory Research. In *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer, Berlin (pp. 365-369).
- Ghirlanda, S., & Enquist, M. (2003). A century of generalization. *Animal Behaviour*, 66(1), 15-36.
- Ginzel, M. D. (2010). Olfactory signals. In *Encyclopedia of Animal Behavior*. Elsevier Academic Press, (584-588).
- Giurfa, M. (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(8), 801-824.



- Giurfa, M. (2013). Cognition with few neurons: higher-order learning in insects. *Trends in Neurosciences*, 36(5), 285-294.
- Giurfa, M. (2015). Learning and cognition in insects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 6(4), 383-395.
- Giurfa, M., Avarguès-Weber, A., Menzel R. (2010) Non-Elemental Learning in Invertebrates. In *Encyclopedia of Animal Behavior*, Elsevier Academic Press, Boca Ratón 390-396.
- Gong, Z., Tan, K., & Nieh, J. C. (2019). Hornets possess long-lasting olfactory memories. *Journal of Experimental Biology*, 222(13), jeb200881.
- Goñi, M. L., Gañán, N. A., Herrera, J. M., Strumia, M. C., Andreatta, A. E., & Martini, R. E. (2017). Supercritical CO<sub>2</sub> iof LDPE films with terpene ketones as biopesticides against corn weevil (*Sitophilus zeamais*). *The Journal of Supercritical Fluids*, 122, 18-26.
- González, S., Huaiquinao, L., Gonzalez, A., van Baren, C., Di Leo Lira, P, Bandoni, A. (2009) Uso popular del paico y composición química de su aceite esencial en la zona de Esquel (Chubut, Argentina), in: Tradiciones y transformaciones en etnobotánica, ed. by Pochettino M, Ladio A, Arenas P, CYTED, Jujuy, 304-307.
- Griffin, A., Guez, D., Federspiel, I., Diquelou, M., & Lermite, F (2016). Invading new environments: A mechanistic framework linking motor diversity and cognition to establishment success. In *Biological invasions and animal behaviour*, Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 26–46.
- Grüter, C., & Leadbeater, E. (2014). Insights from insects about adaptive social information use. *Trends in ecology & evolution*, 29(3), 177-184.
- Grüter, C., Czaczkes, T. J., & Ratnieks, F. L. (2011). Decision making in ant foragers (*Lasius niger*) facing conflicting private and social information. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65(2), 141-148.
- Gunasekara, A. S., Truong, T., Goh, K. S., Spurlock, F., & Tjeerdema, R. S. (2007). Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science*, 0706180001-0706180001.
- Hanna, C., Foote, D., & Kremen, C. (2012). Short-and long-term control of *Vespula pensylvanica* in Hawaii by fipronil baiting. *Pest Management Science*, 68(7), 1026-1033.
- Harris, R. J., & Etheridge, N. D. (2001). Comparison of baits containing fipronil and sulfluramid for the control of *Vespula* wasps. *New Zealand Journal of Zoology*, 28(1), 39-48.
- Hartlieb, E., Anderson, P., & Hansson, B. S. (1999). Appetitive learning of odours with different behavioural meaning in moths. *Physiology & Behavior*, 67(5), 671-677.

- Hendrichs, J., Katsoyannos, B. I., Wornoayporn, V., & Hendrichs, M. A. (1994). Odour-mediated foraging by yellowjacket wasps (Hymenoptera: Vespidae): predation on leks of pheromone-calling Mediterranean fruit fly males (Diptera: Tephritidae). *Oecologia*, 99(1), 88-94.
- Herrera, J. M., Goñi, M. L., Gañan, N. A., & Zygadlo, J. A. (2017). An insecticide formulation of terpene ketones against *Sitophilus zeamais* and its incorporation into low density polyethylene films. *Crop Protection*, 98, 33-39.
- Hewson, L., & Tarrega, A. (2017). Sensory adaptation. In *Time-Dependent Measures of Perception in Sensory Evaluation*, 67-87.
- Hoedjes, K. M., Kraleman, L. E., van Vugt, J. J., Vet, L. E., & Smid, H. M. (2014). Unravelling reward value: the effect of host value on memory retention in *Nasonia* parasitic wasps. *Animal Behaviour*, 96, 1-7.
- Hoedjes, K. M., Kruidhof, H. M., Huigens, M. E., Dicke, M., Vet, L. E., & Smid, H. M. (2011). Natural variation in learning rate and memory dynamics in parasitoid wasps: opportunities for converging ecology and neuroscience. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1707), 889-897.
- Hrncir, M., Mateus, S., & Nascimento, F. S. (2007). Exploitation of carbohydrate food sources in *Polybia occidentalis*: social cues influence foraging decisions in swarm-founding wasps. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(6), 975-983.
- Human, K. G., & Gordon, D. M. (1996). Exploitation and interference competition between the invasive Argentine ant, *Linepithema humile*, and native ant species. *Oecologia*, 105(3), 405-412.
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66.
- Jander, R. (1998). Olfactory learning of fruit odors in the eastern yellow jacket, *Vespula maculifrons* (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of Insect Behavior*, 11(6), 879-888.
- Jandt J. M. & Jeanne R. L. 2005. German yellowjacket (*Vespula germanica*) foragers use odors inside the nest to find carbohydrate food sources. *Ethology* 111:641-651.
- Jeanne, R. L. and Taylor, B. J. (2009) Individual and social foraging in social wasps, *In Food Exploitation by Social Insects: Ecological, Behavioral and Theoretical Approaches*, CRC Press, Boca Raton, 53– 79.

- Jernigan, C. M., Halby, R., Gerkin, R. C., Sinakevitch, I., Locatelli, F., & Smith, B. H. (2020). Experience-dependent tuning of early olfactory processing in the adult honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 223(1), jeb206748.
- Jones, P. L., Ryan, M. J., & Chittka, L. (2015). The influence of past experience with flower reward quality on social learning in bumblebees. *Animal Behaviour*, 101, 11-18.
- 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.
- Josens, R., Mattiacci, A., Lois-Milevicich, J., & Giacometti, A. (2016). Food information acquired socially overrides individual food assessment in ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(12), 2127-2138.
- Kamin, L. J. (1969). Predictability, surprise, attention, and conditioning. In *Punishment and Aversive Behavior*. Appleton-Century-Crofts .New York (pp. 279–296).
- Kenta, T., Inari, N., Nagamitsu, T., Goka, K., & Hiura, T. (2007). Commercialized European bumblebee can cause pollination disturbance: an experiment on seven native plant species in Japan. *Biological Conservation*, 134(3), 298-309.
- Knaden, M., & Graham, P. (2016). The sensory ecology of ant navigation: from natural environments to neural mechanisms. *Annual Review of Entomology*, 61, 63-76.
- Kohn, A. (2007). Visual adaptation: physiology, mechanisms, and functional benefits. *Journal of Neurophysiology*, 97(5), 3155-3164.
- Laurino, D., Lioy, S., Carisio, L., Manino, A., & Porporato, M. (2019). *Vespa velutina*: An alien driver of honey bee colony losses. *Diversity*, 12(1), 5.
- Lewis, W. J., & Takasu, K. (1990). Use of learned odours by a parasitic wasp in accordance with host and food needs. *Nature*, 348(6302), 635-636.
- Lewontin, R. C. (1983). The organism as the subject and object of evolution. *Scientia*, 77(18).
- Liebhold, A. M., & Tobin, P. C. (2008). Population ecology of insect invasions and their management. *Annual Review of Entomology*, 53, 387-408.
- Lozada, M., & D'Adamo, P. (2006). How long do *Vespula germanica* wasps search for a food source that is no longer available?. *Journal of Insect Behavior*, 19(5), 591-600.
- Lozada, M., & D'Adamo, P. (2011). Past experience: a help or a hindrance to *Vespula germanica* foragers?. *Journal of Insect Behavior*, 24(2), 159-166.

- Lozada, M., & D'Adamo, P. (2014). Learning in an exotic social wasp while relocating a food source. *Journal of Physiology-Paris*, 108(2-3), 187-193.
- Lozada, M., & D'Adamo, P. (2009). How does an invasive social wasp deal with changing contextual cues while foraging?. *Environmental Entomology*, 38(3), 803-808.
- Lozada, M., D'Adamo, P., Buteler, M., & Kuperman, M. N. (2016). Social learning in *Vespula germanica* wasps: do they use collective foraging strategies?. *PLoS One*, 11(3), e0152080.
- MacDonald, J. F., Akre, R. D., & Keyel, R. E. (1980). The german yellowjacket (*Vespula germanica*) problem in the United States (Hymenoptera: Vespidae). *Bulletin of the Entomological Society of America*, 26(4), 436-444.
- Maia, M. F., & Moore, S. J. (2011). Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 10(1), 1-15.
- Martin, J. P., Beyerlein, A., Dacks, A. M., Reisenman, C. E., Riffell, J. A., Lei, H., & Hildebrand, J. G. (2011). The neurobiology of insect olfaction: sensory processing in a comparative context. *Progress in Neurobiology*, 95(3), 427-447.
- Masciocchi, M., & Corley, J. (2013). Distribution, dispersal and spread of the invasive social wasp (*Vespula germanica*) in Argentina. *Austral Ecology*, 38(2), 162-168.
- Masciocchi, M., Beggs, J. R., Carpenter, J. M., & Corley, J. C. (2010). Primer registro de *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69(3-4), 267-270.
- Masciocchi, M., Unelius, C. R., & Buteler, M. (2019). Foraging niche separation of social wasps in an invaded area: Implications for their management. *Journal of Applied Entomology*, 143(10), 1115-1121.
- McPheron, L. J., & Mills, N. J. (2007). Discrimination learning of color-odor compounds in a paper Wasp (Hymenoptera: Vespidae: Pompilinae: *Mischocyttarus favitarsis*). *Entomologia generalis*, 125-134.
- Mengoni, S. L., Lorenzo-Figueiras, A. N., & Minoli, S. A. (2017). Experience-dependent modulation of the attraction to faeces in the kissing bug *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology*, 98, 23-28.
- Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 185(4), 323-340.
- Menzel, R. (2009). Learning and memory in invertebrates: Honeybee. In *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier Academic Press, Boca Raton (pp. 435–439).

- Menzel, R., & Giurfa, M. (2001). Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends in Cognitive Sciences*, 5(2), 62-71.
- Menzel, R., & Müller, U. (1996). Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annual Review of Neuroscience*, 19(1), 379-404.
- Mishra, D., Chen, Y. C., Yarali, A., Oguz, T., & Gerber, B. (2013). Olfactory memories are intensity specific in larval *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 216(9), 1552-1560.
- Mohamed, F., Senarathna, L., Percy, A., Abeyewardene, M., Eaglesham, G., Cheng, R., ... & Eddleston, M. (2004). Acute human self-poisoning with the n-phenylpyrazole insecticide fipronil—A GABAA-gated chloride channel blocker. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(7), 955-963.
- Monceau, K., Bonnard, O., & Thiéry, D. (2014). *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal of Pest Science*, 87(1), 1-16.
- Morales, C. L., Arbetman, M. P., Cameron, S. A., & Aizen, M. A. (2013). Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11(10), 529-534.
- Moreyra, S., & Lozada, M. (2019). How single events can influence decision-making in foraging *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) social wasps. *Austral Entomology*, 58(2), 443-450.
- Moreyra, S., D'Adamo, P., & Lozada, M. (2007). Odour and visual cues utilised by German yellowjackets (*Vespula germanica*) while relocating protein or carbohydrate resources. *Australian Journal of Zoology*, 54(6), 393-397.
- Moreyra, S., D'Adamo, P., & Lozada, M. (2012). Cognitive processes in *Vespula germanica* wasps (Hymenoptera: Vespidae) when relocating a food source. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(1), 128-133.
- Moreyra, S., D'Adamo, P., & Lozada, M. (2014). The influence of past experience on wasp choice related to foraging behavior. *Insect Science*, 21(6), 759-764.
- Moreyra, S., D'Adamo, P., & Lozada, M. (2017). Long-term spatial memory in *Vespula germanica* social wasps: the influence of past experience on foraging behavior. *Insect Science*, 24(5), 853-858.
- Moreyra, S., D'Adamo, P., & Lozada, M. (2021). Evidence of associative blocking during foraging in the social wasp *Vespula germanica*. *Insect Science*, 28(4), 1103-1108.

- Mustaparta, H. (1984). Olfaction. In *Chemical ecology of insects* Springer, Boston, MA (pp. 37-70).
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology*, *101*(1), 372-378.
- Oberhauser, F. B., Schlemm, A., Wendt, S., & Czaczkes, T. J. (2019). Private information conflict: *Lasius niger* ants prefer olfactory cues to route memory. *Animal Cognition*, *22*(3), 355-364.
- Orlova, M., & Amsalem, E. (2021). Bumble bee queen pheromones are context-dependent. *Scientific reports*, *11*(1), 1-7.
- Otte, D. (1974). Effects and functions in the evolution of signaling systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *5*(1), 385-417.
- Overmyer, S. L., & Jeanne, R. L. (1998). Recruitment to food by the German yellowjacket, *Vespula germanica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *42*(1), 17-21.
- Palacios, A. G., & Bozinovic, F. (2003). An "enactive" approach to integrative and comparative biology: Thoughts on the table. *Biological research*, *36*(1), 101-105.
- Papaj, D. R., & Prokopy, R. J. (1989). Ecological and evolutionary aspects of learning in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, *34*(1), 315-350.
- Pham-Delegue, M. H., Bailez, O., Blight, M. M., Masson, C., Picard-Nizou, A. L., & Wadhams, L. J. (1993). Behavioural discrimination of oilseed rape volatiles by the honeybee *Apis mellifera* L. *Chemical Senses*, *18*(5), 483-494.
- Prokopy, R. J., & Lewis, W. J. (1993). Application of learning to pest management. In *Insect learning* Springer, Boston, MA. (pp. 308-342).
- Provecho, Y., & Josens, R. (2009). Olfactory memory established during trophallaxis affects food search behaviour in ants. *Journal of Experimental Biology*, *212*(20), 3221-3227.
- Pusceddu, M., Floris, I., Buffa, F., Salaris, E., & Satta, A. (2017). Agonistic interactions between the honeybee (*Apis mellifera ligustica*) and the European wasp (*Vespula germanica*) reveal context-dependent defense strategies. *PloS one*, *12*(7), e0180278.
- Pyrski, M. & Zufall, F. (2009). Odor. In *Encyclopedia of Neuroscience*, Springer, Berlin.
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.

- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
- R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
- Raveret Richter, M. (2000). Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. *Annual review of entomology*, 45(1), 121-150.
- Raveret Richter, M., & Jeanne, R. L. (1985). Predatory behavior of *Polybia sericea* (Olivier), a tropical social wasp (Hymenoptera: Vespidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 16(2), 165-170.
- Raveret Richter, M., & Tisch, V. L. (1999). Resource choice of social wasps: influence of presence, size and species of resident wasps. *Insectes Sociaux*, 46(2), 131-136.
- Renou, M. (2014). Pheromones and general odor perception in insects. *Neurobiology of chemical communication*, 1, 23-56.
- Rescorla, R. A. (1988). Behavioral studies of Pavlovian conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, 11(1), 329-352.
- Riffell, J. A., Lei, H., Christensen, T. A., & Hildebrand, J. G. (2009). Characterization and coding of behaviorally significant odor mixtures. *Current Biology*, 19(4), 335-340.
- Rothschild, G. H. L. (1981). Mating disruption of lepidopterous pests: current status and future prospects. In *Management of insect pests with semiochemicals*. Springer, Boston, MA (pp. 207-228).
- Rust, M. K. (1976). Quantitative analysis of male responses released by female sex pheromone in *Periplaneta americana*. *Animal Behaviour*, 24(3), 681-685.
- Rutledge, L. C., Sofield, R. K., & Moussa, M. A. (1978). A bibliography of diethyl toluamide. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 24(4), 431-439.
- Sackmann, P., & Corley, J. C. (2007). Control of *Vespula germanica* (Hym. Vespidae) populations using toxic baits: bait attractiveness and pesticide efficacy. *Journal of Applied Entomology*, 131(9-10), 630-636.
- Sackmann, P., Rabinovich, M., & Corley, J. C. (2001). Successful removal of the European wasp by toxic baiting in NW Patagonia. *Journal of Economic Entomology*, 94, 811-816.
- Saleh, N., & Chittka, L. (2006). The importance of experience in the interpretation of conspecific chemical signals. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(2), 215-220.

- Santoro, D., Hartley, S., Suckling, D. M., & Lester, P. J. (2015). Nest-based information transfer and foraging activation in the common wasp (*Vespula vulgaris*). *Insectes Sociaux*, 62(2), 207-217.
- Saverschek, N., & Roces, F. (2011). Foraging leafcutter ants: olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Animal Behaviour*, 82(3), 453-458.
- Schomaker, J. (2019). Unexplored territory: Beneficial effects of novelty on memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 161, 46-50.
- Schomaker, J., & Meeter, M. (2015). Short-and long-lasting consequences of novelty, deviance and surprise on brain and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 55, 268-279.
- Schueller, T. I., Nordheim, E. V., Taylor, B. J., & Jeanne, R. L. (2010). The cues have it; nest-based, cue-mediated recruitment to carbohydrate resources in a swarm-founding social wasp. *Naturwissenschaften*, 97(11), 1017-1022.
- Schueller, T. I., Nordheim, E. V., Taylor, B. J., & Jeanne, R. L. (2010). The cues have it; nest-based, cue-mediated recruitment to carbohydrate resources in a swarm-founding social wasp. *Naturwissenschaften*, 97(11), 1017-1022.
- Schultheiss, P., & Cheng, K. (2013). Finding food: outbound searching behavior in the Australian desert ant *Melophorus bagoti*. *Behavioral Ecology*, 24(1), 128-135.
- Schultz, W. (2009). Dopamine Neurons: Reward and Uncertainty. In *Encyclopedia of Neuroscience*, Elsevier Academic Press, Boca Raton (pp 571-577)
- Seeley T.D. (1995) The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies. Harvard University Press, Cambridge
- Shepard, R. N. (1987). Toward a universal law of generalization for psychological science. *Science*, 237(4820), 1317-1323.
- Shettleworth, S. J. (2001). Animal cognition and animal behaviour. *Animal behaviour*, 61(2), 277-286.
- Shettleworth, S.J. (2010). Cognition, evolution, and behaviour, Oxford University Press, New York, NY.
- Simberloff, D., Martin, J. L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D. A., Aronson, J., ... & Vilà, M. (2013). Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(1), 58-66.



Slaa, E. J., Wassenberg, J., & Biesmeijer, J. C. (2003). The use of field-based social information in eusocial foragers: local enhancement among nestmates and heterospecifics in stingless bees. *Ecological Entomology*, 28(3), 369-379.

Snell-Rood, E. C. (2013). An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity. *Animal Behaviour*, 85(5), 1004-1011.

Sokal, R.R., & Rohlf, F.J. (1995). *Biometry*. W. H. Freeman, New York, NY.

Spradbery, J. P. (1973) *Wasps: an account of the biology and natural history of the solitary and social wasps*. University of Washington Press, Seattle.

Steck, K., Hansson, B. S., & Knaden, M. (2011). Desert ants benefit from combining visual and olfactory landmarks. *Journal of Experimental Biology*, 214(8), 1307-1312.

Takagi M., Hirose Y. & Yamasaki M. (1980). Prey-location learning in *Polistes jadwigae* Dalla Torre (Hymenoptera: Vespidae), field experiments on orientation. *Kontyu*, 48, 53-58.

Taylor, B. J., Schalk, D. R., & Jeanne, R. L. (2010). Yellowjackets use nest-based cues to differentially exploit higher-quality resources. *Naturwissenschaften*, 97(12), 1041-1046.

Tempel, B. L., Bonini, N., Dawson, D. R., & Quinn, W. G. (1983). Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(5), 1482-1486.

Thane, M., Viswanathan, V., Meyer, T. C., Paisios, E., & Schleyer, M. (2019). Modulations of microbehaviour by associative memory strength in *Drosophila* larvae. *Plos one*, 14(10), e0224154.

Thomas, C. R. (1960) *The European wasp (Vespula germanica Fab.) in New Zealand*. New Zealand Department of Scientific and Industrial Research Information. Series No. 27. Wellington.

Thorpe, W.H. (1956) *Learning and Instinct in Animals*. Hazell Watson and Viney Ltd, London.

Tolman, E. C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychological review*, 55(4), 189.

Touyama, Y., Ogata, K., & Sugiyama, T. (2003). The Argentine ant, *Linepithema humile*, in Japan: assessment of impact on species diversity of ant communities in urban environments. *Entomological Science*, 6(2), 57-62.

Traniello JFA (1988) Variation in foraging behavior among workers of the ant *Formica schaufussi*: Ecological correlates of search behavior and the modification of search pattern. In *Interindividual Behavioral Variation in Social Insects*, Westview Press, Boulder, (91–112).

- Tribe, G. D. & Richardson, D. (1994). The European wasp, *Vespula germanica* (Fabricius)(Hymenoptera: Vespidae), in southern Africa and its potential distribution as predicted by ecoclimatic matching. *African Entomology*, 2(1), 1-6.
- Tulving, E. (2008). On the law of primacy. In *Memory and mind: A festschrift for Gordon H. Bower*, 31-48.
- Varela, F. (2000). *El fenómeno de la vida*. Dolmen ediciones S.A, Santiago, Chile.
- Vinauger, C., Lahondère, C., Cohuet, A., Lazzari, C. R., & Riffell, J. A. (2016). Learning and memory in disease vector insects. *Trends in Parasitology*, 32(10), 761-771.
- Vinauger, C., Lutz, E. K., & Riffell, J. A. (2014). Olfactory learning and memory in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*, 217(13), 2321-2330.
- Webster, M. A. (2012). Evolving concepts of sensory adaptation. *F1000 biology reports*, 4.
- Werdin González, J. O., Gutiérrez, M. M., Ferrero, A. A., & Band, B. F. (2014). Essential oils nanoformulations for stored-product pest control—Characterization and biological properties. *Chemosphere*, 100, 130-138.
- Werdin Gonzalez, J. O., Stefanazzi, N., Murray, A. P., Ferrero, A. A., & Fernández Band, B. (2015). Novel nanoinsecticides based on essential oils to control the German cockroach. *Journal of Pest Science*, 88(2), 393-404.
- Willink A. 1980. Sobre la presencia de *Vespula germanica* (Fabricius) en la Argentina (Hymenoptera: Vespidae). *Neotropica* 26, 205-206.
- Wilson-Rankin, E. E. (2014). Social context influences cue-mediated recruitment in an invasive social wasp. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(7), 1151-1161.
- Wilson-Rankin, E. E. (2015). Level of experience modulates individual foraging strategies of an invasive predatory wasp. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69(3), 491-499.
- Wright, G. A., & Smith, B. H. (2004). Variation in complex olfactory stimuli and its influence on odour recognition. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1535), 147-152.
- Wright, G. A., Choudhary, A. F., & Bentley, M. A. (2009). Reward quality influences the development of learned olfactory biases in honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1667), 2597-2604.

Wright, G. A., Mustard, J. A., Simcock, N. K., Ross-Taylor, A. A., McNicholas, L. D., Popescu, A., & Marion-Poll, F. (2010). Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. *Current Biology*, 20(24), 2234-2240.

Zeil, J., Kelber, A., & Voss, R. (1996). Structure and function of learning flights in ground-nesting bees and wasps. *The Journal of Experimental Biology*, 199(1), 245-252.

Zhang, Q. H., Schneidmiller, R. G., & Hoover, D. R. (2013). Essential oils and their compositions as spatial repellents for pestiferous social wasps. *Pest Management Science*, 69(4), 542-552.

## **Anexo**

Procedimiento de marcado:

<https://drive.google.com/file/d/1GGi9Xeg5OpQDUOETFU2IhAir-rKIFpAn/view?usp=sharing>

Comportamiento de acercamiento a un olor (vainilla):

<https://drive.google.com/file/d/1UxL2umo6mYk9iZRIAXQxwVD5VB3cwFvd/view?usp=sharing>

**FÍJATE BIEN EN CÓMO CONTROLO A PAVLOV.  
EN CUANTO COMIENZE A SALIVAR, ÉL SONREIRÁ Y  
COMENZARÁ A ESCRIBIR EN SU PEQUEÑA LIBRETA...**



# Essential oils as vespoid wasp repellents: Implications for their use as a management strategy

María B. Yossen<sup>1</sup> | Mariana Lozada<sup>1</sup> | Marcelo N. Kuperman<sup>2,3</sup> | Silvia González<sup>4</sup> | Bruno Gastaldi<sup>2,4</sup> | Micaela Buteler<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Laboratorio Ecotono, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA, CONICET), Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Río Negro, Argentina

<sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

<sup>3</sup>Centro Atómico Bariloche (CNEA) and Instituto Balseiro, Bariloche, Río Negro, Argentina

<sup>4</sup>Laboratorio de Investigación en Plantas Aromáticas y Medicinales (LIPAM), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Esquel, Chubut, Argentina

## Correspondence

Micaela Buteler, Laboratorio Ecotono, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA, CONICET), Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Río Negro, Argentina.  
Email: butelermica@gmail.com

## Funding information

Agencia Promoción Científica y Tecnológica, Grant/Award Number: PICT 2016 0293

## Abstract

Recently, plant-based repellents have been proposed as a potential alternative to classic pesticides against pest wasps, in certain scenarios. Here, the repellent effect of *Dysphania multifida* essential oil and one of its main terpenoid components,  $\alpha$ -terpinene, were tested under field conditions with natural populations of wasps in Patagonia Argentina. *D. multifida* essential oil (paico), as well as  $\alpha$ -terpinene, repelled *V. germanica* wasps in the field. A strong avoidance of food baits treated with the essential oil or  $\alpha$ -terpinene was observed in choice and no-choice tests. In no-choice tests, the time it took wasps to arrive at the bait was significantly greater in treated baits than in control baits. Also, the total number of arriving wasps in 30 min was significantly greater in untreated baits in comparison with treated baits, under similar environmental conditions and wasp density. As the wasps' flight season progressed, wasp density and motivation for proteinaceous food sources increased. This was evidenced by a greater total number of wasps in untreated baits with time. On the contrary, the number of wasps in treated baits remained low throughout the peak season. Both the paico essential oil and the  $\alpha$ -terpinene act as powerful repellents for *V. germanica* wasps, generating an avoidance response to treated food sources. Thus, these compounds have potential to be used as repellents to prevent wasps' approaches and foraging, when applied in close proximity to a food source.

## KEYWORDS

*Dysphania multifida*, essential oil, foraging behaviour, repellents, social communication, *Vespula germanica*,  $\alpha$ -terpinene

## 1 | INTRODUCTION

The German yellowjacket, *Vespula germanica* (F.) (Hymenoptera: Vespidae), is a eusocial wasp native from Eurasia and North Africa which has invaded diverse regions of the world such as New Zealand, Australia, South Africa, North America, Argentina and Chile (Akre, Ramsay, Grable, Baird, & Stanford, 1989; Archer, 1988; MacDonald, Akre, & Keyel, 1980; Spradbery, 1973; Thomas, 1960; Tribe & Richardson, 1994). *Vespula germanica* is an opportunist

predator that also feeds on carrion and sugary substances such as fruit, honey and honeydew (Raveret Richter, 2000). At high densities, these wasps have a negative impact on biodiversity as well as on human activities, and beekeeping, in invaded areas (Bacandritsos, Papanastasiou, Saitanis, & Roinioti, 2006; Beggs, 2001; Beggs et al., 2011). Moreover, *Vespula* spp. wasps cause a painful bite for humans and may be a nuisance during outdoor activities given that they are attracted to food and garbage (Akre & MacDonald, 1986; Bacandritsos et al., 2006; Clapperton, Alspach, Moller, & Matheson,

1989). In general, the greatest damage caused by this pest occurs during summer and early fall, when the abundance of workers and the energy demand of the colony are greater (Edwards, 1980).

The eusocial trait of *Vespa* spp. and their behavioural plasticity while foraging make their control a challenge. Available management tools are scarce including baited traps and toxic baits with fipronil (Hanna, Foote, & Kremen, 2012; Harris & Etheridge, 2001; Sackmann, Rabinovich, & Corley, 2001) which need to be used with caution due to its toxicity to the environment and non-target organisms (Balança & del Visscher, 1997; Gunasekara & Troung, 2007). Recently, plant-based repellents have been proposed as a potential alternative to classic pesticides against pest wasps, in certain scenarios (Boevé, Honraet, & Rossel, 2014; Buteler, Lozada, D'Adamo, Melo, & Stadler, 2016; Zhang, Schneidmiller, & Hoover, 2013). They reported the repellent effect of numerous essential oils as well as some of their synthetic constituents against yellowjackets and paper wasps (Boevé et al., 2014). Zhang et al. (2013) demonstrated that individual terpenoids are responsible for the repellent effect of essential oils. Moreover, testing the effectiveness of individual components of essential oils as repellents is relevant from an applied perspective given that they have the advantage of having a consistent chemical composition and being easier to register as biopesticides (Isman, 2006; Maia & Moore, 2011).

The use of repellents could help reduce the damage caused by pest wasps when used in combination with attractive traps in the context of push-pull strategies or simply to keep them away from resources or residential areas. However, further understanding of how these aversive odours interfere with wasps foraging behaviour is still necessary. *V. germanica* exhibits a variety of behavioural mechanisms to locate and rapidly exploit ephemeral resources (i.e., carrion). For example, foragers are able to associate a particular food source with diverse contextual cues of a given site, allowing them to return repeatedly to that food source (D'Adamo & Lozada, 2008, 2009, 2011; Lozada & D'Adamo, 2014; Moreyra, D'Adamo, & Lozada, 2006, 2012). In addition to learning and memory processes (D'Adamo & Lozada, 2008, 2009, 2011; Lozada & D'Adamo, 2014; Moreyra et al., 2006, 2012), wasps take advantage of social communication mechanisms, guiding new foragers to a specific resource, which reduce searching time and promote rapid collective responses to new food sources. Foragers have shown to be attracted to visual and olfactory cues emanated by conspecifics (local enhancement) (D'Adamo, Corley, & Lozada, 2003; D'Adamo, Corley, Sackmann, & Lozada, 2000; Jeanne & Taylor, 2009; Raveret Richter & Tisch, 1999). Moreover, nest recruitment has also been demonstrated in this species (Lozada, D'Adamo, Buteler, & Kuperman, 2016; Overmyer & Jeanne, 1998; Santoro, Hartley, Suckling, & Lester, 2015; Schueller, Nordheim, Taylor, & Jeanne, 2010; Taylor, Schalk, & Jeannem, 2010). Such is the relevance of these mechanisms in the exploitation of resources that when social communication is interrupted, wasp arrivals to a protein bait over time change from exponential to linear and total arrivals decrease by approximately 80% (Lozada et al., 2016).

So far, wasp repellents have been studied in terms of the individual response of naïve wasps and captured in baited traps (Boevé

et al., 2014; Zhang et al., 2013). More recently, Buteler et al. (2016) took into account the role of learning and memory mechanisms at the individual level, when analysing the repellent effect of essential oils on the relocation behaviour of *V. germanica*. These authors showed that the repellent effect decreases after previous experience with the food source, in the absence of the repellent odour. Thus, the study of repellency in social insects is more complex than in non-social insects as learning, memory and social communication occur, which allow them to maximize the exploitation of that resource. For this reason, studying the response of wasps to repellents in a natural context is of particular interest in order to obtain a realistic measure of the potential use of repellents as a management tool.

In relation to the type of repellents evaluated, essential oils of plants belonging mainly to the Lamiaceae family, as well as many of its major components, have been demonstrated (Boevé et al., 2014; Buteler et al., 2016; Zhang et al., 2013). However, growing interest in natural products as a source of new insect control agents encourages the search for new repellents. Until now, the repellent effect of native plants of South America on yellowjackets has not been investigated. For example, the "paico" (*Dysphania multifida*, L.) is an aromatic and medicinal herbaceous plant belonging to the Chenopodiaceae family, of wide distribution in Argentina and Chile, and whose compounds could exhibit repellent activity. There is evidence that local people use it to ward off insects from homes (González et al., 2009). Extracts obtained from their aerial parts exhibit insecticidal activity also (Broussalis et al., 1999). In addition, its essential oil shares some components with others proven to be repellent to wasps, such as tea tree essential oil (i.e.,  $\alpha$ -terpinene and p-cymene) (Buteler et al., 2016).

The objective of the present study was to evaluate the repellent effect of the essential oil of *D. multifida* and one of its major terpene components, on the foraging behaviour of *V. germanica*. Plant essential oils are composed of several terpenoid compounds, and repellency to insects is typically enhanced by the synergistic or additive effects among individual compounds (Zhang et al., 2013). On the other hand, essential oils may be costly and difficult to obtain if there are no commercial plantations available. Moreover, they are comprised of complex mixtures which are hard to standardize for commercial and regulatory purposes (Isman, Machial, Miresmailli, & Bainard, 2007). Thus, testing individual compounds may prove useful to determine whether the use of synthetic compounds is possible, and as effective as mixtures. For this purpose, we evaluated individual behaviour of naïve wasps exposed to a food source treated with essential oil or  $\alpha$ -terpinene standard. By observing the foraging behaviour over a period of thirty minutes, we were able to gain further understanding as to how the repellent interferes with foraging mechanisms, which include relocation, local enhancement and recruitment. Finally, the repellent effect was analysed over time, as the wasps season progressed, to determine whether the effectiveness of the repellents is affected by the increase in the abundance of workers and their motivation towards the food source.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Plant material and extraction of essential oil

Plant samples of *D. multifida* were collected in three different areas close to Esquel, Argentina, and voucher specimens are deposited in the Herbarium of Aromatic Plants, Department of Natural Sciences, National University of Patagonia, Esquel. The volatile fraction of each sample was isolated by hydrodistillation of the air-dried plant material for 3 hr using a Clevenger apparatus. Yields were calculated in ml of essential oil/kg of dried material.

### 2.2 | Composition analysis of the essential oil

Essential oils were analysed using the same equipment and methodology as described previously. They were carried out on a GC-FID-MS system, Perkin Elmer Clarus 500, with one injector (split ratio: 1:100) connected by a flow splitter to two capillary columns: (a) polyethylene glycol PM ca. 20,000 and (b) 5% phenyl-95% methyl silicone, both 60 m × 0.25 mm with 25- $\mu$ m film thickness. The polar column was connected to a FID, while the non-polar column was connected to another FID and a quadrupole mass detector (70 eV) by a vent system (MSVent®). Helium was used as gas carrier at a constant flow of 1.87 ml/min. The temperature was programmed according to the following gradient: 90–225°C at 3°C/min and then isothermal for 15 min. The injector and both FIDs were set at 255°C and 275°C, respectively. The injection volume was 0.2 ml. The temperature of the transference line and the ion source was 180°C and 150°C, respectively; the range of masses was 40–300 Da (10 scan/s). Identification of the compounds was performed by comparison of the linear retention indexes (relative to a homologue C8–C20 alkane series) obtained in both columns, with those of reference compounds. Additionally, each mass spectra obtained was compared to those from usual electronic libraries and from a laboratory developed mass spectra library built up from oils of known composition. The percentage composition was achieved using the single area percentage method, without considering corrections for response factors. The lowest response obtained in both columns for each component was considered.

One of the main terpene components of *D. multifida* was tested in bioassays,  $\alpha$ -terpinene. This compound was chosen because it is commercially available, it is less toxic than its main component (ascaridole) and it has a more pleasant fragrance for potential users. The chemical standard of  $\alpha$ -terpinene (CAS number 99-86-5) ( $\geq$  95.0%) used in experiments was purchased from Sigma-Aldrich®.

### 2.3 | *Vespula germanica* wasps and study site

To assess the repellent activity of *D. multifida* essential oil and  $\alpha$ -terpinene against *V. germanica* wasps, field experiments were conducted in suburban areas from San Carlos de Bariloche (41°S, 71°W), Rio Negro, Argentina. Bioassays were carried out with free-flying foraging wasps from wild colonies, during the highest activity period

of *V. germanica* foraging wasps (February–March) in 2016. All bioassays were performed in the lakeshores of Moreno and Gutierrez lakes under similar weather conditions (sunny and still) from 10 a.m. to 5 p.m., and each bioassay was separated by at least 200 m from each other, to avoid using the same wasps, and maximize the number of colonies included in different replicates (Buteler et al., 2016). Although *Vespula vulgaris*, a similar wasp occurs in the study area, all wasps observed at the baits corresponded to *V. germanica*.

### 2.4 | Choice tests

Choice tests were performed in order to assess the behavioural response of naïve wasps to essential oil and  $\alpha$ -terpinene. Two food baits were simultaneously offered to test the preference of foraging wasps for treated or untreated baits, according to procedures outlined by Buteler et al. (2016). Bovine meat was used as attractant since a previous study in Patagonia has shown that it is the most attractive bait to *V. germanica* wasps throughout wasp season (Sackmann et al., 2001). The bait consisted of 15 g of minced meat within a plastic dish (4 cm diameter) placed above a larger white dish (9.5 cm diameter) with a filter paper (Whatman N°1). Treatments consisted of 100  $\mu$ l of essential oil or  $\alpha$ -terpinene applied onto the filter paper. Both products were carefully distributed on the exposed surface of the filter paper, without coming in contact with the meat. Treated and untreated baits were simultaneously placed on the ground separated by 0.5 m, and the number of wasps that landed on each bait was recorded during a lapse of 10 min. The position of the baits was randomized during the experiments. In order to avoid local enhancement effects, all wasps that landed on the bait were immediately removed with a manual aspirator (Lozada et al., 2016). Bioassays were replicated 15 times with each treatment at varying locations.

### 2.5 | No-choice tests

No-choice experiments were performed to evaluate the response of foraging wasps to treated and untreated baits, separately. Three treatments were tested *D. multifida* essential oil,  $\alpha$ -terpinene and untreated bait. Treated and untreated baits were prepared using the same procedure as described previously for choice bioassays. Individual baits were randomly placed on the lakeshore at sites separated by at least 200 m from each other, to work with wasps from different colonies, as in Buteler et al. (2016). In order to assess naïve wasps' response, we recorded the arrival time (i.e., landing) of the first wasp on the bait. Subsequently, we recorded both the arrival time of every wasp within a 30-min interval and the total number of arrived wasps, in order to evaluate the repellent effect on the relocation of a resource as well as on the collective foraging strategies. Thus, foragers that landed on the bait were not removed, to include the effect of local enhancement in the bioassay. Each treatment was replicated 15 times, at varying locations within the sites.

During the experiment, all wasps were allowed to collect food, fly back to the nest and return to the bait, as in Lozada et al. (2016).

## 2.6 | Data analysis

A chi-square goodness-of-fit test was conducted to compare the number of wasps on treated and untreated food baits, for each treatment in choice bioassays. Chi-square independence test was used to compare the frequency of wasps on each type of bait between essential oil and  $\alpha$ -terpinene treatment. For no-choice bioassays, differences in the landing time of the first wasp among treatments, as well as total number of wasps, were evaluated by means of Kruskal-Wallis tests. For multiple comparisons among treatments, we applied Dunn test with  $p$ -values adjusted with the Sidák method.

At the same time, we analysed the time series resulting from the record of the arrival time of each wasp to treated and untreated baits during no-choice bioassays. We characterized these time series by fitting them with linear or non-linear functions according to the exhibited behaviour, using a least squares scheme. Each time series consisted of a small number of events, so we performed a statistical analysis of several series. Despite the non-linear behaviour of the untreated cases, we found that a linear fit was enough for establishing the differences in the arrival pattern associated with each treatment. Considering that the arrival rate increases with time in these cases due to local enhancement or recruitment (Lozada et al., 2016), we measured the arrival rate at the beginning, that is, the lowest one for each experiment with untreated baits. The fit allowed us to estimate an arrival rate that served as an accurate indicator of the differences between the considered cases. In order to avoid fluctuations due to day-to-day variations, we started by comparing the data within the same journey measurements. From the recorded intra-day arrival times of wasp to the feeder, we calculated the mean arrival by adjusting them by means of least squares calculation. We also made inter-day cross-analysis of the data Spearman's rank correlation  $\rho$  was used to analyse the association between the total number of wasps per no-choice experiment and the sampling time, for each treatment.

All statistical tests were conducted in R version 3.5.0 (R Development Core Team, 2018).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Chemical composition of *Dysphania multifida* essential oil

Table 1 shows the constituents identified and their percentage composition. Totals of 13 compounds in the oil from aerial parts of *D. multifida* were identified, representing 99.7% of the composition. The main constituents were ascaridole (61.1%),  $\alpha$ -terpinene (18.5%) and p-cymene (12.7%).

### 3.2 | Choice tests

We found significant differences in the number of foraging wasps that visited each type of bait during choice tests. A strong avoidance of food baits treated with the essential oil ( $\chi^2 = 70.04$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.0001$ ) as well as with  $\alpha$ -terpinene ( $\chi^2 = 63.43$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.0001$ ) was observed (Figure 1). When wasps had a choice between untreated baits or baits treated with essential oil, 92.4% of wasps tested chose to land on untreated baits. We observed a mean number of  $5.93 \pm 0.8$  wasps per test in untreated baits and  $0.47$  wasps per test  $\pm 0.16$  in treated baits. Similarly, 88.9% of wasps chose untreated baits during tests with  $\alpha$ -terpinene (mean number of wasps per test  $\pm SE$ , untreated baits:  $6.27 \pm 0.5$ , treated baits:  $0.8 \pm 0.2$ ). No significant differences were observed in the repellent effect between essential oil and  $\alpha$ -terpinene ( $\chi^2 = 0.95$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.32$ ).

### 3.3 | No-choice tests

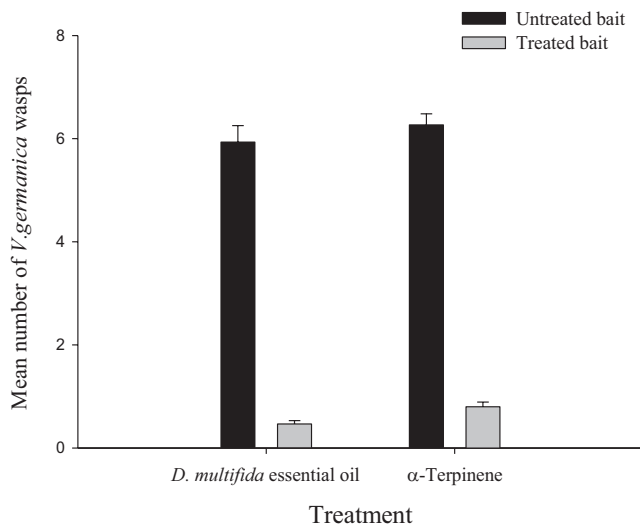
#### 3.3.1 | Arrival time of the first wasp

There were significant differences in the arrival time of the first wasp to the food bait among treatments ( $\chi^2 = 19.4$ ;  $df = 2$ ,  $p < 0.0001$ ). Wasps took a significantly longer time to arrive at baits treated with

Peak number	RT	Area%	Compound
1	9,797	0.1	CARENE < DELTA-2->
2	10,283	18.5	TERPINENE < ALPHA->
3	10,491	12.7	CYMENE < PARA->
4	10,581	0.2	LIMONENE
5	11,352	0.2	TERPINENE < GAMMA->
6	13,915	0.1	CYCLOHEXANEDIONE < 3-METHYL-1,2->
7	13,949	0.1	LINALOOL < DEHYDRO->
8	15,392	0.1	MENTHA-2,8-DIEN-1-OL < CIS-PARA->
9	18,128	61.1	ASCARIDOLE
10	18,200	0.5	ASCARIDOLE EPOXIDE
11	18,491	0.1	7-OXABICYCLO[4.1.0]HEPTAN-2-ONE, 3-METHYL-6-(1-METHYLETHYL)
12	20,005	0.1	CARVACROL
13	20,435	6.1	PIPERITONE EPOXIDE < CIS->(EPOXIDE VS. IPP)

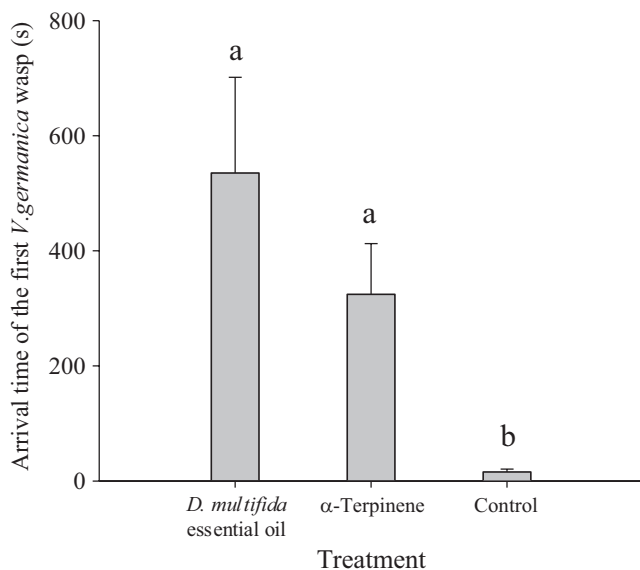
**TABLE 1** Chemical composition of the essential oil from aerial parts of *Dysphania multifida*





**FIGURE 1** Number of *Vespa germanica* foraging wasps registered on treated and untreated food baits in each treatment (*Dysphania multifida* essential oil or  $\alpha$ -terpinene) during choice bioassays (mean + SE). \*Indicates significant differences within each treatment,  $\alpha = 0.05$ ;  $n = 20$

*D. multifida* essential oil ( $p < 0.001$ ) or  $\alpha$ -terpinene ( $p < 0.01$ ) than at control baits. On average, the time elapsed until the first landing was  $15.6 \pm 5.1$  s on control baits,  $535.1 \pm 166.4$  s on baits treated with essential oil and  $324.5 \pm 88.1$  s on baits treated with  $\alpha$ -terpinene (Figure 2). No significant differences were observed between the arrival time on baits treated with essential oil and baits treated with  $\alpha$ -terpinene ( $p = 0.69$ ). Moreover, in 26.6% and 6.7% of the bioassays consisting of baits treated with essential oil and  $\alpha$ -terpinene, respectively, no wasp landings were recorded for the duration of the



**FIGURE 2** Time elapsed until the landing of the first *Vespa germanica* wasp on control baits and baits treated with *Dysphania multifida* essential oil or  $\alpha$ -terpinene in arrival no-choice bioassays (mean + SE). Different letters depict significant differences among treatments,  $\alpha = 0.05$ ;  $n = 15$

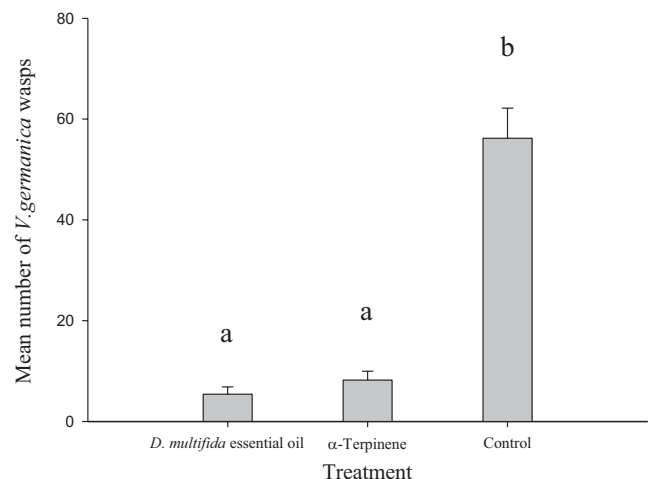
bioassay. On the contrary, control baits attracted landing wasps in all cases.

### 3.3.2 | Total number of arriving wasps

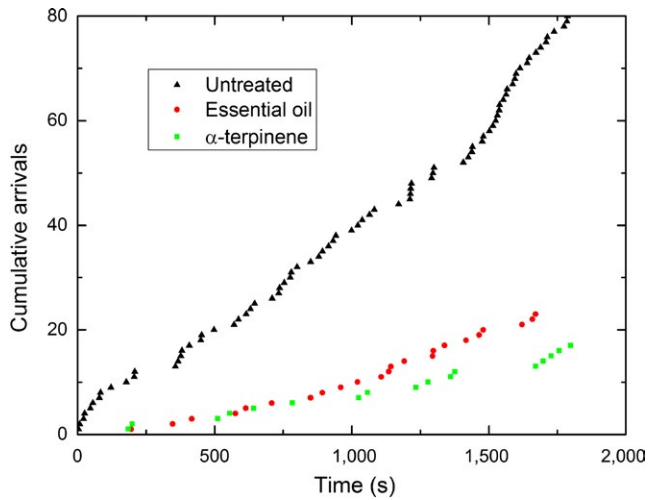
The total number of *V. germanica* wasps which landed on the bait within a 30-min interval differed among treatments ( $\chi^2 = 25.2$ ;  $p < 0.0001$ ). Significantly fewer wasps arrived to the bait when it was treated with either product than when it was untreated (*D. multifida* essential oil:  $p < 0.0001$ ,  $\alpha$ -terpinene:  $p < 0.001$ ) (Figure 3). The mean number of landings per test on baits was  $56.2 \pm 5.9$  on control baits,  $5.4 \pm 1.4$  on baits treated with essential oil and  $8.2 \pm 1.7$  on  $\alpha$ -terpinene treated baits. No significant differences were found in the mean number of landing wasps per test between essential oil and  $\alpha$ -terpinene treatments ( $p = 0.91$ ).

### 3.3.3 | Arrival patterns

The wasp arrival patterns were observed during 30 min in both untreated and treated baits. Figures 4–7 show the cumulative number of wasp arrived as a function of time. Figure 4 shows as an example, data obtained in one day from the three treatments, to illustrate the difference in the curves. Not all experiments were done on the same day but all treatments were replicated each day, to account for variations across different days in the total number of wasps, given that as season progresses the number of wasps increases. However, as shown by the statistics and the figures, even though the total number of wasps in control treatments increases with the season, the patterns and the differences between treatments remain similar across the season. Figures 5 through 6 show in one graph data from the same treatments obtained throughout the season, to illustrate that the curves are similar on different days for the same treatment. As observed, the arrival pattern for the untreated baits differs considerably from those corresponding

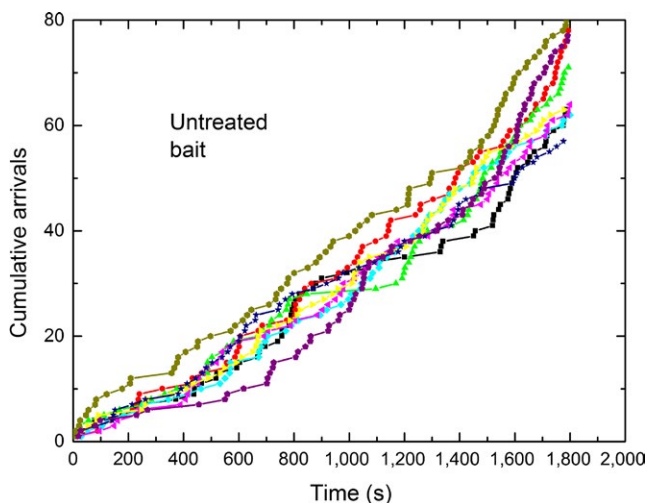


**FIGURE 3** Number of *Vespa germanica* foraging wasps that landed on control and treated baits within a 30-min interval in no-choice tests (mean + SE). Letters depict significant differences among treatments,  $\alpha = 0.05$ ;  $n = 15$

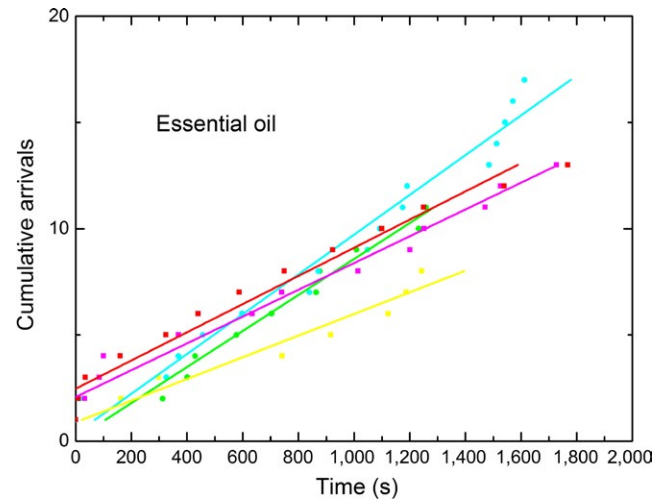


**FIGURE 4** Cumulative number of wasp arrivals within a lapse of 1,800 s in no-choice tests. Figure shows only a representative set of data of same day experiments and three different set-ups

to treated baits. The untreated bait showed a greater number of arrivals as well as a much shorter time interval since the beginning of the study and the arrival of the first wasp to the bait. This fact was already discussed in Lozada et al. (2016) who demonstrated that this arrival pattern could be explained by recruitment both at the resource and at the nest. However, when baits were treated with essential oil or  $\alpha$ -terpinene (Figures 6 and 7), the general arrival pattern differed from untreated baits, and the data were better fitted by a linear function by means of standard mean squares procedures. The arrival pattern in untreated baits exhibited a non-linear behaviour (exponential/quadratic) (Figure 5), and data were fitted using the Levenberg–Marquardt algorithm. In this case, we observed that proposing a second order polynomial or a more general exponential function showed no significant differences. The

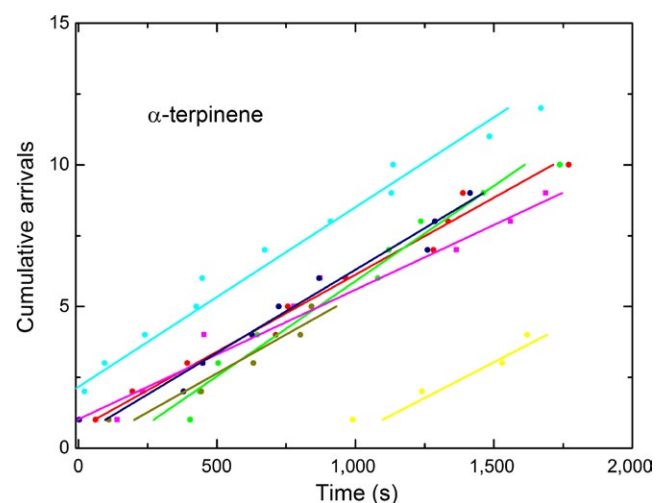


**FIGURE 5** Cumulative number of wasp arrivals within a lapse of 1,800 s in no-choice bioassays. The data correspond to several experiments with untreated (control) baits. Different experimental data sets are represented by different colours. The arrival pattern is non-linear in each case



**FIGURE 6** Cumulative number of wasp arrivals within a lapse of 1,800 s in no-choice tests. The data correspond to several experiments with baits treated with paico essential oil. Different experimental data sets are represented by different colours. The arrivals pattern can be adjusted with a linear fit

Pearson's coefficient in the three cases was within the following intervals: untreated (0.977–0.995), essential oil (0.975–0.989) and  $\alpha$ -terpinene (0.991–0.961). In each of the last two cases, we observed a set of data, corresponding to the same day, that could not be well fitted, probably due to a lower overall number of wasps that day. The corresponding coefficient was 0.912 and 0.8973 for essential oil and  $\alpha$ -terpinene, respectively. Table 2 shows the arrival rate of wasps to each type of bait. In the case of treated baits, the data were obtained from a linear fit of the whole series. In the case of untreated baits, the values correspond to the lowest arrival rate, always registered as a linear fit of the data corresponding to the first 10 min of each experiment.



**FIGURE 7** Cumulative number of wasp arrivals within a lapse of 1,800 s in no-choice tests. The data correspond to several experiments with baits treated with  $\alpha$ -terpinene. Different experimental data sets are represented by different colours. The arrivals pattern can be adjusted with a linear fit

**TABLE 2** Calculated arrival rate for each treatment in no-choice experiments (wasps per second)

Arrival rate	Untreated	Essential oil	$\alpha$ -terpinene
Mean	$4.27 \times 10^{-2} \pm 2.9 \times 10^{-3}$	$6.93 \times 10^{-3} \pm 4.0 \times 10^{-4}$	$5.76 \times 10^{-3} \pm 4.6 \times 10^{-4}$
Minimum	$3.12 \times 10^{-2} \pm 3.7 \times 10^{-3}$	$5.12 \times 10^{-3} \pm 2.1 \times 10^{-4}$	$5.01 \times 10^{-3} \pm 4.4 \times 10^{-4}$
Maximum	$5.81 \times 10^{-2} \pm 22.6 \times 10^{-3}$	$9.31 \times 10^{-3} \pm 4.1 \times 10^{-4}$	$6.73 \times 10^{-3} \pm 4.2 \times 10^{-4}$

Nevertheless, as the lapses corresponding to each experiment were only 30 min long, an estimation of the mean arrival rate by means of linear fits was accurate enough for all the cases to establish the differences (Figures 6 and 7).

### 3.4 | Repellent activity over time

We found a significant positive correlation between the total number of *V. germanica* wasps in untreated baits and sampling time ( $\rho = 0.68$ ;  $p = 0.005$ ). The number of wasps recorded in no-choice bioassays increased across the sampling period (from 15 February 2016 to 15 March 2016). On the contrary, no correlation in the

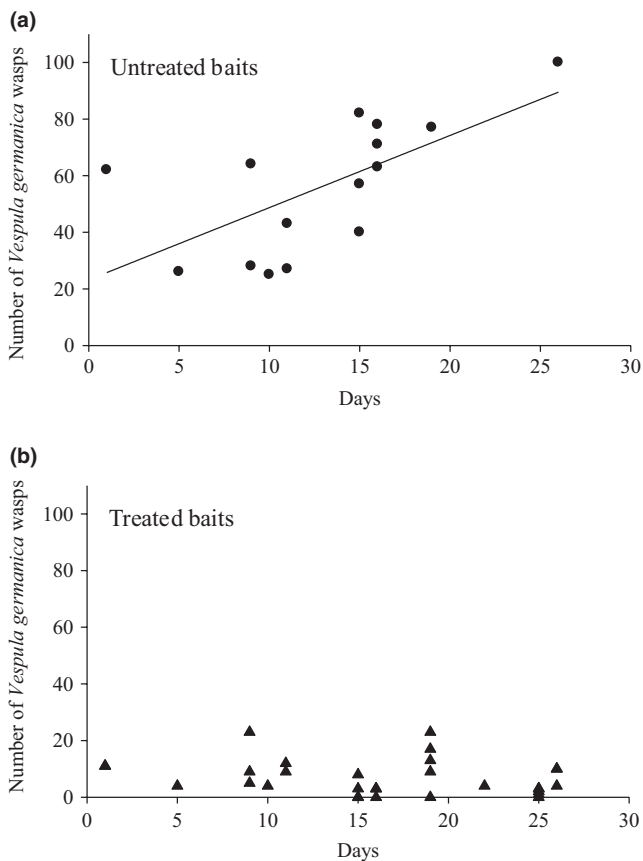
number of wasps arrivals was observed for baits treated with essential oil and  $\alpha$ -terpinene (*D. multifida* essential oil:  $\rho = -0.28$ ,  $p = 0.31$ ;  $\alpha$ -terpinene:  $\rho = -0.04$ ;  $p = 0.87$ ) where the total number of wasps arriving to the baits was similar across the sampling period. Thus, the data from both treatments were pooled and shown in Figure 8 ( $\rho = -0.24$ ;  $p = 0.19$ ).

## 4 | DISCUSSION

The present study is the first one to evaluate the repellent effect of the essential oil of *D. multifida* and one of its components,  $\alpha$ -terpinene, on *V. germanica* wasps. The results indicate that both the essential oil and the  $\alpha$ -terpinene act as powerful aversive stimuli for naïve wasps since they generate an avoidance response to treated food sources. These results agree with previous studies which demonstrated that repellents have an effect on individual behaviour of *V. germanica* wasps affecting their food preferences and their landing responses (Buteler et al., 2016).

In this study,  $\alpha$ -terpinene showed an efficacy similar to that of the pure essential oil of paico when applied at the same amounts. Although  $\alpha$ -terpinene represents approximately one-fifth of the total composition of the essential oil, it may contribute significantly to its repellent effect and could be used as an alternative, if *D. multifida* oil was unavailable or more expensive. Also,  $\alpha$ -terpinene has low oral acute toxicity (EPA CLASS 4) and it is used as a flavouring agent in the cosmetics and food industry, making it a good, alternative for the pure essential oil. This is particularly relevant as individual terpenoids may be more readily available as commercial products, and lower in cost, than pure essential oils. On the other hand, essential oils may result in more effective repellents than their individual constituents, since synergism has been observed in mixtures, in comparison with individual compounds (Buteler et al., 2016). However, the use of chemical standards avoids the chemical variability that characterizes essential oils, which can vary according to the phenological stage of the plant, the place of origin, plant growing conditions, the plant part from which it is extracted, among other factors (Isman, 2006).

As shown in the present study, repellents are not 100% effective since a small number of wasps collected food from treated baits. However, significant differences in the number of wasps present at the baits were observed between control and treated baits. These results suggest that repellents are effective even when social communication is present. The curves of arrivals to the untreated bait describe a non-linear pattern, which indicates the existence of local enhancement and recruitment to the food



**FIGURE 8** Total number of *Vespula germanica* wasps per experiment throughout the sampling period in no-choice tests (from 15 February 2016 to 15 March 2016). (a) Untreated baits ( $\rho = 0.68$ ,  $n = 15$ ,  $p = 0.005$ ). (b) Treatment with *Dysphania multifida* essential oil and treatment with  $\alpha$ -terpinene, graphed together (*D. multifida* essential oil:  $\rho = -0.28$ ,  $p = 0.31$ ;  $\alpha$ -terpinene:  $\rho = -0.04$ ;  $n = 25$ ,  $p = 0.87$ ). Spearman's rank correlation  $\rho$ ,  $\alpha = 0.05$

source, in accordance with what was observed by Lozada et al. (2016). Meanwhile, the arrival pattern was linear and the slope of the curve significantly lower in treated baits. This is probably due, in part, to two reasons: on the one hand, the active avoidance response of naïve wasps, and on the other, a decrease in local enhancement as a result of the smaller number of wasps that manage to land on the resource. It is also likely that the repellent is interfering with recruitment. In fact, the linear curve observed matches the arrival pattern observed by Lozada et al. (2016) in absence of local enhancement and recruitment processes. However, further studies are needed to assess whether these wasps recruit conspecific to sources treated with repellent.

As the season progresses, the abundance of workers and their motivation for protein increase, as a consequence of the increasing number of larvae and the reduction in the abundance of prey. This was supported by the fact that the total number of wasps arriving at control baits increased as the season progressed. However, the number of wasps arriving to treated baits remained low throughout the season, demonstrating that the effectiveness of the repellent remains similar even as the attractiveness of the bait as well as foragers' density increase.

Due to their low persistence in the environment, essential oils are environmentally sound alternatives to organic synthetic pesticides. However, this trait makes them costly due to low stability and rapid volatilizations. Thus, there is a marked interest in the scientific community to develop terpenoid and essential oil formulations that result in slow, controlled release of these volatile compounds (El Asbahani et al., 2015; Bakry et al., 2016; Clerici et al., 2018).

Based on the results from the current study, *D. multifida* essential oil and  $\alpha$ -terpinene have potential to be used as *V. germanica* repellents when applied in close proximity to a food source. The use of these repellents in close proximity to the resource that needs to be protected would ensure a negligible effect to non-target organisms. For example, they could be used in areas close to food and garbage, or applied to cattle or beehives. Further research will investigate the potential of these repellents and their formulations in apiaries to protect honeybee hives from wasps' attacks, in conjunction with baited traps. Attractants could potentiate the repellent effect in a push-pull strategy within integrated management of this damaging pest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Agencia Nacional de Promoción Científica, Project PICT 2016 0293.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Micaela Buteler and Mariana Lozada conceived research. María B. Yossen, Mariana Lozada and Micaela Buteler conducted experiments. Silvia González and Bruno Gastaldi obtained essential oil and analysed it. María B. Yossen and Marcelo N. Kuperman conducted statistical analyses. Micaela Buteler and Mariana Lozada secured funding. All authors participated in the writing of the manuscript.

## ORCID

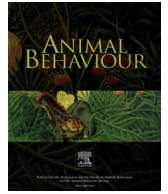
Micaela Buteler  <https://orcid.org/0000-0002-7252-8424>

## REFERENCES

- Akre, R. D., & MacDonald, J. F. (1986). Biology, economic importance and control of yellow jackets. In S. B. Vinson (Ed.), *Economic Impact and Control of Social Insects* (pp. 421–425). New York, NY: Praeger Publisher.
- Akre, R. D., Ramsay, C., Grable, A., Baird, C., & Stanford, A. (1989). Additional range extension by the German yellowjacket, *Paravespula germanica* (Fabricius), in North America (Hymenoptera: Vespidae). *Pan-Pacific Entomologist*, *65*, 79–88.
- Archer, M. E. (1988). The world distribution of the Euro-Asian species of *Paravespula* (Hymenoptera: Vespinae). *Entomologist's Monthly Magazine*, *134*, 279–284.
- Bacandritsos, N., Papanastasiou, I., Saitanis, C., & Roinioti, E. (2006). Three non-toxic insect traps useful in trapping wasps enemies of honey bees. *Bulletin of Insectology*, *59*, 135–145.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*, 143–182. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>
- Balança, G., & de Visscher, M. N. (1997). Effects of very low doses of fipronil on grasshoppers and non-target insects following field trials for grasshopper control. *Crop Protection*, *16*, 553–564. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(97\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(97)00028-8)
- Beggs, J. (2001). The ecological consequences of social wasps (*Vespula* spp.) invading an ecosystem that has an abundant carbohydrate resource. *Biological Conservation*, *99*, 17–28. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(00\)00185-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00185-3)
- Beggs, J. R., Brockerhoff, E. G., Corley, J. C., Kenis, M., Masciocchi, M., Muller, F., ... Villemant, C. (2011). Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. *Biocontrol*, *56*, 505–526. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9389-z>
- Boevé, J. L., Honraet, K., & Rossel, B. (2014). Screening of repellents against vespid wasps. *Insects*, *5*, 272–286. <https://doi.org/10.3390/insects5010272>
- Brousalis, A., Ferraro, G., Martino, V., Pinzón, R., Coussio, J., & Calle Alvarez, J. (1999). Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, *67*, 219–223. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00216-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00216-5)
- Buteler, M., Lozada, M., D'Adamo, P., Melo, R., & Stadler, T. (2016). Behavioural responses of *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) wasps exposed to essential oils. *Austral Entomology*, *55*, 308–315. <https://doi.org/10.1111/aen.12187>
- Clapperton, B. K., Alspach, P. A., Moller, H., & Matheson, A. G. (1989). The impact of common and German wasps (Hymenoptera: Vespidae) on the New Zealand beekeeping industry. *New Zealand Journal of Zoology*, *16*, 325–332. <https://doi.org/10.1080/03014223.1989.10422897>
- Clerici, D. J., de Souza, M. E., Quatrin, P. M., Vianna Santos, R. C., Costa-Leonardo, A. M., Ourique, A. F., ... Wagner, R. (2018). Effects of nano-structured essential oils against subterranean termites (*Coptotermes gestroi*). *Journal of Applied Entomology*, *142*, 406–412. <https://doi.org/10.1111/jen.12494>
- D'Adamo, P., Corley, J. C., & Lozada, M. (2003). Conspecifics enhance attraction of *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) foragers to food baits. *Annals of the Entomological Society of America*, *96*, 685–689. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2003\)096\[0685:CEAOVG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2003)096[0685:CEAOVG]2.0.CO;2)
- D'Adamo, P., Corley, J. C., Sackmann, P., & Lozada, M. (2000). Local enhancement in the wasp *Vespula germanica*: Are visual cues all that

- matter? *Insectes Sociaux*, 47, 289–291. <https://doi.org/10.1007/PL00001717>
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2008). Foraging behaviour in *Vespula germanica* wasps re-locating a food source. *New Zealand Journal of Zoology*, 35, 9–17. <https://doi.org/10.1080/03014220809510099>
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2009). Flexible foraging behavior in the invasive social wasp *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102, 1109–1115. <https://doi.org/10.1603/008.102.0620>
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2011). Cognitive plasticity in foraging *Vespula germanica* wasps. *Journal of Insect Science*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.1673/031.011.10301>
- Edwards, R. (1980). *Social wasps: Their biology and control*. London, UK: Rentokil Ltd Publishing.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E. H., Casabianca, H., ... Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483, 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- González, S., Huaiquino, L., González, A., vanBaren, C., DiLeo Lira, P., & Bandoni, A. (2009). Uso popular del paico y composición química de su aceite esencial en la zona de Esquel (Chubut, Argentina). In M. Pochettino, A. Ladio, & P. Arenas (Eds.), *Tradiciones y transformaciones en etnobotánica* (pp.304–307). San Salvador de Jujuy, Argentina: CYTED Publisher.
- Gunasekara, A. S., & Troung, T. (2007). *Environmental fate of fipronil*. San Diego, CA: California Environmental Protection Agency Publishing.
- Hanna, C., Foote, D., & Kremen, C. (2012). Short- and long-term control of *Vespula pensylvanica* in Hawaii by fipronil baiting. *Pest Management Science*, 68, 1026–1033. <https://doi.org/10.1002/ps.3262>
- Harris, R. J., & Etheridge, N. D. (2001). Comparison of baits containing fipronil and sulfluramid for the control of *Vespula* wasps. *New Zealand Journal of Zoology*, 28, 39–48. <https://doi.org/10.1080/03014223.2001.9518255>
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Isman, M. B., Machial, C. M., Miresmailli, S., & Bainard, L. D. (2007). Essential oil-based pesticides: New insights from old chemistry. In H. Ohkawa, H. Miyagawa, & P. W. Lee (Eds.), *Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety* (pp. 201–209). Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Jeanne, R. L., & Taylor, B. J. (2009). Individual and social foraging in social wasps. In S. Jarau, & M. Hrncir (Eds.), *Food exploitation by social insects: Ecological, behavioral and theoretical approaches* (pp. 53–79). Boca Raton, FL: CRC Press Publisher.
- Lozada, M., & D'Adamo, P. (2014). Learning in an exotic social wasp while relocating a food source. *Journal of Physiology-Paris*, 108, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.05.006>
- Lozada, M., D'Adamo, P., Buteler, M., & Kuperman, M. N. (2016). Social learning in *Vespula germanica* wasps: Do they use collective foraging strategies? *PLoS One*, 11, e0152080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152080>
- MacDonald, J. F., Akre, R. D., & Keyel, R. E. (1980). The German yellow-jacket *Vespula germanica* problem in the United States (Hymenoptera: Vespidae). *Bulletin of Entomological Society of America*, 26, 436–444. <https://doi.org/10.1093/besa/26.4.436>
- Maia, M. S., & Moore, S. J. (2011). Plant-based insect repellents: A review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 10, S11. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S11>
- Moreyra, S., D'Adamo, P., & Lozada, M. (2006). Odour and visual cues utilized by German yellow-jackets (*Vespula germanica*) while re-locating protein or carbohydrate resources. *Australian Journal of Zoology*, 54, 393–397. <https://doi.org/10.1071/ZO06029>
- Moreyra, S., D'Adamo, P., & Lozada, M. (2012). Cognitive processes in *Vespula germanica* wasps (Hymenoptera: Vespidae) when relocating a food source. *Annals of the Entomological Society of America*, 105, 128–133. <https://doi.org/10.1603/AN11097>
- Overmyer, S. L., & Jeanne, R. L. (1998). Recruitment to food by the German yellowjacket, *Vespula germanica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42, 17–21. <https://doi.org/10.1007/s002650050407>
- Core Team, R. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/>
- Raveret Richter, M. (2000). Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behaviour. *Annual Review of Entomology*, 45, 121–150. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.121>
- Raveret Richter, M. R., & Tisch, V. L. (1999). Resource choice of social wasps: Influence of presence, size and species of resident wasps. *Insectes Sociaux*, 46, 131–136. <https://doi.org/10.1007/s000400050123>
- Sackmann, P., Rabinovich, M., & Corley, J. C. (2001). Successful removal of the European wasp by toxic baiting in NW Patagonia. *Journal of Economic Entomology*, 94, 811–816. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.4.811>
- Santoro, D., Hartley, S., Suckling, D. M., & Lester, P. J. (2015). Nest-based information transfer and foraging activation in the common wasp (*Vespula vulgaris*). *Insectes Sociaux*, 62, 207–217. <https://doi.org/10.1007/s00040-015-0395-5>
- Schueller, T. I., Nordheim, E. V., Taylor, B. J., & Jeanne, R. L. (2010). The cues have it; nest-based, cue-mediated recruitment to carbohydrate resources in a swarm-founding social wasp. *Naturwissenschaften*, 97, 1017–1022. <https://doi.org/10.1007/s00114-010-0712-9>
- Spradbery, J. P. (1973). *Wasps: An account of the biology and natural history of the solitary and social wasps*. Seattle, WA: University of Washington Press.
- Taylor, B., Schalk, R., & Jeannem, R. (2010). Yellowjackets use nest-based cues to differentially exploit higher-quality resources. *Naturwissenschaften*, 97, 1041–1046. <https://doi.org/10.1007/s00114-010-0724-5>
- Thomas, C. R. (1960). *The European wasp (Vespula germanica Fab.) in New Zealand*. Wellington, New Zealand: Department of Scientific and Industrial Research Information. Series No. 27.
- Tribe, G. D., & Richardson, D. M. (1994). The European wasp, *Vespula germanica* (Fabricius) (Hymenoptera: Vespidae), in southern Africa and its potential distribution as predicted by ecoclimatic matching. *African Entomology*, 2, 1–6.
- Zhang, Q. H., Schneidmiller, R. G., & Hoover, D. R. (2013). Essential oils and their compositions as spatial repellents for pestiferous social wasps. *Pest Management Science*, 69, 542–552. <https://doi.org/10.1002/ps.3411>

**How to cite this article:** Yossen B, Lozada M, Kuperman MN, Gonzalez S, Gastaldi B, Buteler M. Essential oils as vespidae wasp repellents: Implications for their use as a management strategy. *J Appl Entomol*. 2019;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/jen.12631>



## Foraging experience modulates response to aversive odour cues in social wasps

María B. Yossen, Micaela Buteler, Mariana Lozada\*

Laboratorio Ecotono, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA), CONICET - Universidad Nacional Del Comahue, San Carlos de Bariloche, Argentina

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 November 2019  
Initial acceptance 13 January 2020  
Final acceptance 7 February 2020

MS. number: A19-00789

#### Keywords:

associative learning  
aversive odour  
behavioural plasticity  
decision making  
foraging behaviour  
*Vespula germanica*

Experience can modify how animals respond to relevant stimuli from their environment, for example, through associative learning. In particular, odour stimuli play a central role in foraging by influencing decision making. Numerous studies have shown that odours can acquire relevance for an animal by becoming associated with food after appetitive experience. Therefore, studying to what extent learning can modulate the behavioural response to olfactory stimuli is essential to improve our understanding about the role of experience in food exploitation in nature. Here, we evaluated whether foraging experience can modulate the response of *Vespula germanica*, a food generalist and opportunistic eusocial wasp, towards an aversive odour. Through field experiments, we evaluated the response of naïve and experienced wasps towards an aversive odour under different scenarios, to also examine how these changes affect foraging decisions. Both naïve wasps and wasps that had foraging experience in the absence of the aversive odour were not attracted to the odour alone and avoided meat sources paired with this cue. However, wasps that had foraging experience with the aversive odour showed an opposite behavioural pattern; they preferred meat sources with the aversive odour and were equally attracted to this odour and the meat source. The behavioural repertoire (i.e. approaches, landings and search behaviour) elicited by the aversive odour after experience with it indicates that change in the response was due to associative learning, leading the odour which was initially repellent, to become attractive. Interestingly, the change in the aversive odour's valence occurred after one collecting experience and three to five visits promoted long-term memory of the odour. In conclusion, our results show that spontaneous responses to odours can be modulated by experience and provide new insights about learning and memory abilities of social wasps in relation to olfactory cues.

© 2020 The Association for the Study of Animal Behaviour. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

The ability of animals to adjust their behaviour based on their experience is crucial to deal with changing and unexpected situations of the environment and, ultimately, to survive (Dukas, 2013; Snell-Rood, 2013). Experience can affect how individuals respond to certain stimuli or particular situations from their environment, and more knowledge on how experience modulates behaviour is relevant to understand a variety of aspects of the animal's life, such as foraging (Jernigan et al., 2019; Saleh & Chittka, 2006; Shettleworth, 2001). While foraging, olfactory stimuli play a central role in finding food resources and decision making, for example, to decide which items are appropriate and which ones to

avoid. A growing number of studies show that the meaning of certain olfactory cues can be learned through associative learning (e.g. Dukas, 2008; Vinauger, Lahondère, Cohuet, Lazzari, & Riffell, 2016). For example, odour cues coupled with a food source can acquire behavioural significance (or even a different behavioural meaning) for an animal by becoming associated with the resource after appetitive experience (Giurfa, 2015; Hartlieb, Anderson, & Hansson, 1999; Shettleworth, 2010). These associations can lead to long-lasting olfactory memories that guide future foraging decisions (e.g. food acceptance and choice) (Menzel, 1999, 2009). Thus, relatively simple associative mechanisms can modify (even drastically) behavioural patterns, leading to notable impacts on decision making and food exploitation (e.g. Arenas & Farina, 2012; Moreyra, D'Adamo, & Lozada, 2014; Moreyra & Lozada, 2018; Saverschek & Roces, 2011).

Among insects, social wasps offer an interesting model for the study of behavioural plasticity in a foraging context. Some *Vespula*

\* Correspondence: M. Lozada, Laboratorio Ecotono, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (CONICET-UNComahue), Pasaje Gutiérrez 1125, 8400, San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

E-mail addresses: [lozadam@comahue-conicet.gob.ar](mailto:lozadam@comahue-conicet.gob.ar), [mariana.lozada@gmail.com](mailto:mariana.lozada@gmail.com) (M. Lozada).

species, such as *Vespula germanica*, have successfully invaded several temperate regions around the world (Akre, Ramsay, & Grable, 1989; MacDonald, Akre, & Keyel, 1980; Tribe & Richardson, 1994). Colonies of this species have an annual life cycle; founding queens build nests in late spring (usually underground), which can reach sizes of thousands of individuals, and they die in autumn, after the emergence of new queens. Mated queens will overwinter until the following spring (Edwards, 1980). Foragers of *V. germanica* are opportunistic predators and gatherers (Jeanne & Taylor, 2009). Through arthropod hunting and scavenging, they collect proteins to feed developing larvae, while sugar-rich sources (e.g. fruit, honeydew) provide food for themselves (Akre, 1982; Raveret Richter, 2000). There is evidence that foragers can travel up to 200 m from the nest searching for food (Edwards, 1980). Once a stationary food source (e.g. carrion) is discovered, foragers often return to the foraging site repeatedly, even though food is no longer there (e.g. Lozada & D'Adamo, 2011). Diverse learning and memory skills were found to underlie this relocation behaviour (e.g. Lozada & D'Adamo, 2014; Wilson-Rankin, 2014). Foragers can learn to associate contextual and visual cues (colours and patterns) with food sources, which help them to relocate the exact microsite where food was gathered, even after 24 h (D'Adamo & Lozada, 2008, 2011, 2003; Lozada & D'Adamo, 2009; Moreyra, D'Adamo, & Lozada, 2016). Moreover, while foraging on carrion, learning is strongly influenced by the first collecting experience with a given resource. It has been shown that only a single collecting visit can significantly alter future wasp's choices (Lozada & D'Adamo, 2006, 2011; Moreyra & Lozada, 2018).

Although much has been studied about how social wasps learn visual and contextual cues (e.g. Lozada & D'Adamo, 2014), relatively little is known about olfactory plasticity of these wasps and the role of learned odours on the location of food sources in the field. Olfactory stimuli are involved in search behaviour of both protein and carbohydrate sources at the individual level (Raveret Richter, 2000), and also play a central role in recruitment strategies (Lozada, D'Adamo, Buteler, & Kuperman, 2016; Overmyer & Jeanne, 1998; Santoro, Hartley, Suckling, & Lester, 2015). Recently, it has been demonstrated that social wasps are able to learn to associate odours with carbohydrate-rich sources (El-Sayed, Jósvali, Brow, Twidle, & Suckling, 2018; Elmquist & Landolt, 2018; McPherson & Mills, 2007). For example, a laboratory study has shown that the attraction response of *Polistes dominula* wasps towards fermented fruit odours increased after appetitive experiences with these odours (Elmquist & Landolt, 2018). Evidence of odour–food associative learning was also found in natural populations of *V. germanica* and *Vespula vulgaris* in New Zealand, where wasps are attracted by certain odour cues (often associated with aphid honeydew) only when these cues occur in their environment (El-Sayed, Jósvali, Brown, Twidle, & Suckling, 2018). However, it is still unknown whether the wasps' response to odours can also be modified by associative learning and how changes in the response as a result of associative processes impact foraging decisions.

Aversive odour cues provide an interesting case to study how behavioural responses to olfactory stimuli in a foraging scenario can be modulated by experience. In insects, repellent odours can affect foraging decisions when they are associated with a food source. It has been found that secondary plant metabolites are repellent to a variety of insect taxa including social wasps (Maia & Moore, 2011). Recent studies conducted with naïve foragers showed that the presence of these odours near protein-rich or carbohydrate-rich sources elicit rejection responses, decreasing food acceptance (Boevé, Honraet, & Rossel, 2014; Buteler, Lozada, D'Adamo, Melo, & Stadler, 2016; Yossen et al., 2019; Zhang, Schneidmiller, & Hoover, 2013). In particular, the combination of food and a repellent odour raises a conflicting situation that

negatively affects foraging towards that resource. Therefore, changes in the behavioural significance of these aversive odours could lead to radical impacts in food exploitation by modifying decision-making patterns (e.g. from avoiding a food source to preferring it).

Here, we aimed to deepen knowledge on olfactory plasticity of eusocial wasps by studying how *V. germanica* social wasps respond to an aversive odour while foraging on undepleted protein sources and to what extent such behavioural patterns can be modulated by appetitive experience. By means of a set of behavioural experiments conducted under field conditions, we first assessed the response of foragers to a protein-rich source paired to lavender essential oil odour, a known repellent odour for wasps (Zhang et al., 2013). Subsequently, we evaluated whether the response of naïve foragers to the aversive odour could be modified after experience with the meat source paired with the aversive odour. At the same time, we examined how these behavioural changes affect subsequent foraging decisions by evaluating the response of experienced wasps to the odour under different scenarios: no-choice, choice, odour alone, and odour paired with a less preferred resource (i.e. sucrose). Finally, we aimed to evaluate whether such behavioural changes are recalled over time by testing the ability of foragers to retrieve the established odour–food association after 24 h.

## METHODS

### Field Study

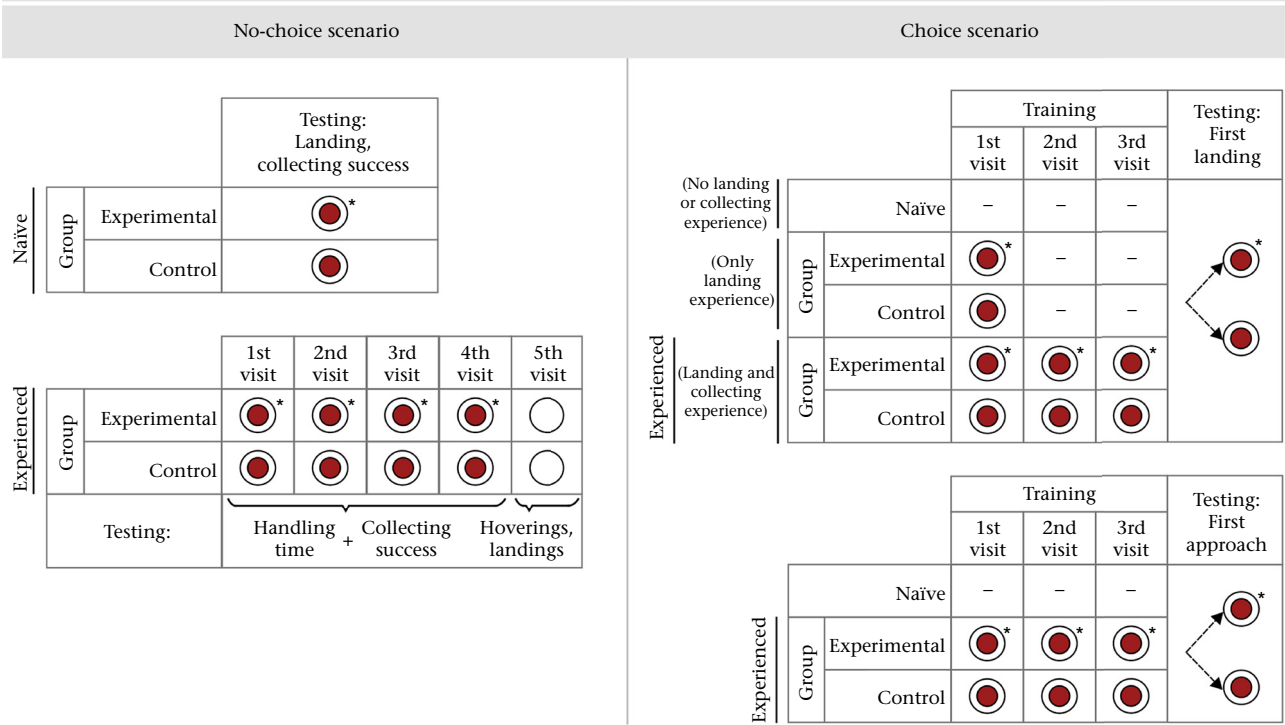
To evaluate wasps' behaviour in their natural foraging context, we conducted behavioural experiments under field conditions using free-flying wasps from wild populations. Experiments were carried out in natural environments along shores of Gutiérrez, Moreno and Nahuel Huapi lakes, in S. C de Bariloche (41°S, 71°W), Río Negro, Argentina, where foragers are frequently searching for food. All experiments were conducted under similar weather conditions (sunny days with no wind) during the flight's season peak of the colonies, from February to April in 2017 and 2018, according to the procedures outlined by Buteler et al. (2016).

### General Methods

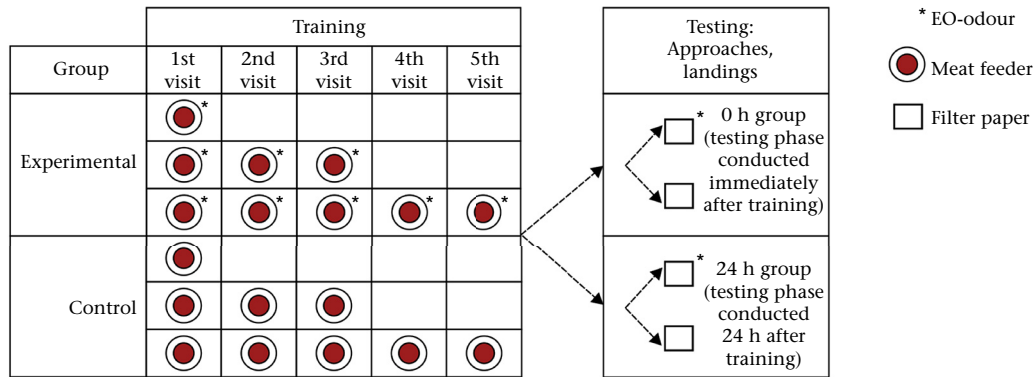
The meat source consisted of 15 g of ground fresh bovine meat within a plastic red container (2.5 cm in diameter × 1 cm high) placed on another larger white plate (9 cm in diameter × 0.5 cm high) (i.e. the feeder). Lavender essential oil odour (i.e. EO-odour) was used as aversive stimulus since it has been reported as a strong repellent odour for vespidae wasps (Boevé et al., 2014; Zhang et al., 2013). Pure essential oil (100 µl) was applied on a filter paper (Whatman No. 1) placed underneath the small container. In that way, the essential oil did not contact the meat, and wasps were only exposed to the odour of the essential oil. The same volume of essential oil was used for all experiments. Commercial lavender essential oil was purchased from Swiss-Just (manufactured under supervision and control of Ulrich Justrich AG, Walzenhausen, Switzerland). During each experiment, the meat and the filter paper containing essential oil were renewed every 15 min.

All experiments involved the observation of free-flying foragers that spontaneously arrived at a food source (either paired or not paired with EO-odour), placed at ground level (Lozada & D'Adamo, 2014). Different individual wasps were used in each experiment, in order to prevent the effects of social communication; any other wasp visiting the meat was removed with a hand-held insect aspirator (D'Adamo, Corley, Sackmann, & Lozada, 2000). Each replicate was carried out at different locations separated by at least

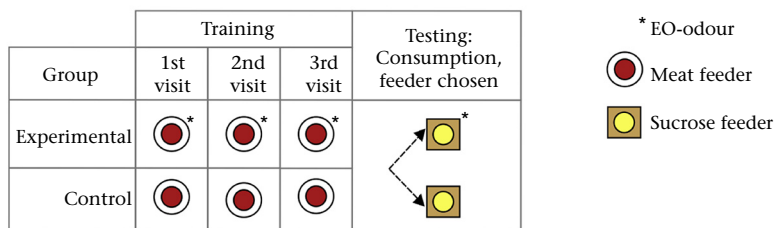
(a) Response to EO-odour paired with a meat source in wasps with and without collecting experience



(b) Role of level of experience in the response to EO-odour and long-term memory



(c) Influence of experience with meat and EO-odour in consumption of a different resource



**Figure 1.** Diagram of experimental set-up. (a) Behavioural response of naïve and experienced wasps (i.e. wasps that had collecting experience with a meat source either with or without lavender essential oil odour, EO-odour) to a meat source paired with EO-odour, under a no-choice scenario (i.e. only one source available, either with or without EO-odour) and choice scenario (two sources available, with and without EO-odour). (b) Influence of the level of experience (i.e. one, three or five collecting visits, either with or without EO-odour) in the attraction response to the EO-odour alone (evaluated in terms of approaches + landings) and long-term odour memory. (c) Consumption response to a sucrose source paired with EO-odour in wasps that had foraging experience (i.e. three collecting visits) with a different source (i.e. meat) either with or without this odour.



200 m from each other, in order to work with wasps from different colonies (Edwards, 1980; Moreyra; D'Adamo & Lozada, 2012; Wilson-Rankin, 2014). Experiments were conducted according to Argentina's laws and protocols of animal welfare.

### *Response of Naïve Wasps*

To evaluate whether the initial wasps' response towards the EO-odour could be modified by appetitive experience and, if so, how this change impacts foraging decisions, we first examined the behaviour of wasps without any prior experience with either the meat (feeder) or the EO-odour (i.e. naïve foragers). The response was evaluated under different scenarios: (1) when the meat source with EO-odour was the only option to collect meat (i.e. no-choice conditions); (2) when wasps could choose between a source with EO-odour versus another without it (i.e. choice conditions); and (3) when wasps could choose between EO-odour versus meat (i.e. choice conditions) (Fig. 1). In the first no-choice experiment, we assessed the landing response to a meat source either with or without EO-odour. The source was placed in the centre of a wire ring (0.5 cm in diameter). A Canon PowerShot SX170 IS (30 frames/s) camera, mounted on a tripod, filmed the behaviour of wasps approaching a dish with meat. We observed the behaviour of the first wasp that entered the ring and recorded whether the wasp landed on the source or not, which occurred when the wasp touched the feeder with its six legs. In another experiment, we assessed the collecting success of wasps that landed on the meat source (with or without EO-odour); that is, when the wasp cut a piece of meat with its mandibles and flew away with it.

Subsequently, we evaluated the landing response to the source with EO-odour when an alternative source without EO-odour was also available (choice scenario) (Fig. 1). The two sources were placed 60 cm away from each other and cross-wind (i.e. perpendicular to the direction of the wind) to limit the interference between both odour plumes. The choice (landing) of the first wasp that arrived at the array was recorded. Another choice experiment was conducted in order to test our hypothesis that the EO-odour is an aversive stimulus even for those few wasps that land on the source with this odour. During the experiment, a naïve wasp was allowed to land on a meat source with EO-odour (or without EO-odour, for control treatment). While handling the meat, the wasp was marked with a washable paint dot on the thorax or abdomen (D'Adamo & Lozada, 2011). This marking procedure caused minimum disturbance to the wasp. After the marking process, the meat was carefully removed to prevent the wasp from collecting a piece of meat and taking it to the nest, because we wanted the wasp to have no successful foraging experience with the food source. After 2 min, two new meat sources (with and without EO-odour) were placed 150 cm upwind from the initial feeder location, at 60 cm apart. This 'bifurcation' arrangement was used to avoid the influence of the previously learned microsite in the preference of the wasps, since previous studies showed that wasps' choices are influenced by visual and contextual landmarks of previously rewarding sites (e.g. Lozada & D'Adamo, 2014; Moreyra & Lozada, 2018). Relative positions of the feeders were switched between experiments.

To examine the wasps' response to the EO-odour alone under a foraging context, we conducted an experiment in which the meat source and EO-odour stimulus were given separately (Fig. 1). The meat feeder and a white plate containing a piece of filter paper (3 × 3 cm) impregnated with EO were placed on the ground, 60 cm apart from each other and cross-wind. When the first naïve wasp arrived at the experimental area, we recorded its choice by observing which stimulus source it approached. We considered an 'approach' when the focal wasp flew within 10 cm of a plate.

### *Response of Experienced Wasps*

In the following experiments, we evaluated the behavioural response to the EO-odour in wasps that had a successful foraging experience (i.e. wasps that landed and collected meat) with meat feeders that were either paired with the EO-odour or not (Fig. 1). First, we evaluated whether the presence of the EO-odour close to the meat source would affect the foraging performance of wasps while relocating the source in successive foraging trips. We had expected that, if the EO-odour negatively affects the relocation of the source, wasps would return less frequently, fail to collect or take longer to collect meat from a source with this odour. After placing the feeder on the ground, the first naïve wasp that landed on the source with EO-odour (or without EO-odour, for the control group) was marked and allowed to collect meat and depart to the nest, in order to acquire one successful collecting experience. Wasps that left the source without taking meat were excluded from the experiment. We recorded whether the marked wasp returned to the experimental area (usually within a few minutes from its departure) and collected meat during the next three foraging visits (i.e. 'collecting success'). Additionally, for each visit, we also registered the time elapsed from its landing until its departure to the nest with a piece of meat (i.e. 'handling time'). After the fourth visit, when the wasp had left the source, the feeder was replaced by a clean empty white plate, as described in Lozada and D'Adamo (2006). When the wasp returned to the experimental area and found that the meat was no longer there, its searching behaviour was evaluated by recording the number of hoverings and landings performed over the empty plate (i.e. 'search response') during 30 min. A 'hovering' episode occurred when the wasp flew over the plate without landing on it.

Subsequently, we evaluated the preference of experienced wasps for a source with EO-odour or without it. The experiment included two phases: training and testing. During the training phase, a naïve wasp was allowed to collect meat for three consecutive visits from a feeder with EO-odour (or without EO-odour, for control group). After the third visit, the training source was removed and two new sources (with and without EO odour) were simultaneously placed 150 cm upwind from the training site and 60 cm from each other, following a bifurcation arrangement. The testing phase began when the wasp returned to the training site, at which point we recorded the feeder chosen.

Finally, we also examined the response of experienced wasps to the EO-odour alone by presenting the EO-odour and meat separately. As in the previous experiment, a naïve wasp was trained to collect meat for three consecutive visits from a source with EO-odour (or without EO-odour, according to the treatment). After the third visit, the training feeder was removed and a filter paper with EO-odour and a meat source (as detailed previously for naïve wasps) were installed 150 cm upwind, following the bifurcation arrangement detailed above. Once the marked wasp returned, we recorded the feeder to which the wasp made its first approach.

### *Role of Level of Experience in the Response and Long-term Memory*

Here, we analysed whether the response to the EO-odour in experienced wasps would vary according to their level of experience (i.e. number of collecting visits) with this odour. Additionally, we explored the memory abilities of foragers by assessing whether the changes in response to the EO-odour, as a result of the appetitive experience with it, were recalled over time.

Two groups of wasps were independently trained and tested: '0 h group' and '24 h group' (Fig. 1). In the first group, a naïve forager was allowed to collect meat from a source with EO-odour (or without EO-odour, for control group) for one, three or five

consecutive visits (i.e. three levels of experience). Before the marked wasp returned in the next collecting visit, the training feeder was removed and two pieces of filter paper ( $3 \times 3$  cm) were installed 150 cm upwind from the training site, following a bifurcation arrangement. In this case, the plate was not used in order to avoid visual cues previously learned. One of these filter papers was impregnated with EO and the other one was untreated (blank). The testing phase started immediately after the training, when the wasp returned to the training site. We evaluated the attraction response towards the EO-odour by recording the number of approaches to and landings on each filter paper for 15 min from the wasp's return. In the 24 h group, wasps were trained in the same way as the '0 h group': with a meat source either with or without EO-odour, according to one of the three levels of experience, but in this case the testing phase was conducted after 24 h. Once the training ended, the feeder was removed and filter papers (with and without EO-odour) were installed 24 h later. We waited (for a cutoff period of 60 min) for the marked wasp to return spontaneously to the experimental area. If the wasp returned, we recorded the number of approaches and landings performed towards the filter papers.

### *Influence of Experience in Feeding Decisions*

To examine in more depth how changes in the wasps' responses to the EO-odour as a result of experience influence feeding decisions, here we evaluated the feeding response to a sucrose solution paired with the EO-odour. First, we conducted a choice test with both types of resources in order to corroborate that, under the current experimental conditions, the sucrose source was less attractive than the meat source as previously observed in other studies (D'Adamo & Lozada, 2003; Masciocchi, Unelius, & Buteler, 2019). The sucrose feeder consisted of 2.5 ml of sucrose solution (50% w/w) dispensed in drops on a white plastic plate (9 cm in diameter  $\times$  0.5 cm high), whereas the meat feeder was prepared as detailed in the General Methods above. Both feeders were placed on the ground, 60 cm away from each other. We recorded the choice (landing) of the first naïve wasp that arrived at the array.

Afterward, we evaluated whether the appetitive experience with the EO-odour paired with a protein source (i.e. meat) could promote greater consumption of sucrose when it was paired with the previously rewarded EO-odour (Fig. 1). A naïve wasp was trained to collect meat from a meat feeder with EO-odour for three consecutive collecting visits. After the third visit, the training meat feeder was removed and two sucrose feeders (with and without EO-odour) were installed 100 cm upwind from the training site, in a 'bifurcation' array. To eliminate any potential for learned visual cues to increase the attraction response towards the sucrose, the feeders employed in the testing phase were visually different from those used during the training. Sucrose feeders consisted of a square brown plate ( $10 \times 10$  cm) with a piece of filter paper ( $3 \times 3$  cm) placed in the centre. The sucrose solution (2.5 ml) was dispensed in drops on the plate and the EO was applied on the filter paper. When the marked wasp returned to the experimental area and found the sucrose instead of the meat, we recorded (during a cutoff period of 15 min) whether it consumed sucrose solution as well as the feeder chosen.

### *Statistical Analysis*

For experiments with naïve wasps conducted under a no-choice scenario, Fisher's exact test was applied to compare the frequency of naïve wasps that landed on the source with and without EO-odour, as well as the collecting success between both treatments (Sokal & Rohlf, 1995). To analyse the preference of naïve wasps for

meat paired with EO-odour versus meat alone, as well as for the EO-odour alone versus meat alone, we conducted exact binomial tests, in order to determine whether wasps' choices statistically differed from the random distribution of 50% for each stimulus source. We also used the exact binomial test to analyse the preferences of wasps that had previously landed on a meat source either with or without EO-odour. Fisher's exact test was applied to compare the frequency of wasps landing on the source with EO-odour between both treatments.

For no-choice experiments with experienced wasps, we compared the frequency of wasps that collected meat from sources with and without EO-odour during all four visits using Fisher's exact test. To compare the handling time between both treatments, we fitted a linear mixed model (LMM) where the response variable was the handling time, the explanatory variable was the treatment (two levels: meat source with EO-odour or without EO-odour), and each individual wasp as a random factor. The total number of hoverings and landings performed over the empty plate during 30 min was compared between treatments using Mann–Whitney *U* test. As for naïve wasps, we conducted exact binomial tests to analyse the preference of experienced wasps for meat versus meat paired with EO-odour, as well as for meat alone versus EO-odour alone. Fisher's exact test was applied to compare the frequency of wasps landing on the feeder with EO-odour between both treatments (i.e. wasps trained with or without EO-odour).

To examine the response of wasps with different levels of experience towards the EO-odour alone, we first determined whether there was an attraction response towards the odour. In both treatments (i.e. wasps trained with and without EO-odour), we compared the number of attraction episodes (i.e. approaches + landings) between both filter papers (with and without EO-odour) using Wilcoxon signed-rank tests. If a significant attraction response was found, we compared the number of attraction episodes among levels of experience (i.e. one, three and five visits) by means of Kruskal–Wallis tests. Post hoc comparisons were performed using Dunn's test adjusted with the Bonferroni method. For the 24 h group, we first applied the Fisher's exact test to compare the return rate (i.e. number of wasps that returned/number of trained wasps) to the experimental area after 24 h among the three levels of experience. If post hoc multiple comparisons were required, we applied the Bonferroni correction adjusting  $\alpha$  per comparison to  $\alpha' = \alpha/k$ . The attraction response, as well as the role of the level of experience in such response, was assessed as in 0 h group.

Finally, to determine whether the EO-odour could influence the subsequent feeding decisions, we analysed the preference of naïve wasps for meat versus sucrose with exact binomial test. We used the Fisher's exact test to compare the frequency of wasps that consumed sucrose (either from the source with or without EO-odour) between both treatments (i.e. wasps trained with a meat + EO or only meat). Preference was analysed with an exact binomial test.

Statistical analyses were conducted in R v.3.5.1 (R Core Team, 2018) at  $\alpha = 0.05$ . Linear mixed model was conducted using the 'lmer' function in the 'lme4' package (Bates, Maechler, Bolker, & Walker, 2015) and the significance of the factor was assessed with the 'anova()' function in the 'stats' package.

## **RESULTS**

### *Response of Naïve Wasps*

In no-choice experiments, only a small percentage of naïve wasps landed on the meat source with EO-odour in comparison to the meat source without EO-odour (16.2% and 97.2%, respectively)

(Fisher's exact test:  $N_{\text{meat+EO}} = 37$ ,  $N_{\text{meat}} = 36$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 2a). However, when comparing the collecting success of the wasps that landed on the meat source, there were no differences between the experimental and control groups (Fisher's exact test:  $N_{\text{meat+EO}} = 40$ ,  $N_{\text{meat}} = 42$ ,  $P = 0.24$ ).

When naïve wasps could choose between a source with EO-odour and another without EO-odour, they showed a strong avoidance to the source containing the EO and only a small proportion of wasps landed (7.5%) (exact binomial test:  $N = 42$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 3a). Even wasps that previously landed on the source with EO under a no-choice scenario, later avoided this source when given a choice (exact binomial test:  $N = 40$ ,  $P < 0.0001$ ). A similar bias was observed in wasps that previously landed on the source without EO-odour (Fisher's exact test:  $N_{\text{meat+EO}} = N_{\text{meat}} = 42$ ,  $P = 0.15$ ; Fig. 3b). Furthermore, by examining the naïve response towards the EO-odour alone versus the meat source alone under a choice scenario, we found that the EO-odour stimulus did not trigger approach responses, and all tested wasps approached the meat (exact binomial test:  $N = 39$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 4a).

### Response of Experienced Wasps

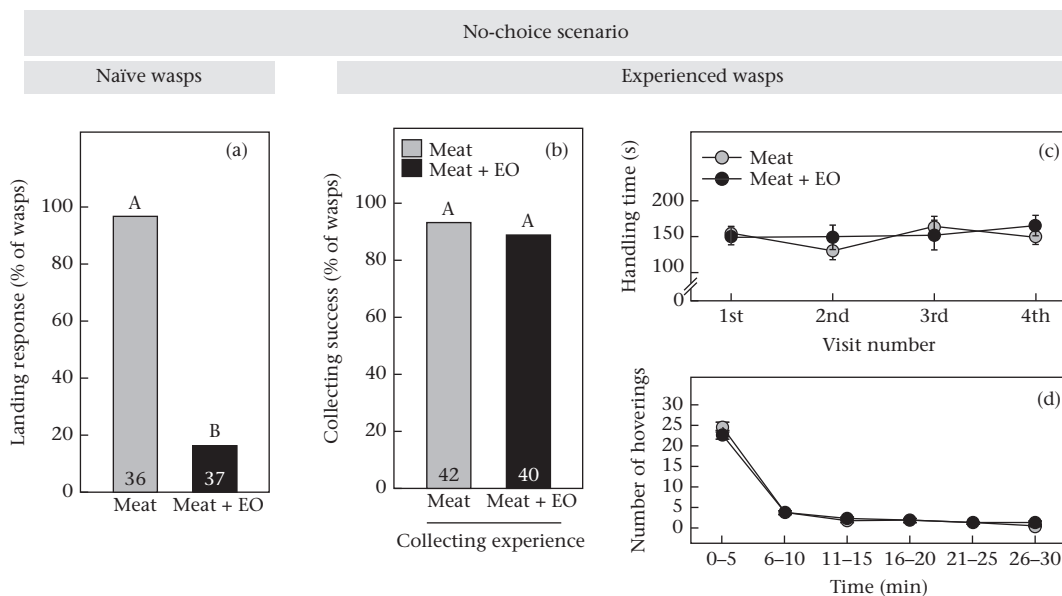
By assessing relocation behaviour of the wasps after having had one collecting experience with a source paired with EO-odour, we found that the collecting success during the subsequent three foraging visits did not differ from that observed for wasps that foraged on a source without EO-odour (Fisher's exact test:  $N_{\text{meat+EO}} = 40$ ,  $N_{\text{meat}} = 42$ ,  $P = 0.48$ ; Fig. 2b). No differences were observed in the handling time of sources with and without EO-odour (LMM, ANOVA:  $F_{1, 80} = 0.33$ ,  $P = 0.56$ ; Fig. 2c). When wasps returned to the training site and the meat was no longer there, they typically remained searching for the food throughout the whole observation period (30 min). No significant differences were found in the total number of hoverings performed over the empty plate between wasps that had foraged at the source with EO-odour and those that had foraged at the source without EO-odour (mean  $\pm$  SE: meat with EO:  $32.5 \pm 1.5$ ,  $N = 40$ ; meat:  $33.34 \pm 1.7$ ,  $N = 42$ )

(Mann–Whitney  $U$  test:  $U = 352$ ,  $P = 0.99$ ; Fig. 2d). There were also no significant differences in the number of landings (mean  $\pm$  SE: meat with EO:  $2.2 \pm 0.5$ ,  $N = 40$ ; meat:  $3.9 \pm 0.6$ ,  $N = 42$ ) (Mann–Whitney  $U$  test:  $U = 452$ ,  $P = 0.08$ ).

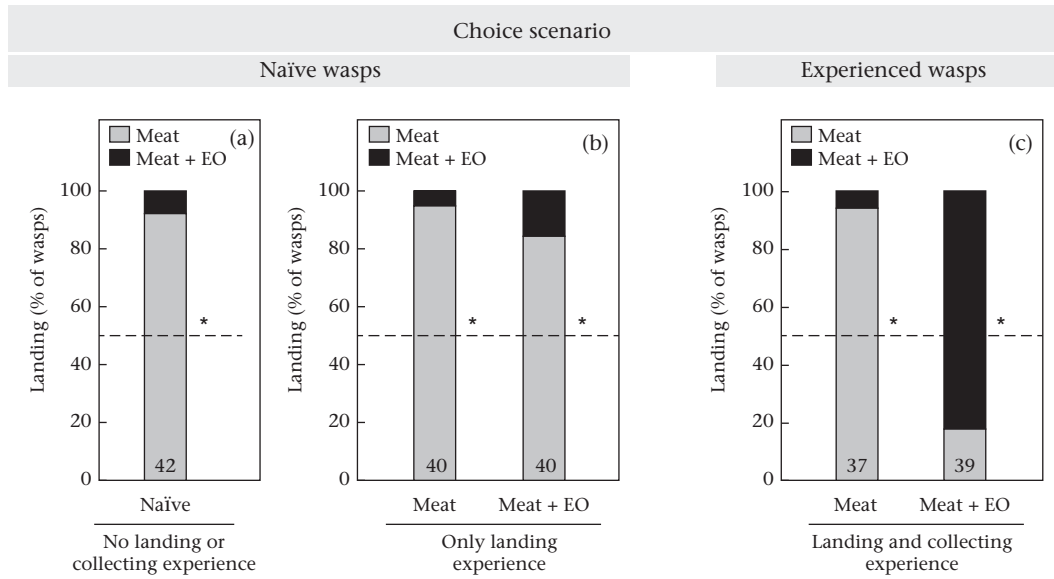
When evaluating the preference of wasps trained to collect meat from a source with meat only, we found that most of them (94.6%) chose to land on the source without the EO-odour (exact binomial test:  $N = 37$ ,  $P < 0.0001$ ). In contrast, wasps trained with meat paired with EO-odour chose the source with EO-odour (82.1%) (exact binomial test:  $N = 39$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 3c). When the EO-odour and the meat source were presented separately in a bifurcation arrangement, wasps trained with the EO-odour paired with the meat were attracted by the EO-odour in a proportion similar to those attracted by the meat (exact binomial test:  $N = 34$ ,  $P = 0.23$ ). In contrast, wasps trained with meat without EO-odour were not attracted by the EO-odour, and all wasps approached the meat (exact binomial test:  $N = 33$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 4b).

### Role of Level of Experience in the Response and Long-term Memory

When evaluating the attraction response towards the EO-odour alone in the 0 h group, we found that, after returning, wasps that had been trained with the source paired with EO-odour typically overflowed the previously rewarded microsite and then flew upwind towards the EO-odour source. A clear attraction response towards the unrewarding EO-odour was observed in all three levels of experience (i.e. one, three and five collecting visits). The number of attraction episodes (i.e. approaches + landings) performed towards the filter paper impregnated with EO was considerably greater than the number of attraction episodes displayed towards the blank filter paper, which was practically ignored by the wasps (Wilcoxon signed-rank test: one visit:  $V = 663$ ,  $N = 40$ ,  $P < 0.0001$ ; three visits:  $V = 528$ ,  $N = 32$ ,  $P < 0.0001$ ; five visits:  $V = 406$ ,  $N = 28$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 5a). In addition, the number of attraction episodes varied according to the level of experience (Kruskal–Wallis test:  $\chi^2_2 = 62.35$ ,  $P < 0.0001$ ). Wasps trained with five foraging visits displayed significantly more attraction episodes than wasps trained with three visits, and these in turn responded more than wasps that



**Figure 2.** Response of naïve wasps and wasps with collecting experience (either with meat + lavender essential oil odour (EO-odour), or with only meat) to a meat source paired to EO-odour under a no-choice scenario. (a) Percentage of naïve wasps that landed on a source either with or without EO-odour (i.e. landing response). (b) Percentage of wasps that collected meat during four consecutive visits from a source either with or without EO-odour (i.e. collecting success). (c) Handling time of the meat source (either with or without EO-odour) for each collecting visit (mean  $\pm$  SE). (d) Number of hoverings (mean  $\pm$  SE) performed over the empty plate after removing the meat source, recorded during 30 min since the return of the wasp to the experimental area. Total number of wasps tested is shown inside of each bar. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

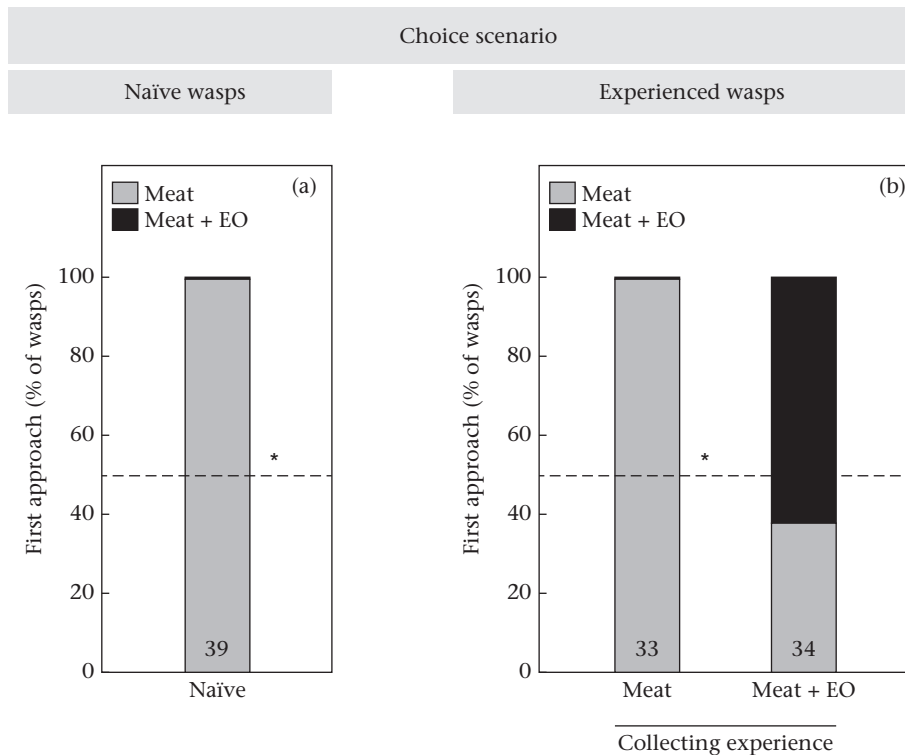


**Figure 3.** Response of wasps to a meat source alone versus a meat source paired with lavender essential oil odour (EO-odour) (choice scenario) in (a) naïve wasps, (b) wasps that previously landed on a meat source (either with or without EO-odour) but did not collect meat, and (c) wasps with previous collecting experience (i.e. three visits) with the meat source either with or without EO-odour. Total number of wasps tested is shown inside of each bar. Asterisks indicate significant differences in wasp landings between both types of meat sources with respect to a random distribution of 50% for each one ( $P < 0.05$ ).

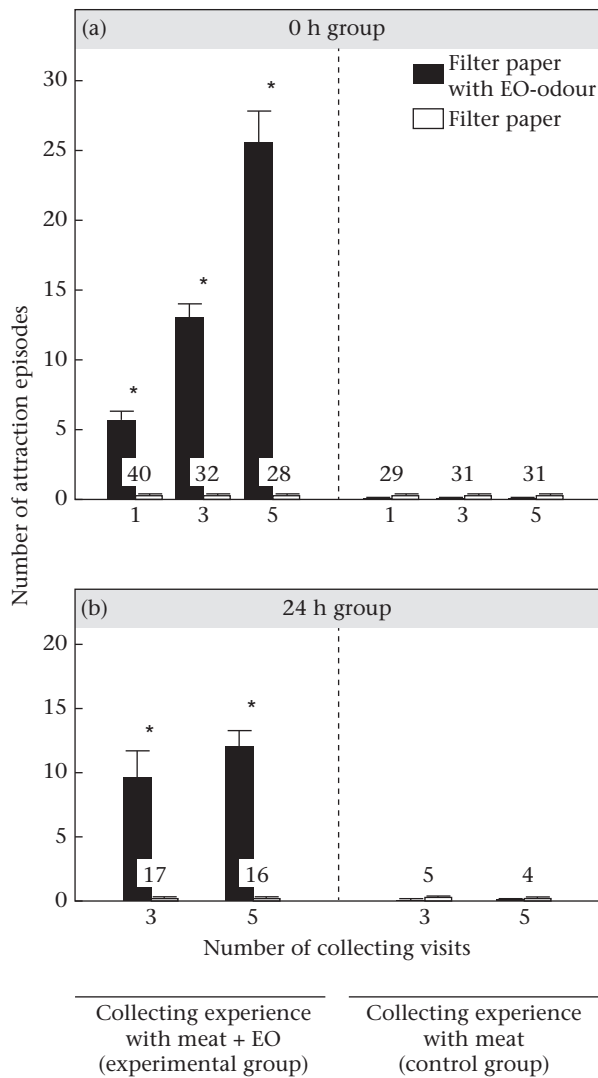
collected meat once (Dunn test: one to three visits:  $Z = 4.55$ ,  $P < 0.0001$ ; one to five visits:  $Z = 7.79$ ,  $P < 0.0001$ ; three to five visits:  $Z = 3.28$ ,  $P = 0.003$ ; Fig. 5a). However, wasps that had been trained in the absence of EO-odour (i.e. control group) did not show an attraction response to this odour; in fact, approaches and landings performed towards the filter paper with and without EO-odour were rare (Wilcoxon signed-rank test: one visit:  $V = 3$ ,

$N = 29$ ,  $P = 0.23$ ; three visits:  $V = 4$ ,  $N = 31$ ,  $P = 0.07$ ; five visits:  $V = 3.5$ ,  $N = 31$ ,  $P = 0.13$ ; Fig. 5a).

In the 24 h group, a proportion of the wasps trained with EO-odour spontaneously returned to the experimental area (i.e. the place where they were trained) 24 h later, and this return rate varied according to their previous level of experience (Fisher's exact test:  $P = 0.0002$ ). Wasps trained with three and five collecting visits



**Figure 4.** Response of wasps to a meat source alone versus lavender essential oil (EO) odour alone (evaluated in terms of the first approach): (a) naïve wasps; (b) wasps with previous collecting experience (i.e. three visits) with a meat source either with or without EO-odour. The total number of wasps tested is shown inside of each bar. Asterisks indicate significant differences in wasp approaches between both types of stimulus sources with respect to a random distribution of 50% for each one ( $P < 0.05$ ).



**Figure 5.** Attraction response (i.e. number of approaches + landings) towards a filter paper impregnated with lavender essential oil (EO) versus blank filter paper, in wasps with different level of experience (i.e. one, three and five collecting visits) with a meat source either with EO (left) or without EO (right). (a) Attraction response tested immediately after training (i.e. 0 h group). (b) Attraction response tested 24 h after training (i.e. 24 h group). Data corresponding to one visit treatment of the 24 h group was excluded from analysis due to the low frequency of wasps that returned to the experimental area. Total number of wasps tested is shown inside of each bar. Asterisks indicate significant differences in the number of attraction episodes between both filter papers ( $P < 0.05$ ).

returned more frequently than wasps trained with a single visit (one visit: 10%,  $N = 30$ ; three visits: 53.12%,  $N = 32$ ; five visits: 55.1%,  $N = 29$ ) (Fisher's exact test, one to three visits:  $P = 0.0003$ ; one to five visits:  $P = 0.0006$ ; three to five visits:  $P = 1$ ;  $\alpha' = 0.016$  per comparison; Fig. 5b). The return rate of wasps with one collecting experience was low ( $N = 3$ ), and these wasps were excluded from further analysis. After 24 h, wasps trained with three and five collecting visits also showed an attraction response towards the EO-odour. Wasps displayed considerably more attraction episodes towards the filter paper with EO than towards the blank filter paper (Wilcoxon signed-rank test: three visits:  $V = 66$ ,  $N = 17$ ,  $P = 0.004$ ; five visits:  $V = 91$ ,  $N = 16$ ,  $P = 0.002$ ; Fig. 5b). However, we found no significant difference in the attraction response between wasps with three and five foraging visits (Mann–Whitney  $U$  test:  $U = 129.5$ ,  $N_1 = 17$ ,  $N_2 = 16$ ,  $P = 0.15$ ). Regarding the wasps trained in the absence of EO-odour, we did not find significant differences

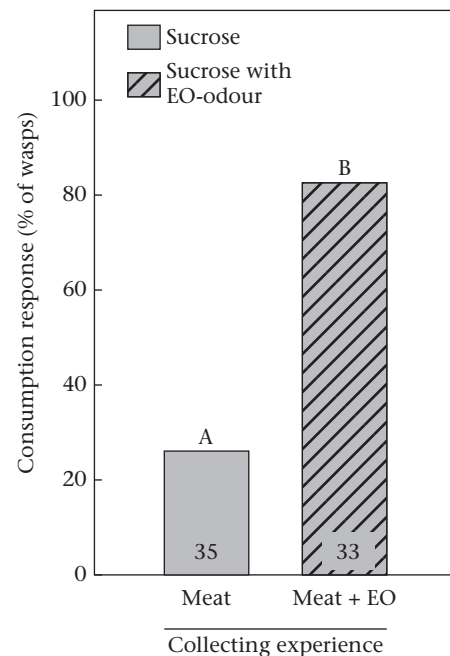
in the return rate among the different levels of experience (one visit: 6.6%,  $N = 30$ ; three visits: 16.6%,  $N = 30$ ; five visits: 14.3%,  $N = 28$ ) (Fisher's exact test:  $P = 0.51$ ). Due to the low frequency of return and attraction episodes, data from three and five visits were pooled and then compared between both filter papers. Similarly to what was observed in 0 h group, wasps trained with only meat did not exhibit attraction responses towards the EO-odour during the testing phase, and the number of attraction episodes did not differ between filter paper treatments (Wilcoxon signed-rank test: three visits:  $V = 0$ ,  $N = 9$ ,  $P = 0.34$ ; Fig. 5b).

#### Influence of Experience in Feeding Decisions

In the first choice experiment, all naïve wasps preferred the meat source over the sucrose source (exact binomial test:  $N = 40$ ,  $P < 0.0001$ ), corroborating that the sucrose was less attractive than the meat under the current experimental conditions. When evaluating the sucrose consumption response of wasps that had foraging experience with a meat source (without EO-odour), we found that 25.7% of wasps consumed sucrose solution, and all of them chose the feeder without EO-odour (exact binomial test:  $N = 35$ ,  $P < 0.0001$ ). However, when wasps were trained with a meat source paired with EO-odour, a greater percentage of wasps consumed sucrose solution (81.9%) (Fisher's exact test:  $P < 0.0001$ ; Fig. 6), and all of them chose the source with the EO-odour (exact binomial test:  $N = 33$ ,  $P < 0.0001$ ).

#### DISCUSSION

The present research demonstrates that behavioural responses of *V. germanica* social wasps towards olfactory cues can be markedly modulated by appetitive experiences. We found that foraging experience with an aversive odour paired with a high-quality protein source led free-flying wasps to associate this odour with



**Figure 6.** Percentage of wasps that consumed sucrose solution (either from a source with lavender essential oil (EO) or without EO-odour) after having had collecting experience (three visits) with a meat source either with or without EO-odour. Total number of wasps tested is shown inside of each bar. Different letters indicate significant differences in the consumption response between both sucrose sources ( $P < 0.05$ ).

the food reward, modifying the subsequent response towards the odour from aversion to attraction. This shows that these wasps can also learn to reclassify odour cues after they associate them with protein sources. Moreover, foragers were able to retrieve this association after 24 h, providing the first evidence of long-term memory related to odours in *Vespula* wasps. These findings provide new insights into the plasticity of olfactory behaviour in social wasps and contribute to previous studies showing that these wasps are able to establish odour–food associations between nonaversive odours and carbohydrate-rich rewards (El-Sayed et al., 2018; Elmquist & Landolt, 2018; McPheron & Mills, 2007).

Results obtained under the different experimental scenarios (no-choice, choice, EO-odour alone, and EO-odour paired with sucrose) reveal that appetitive experience with the EO-odour can lead to significant changes in behavioural patterns and decision making in foraging. Naïve foragers were not attracted to the EO-odour alone and most of them avoided meat sources paired with the odour under both choice and no-choice scenarios, corroborating the aversive nature of lavender essential oil. However, after having had a foraging experience with the meat paired with EO-odour, the odour did not affect the foraging performance of the wasps (evaluated in terms of handling time, collecting rate and search response) in successive visits. In fact, when given a choice, wasps trained in the presence of EO-odour preferred meat sources with this odour and exhibited a remarkable attraction response towards EO-odour alone. Moreover, foraging experience with the odour also increased the consumption of sucrose, a less attractive resource, when it contained the EO-odour. These findings show that single appetitive events can shape food exploitation in social wasps, as noted in previous studies in *Vespula* wasps (Lozada & D'Adamo, 2014; Moreyra & Lozada, 2018). Although it has been seen in *P. dominula* wasps that appetitive experiences with food odours can lead to an increase in the attraction response (Elmquist & Landolt, 2018), here we observed that foraging experience with the EO-odour led to opposite behavioural and decision patterns.

In this research we aimed to understand how experience can modulate the response to relevant stimuli from the environment and impact foraging decisions. Most studies on appetitive learning in insects are often conducted under laboratory conditions (Bitterman, Menzel, Fietz, & Schäfer, 1983; Dukas, 2008; Giurfa, 2015; Vinauger et al., 2016). Here we focused on the behaviour of free-flying wasps in their natural foraging context, where individuals were able to perceive, react and make decisions freely without being artificially manipulated or induced. The behavioural repertoire exhibited by EO-trained wasps under the different scenarios is indicative of associative mechanisms, since the odour alone triggered the same behavioural responses and attraction level as the reward, i.e. approaches, landings and search behaviour (Griffin, Guez, Federspiel, Diquelou, & Lermite, 2016; Shettleworth, 2010). Similar findings have been reported in other insects such as mosquitoes, sucking bugs, moths and parasitic wasps, in which the meaning of certain cues or signals (e.g. aggregation and sexual pheromones) changed after appetitive or aversive conditioning (Benelli et al., 2014; Hartlieb et al., 1999; Mengoni, Lorenzo-Figueiras, & Minoli, 2017; Vinauger, Lutz, & Riffell, 2014). Our findings add to the body of knowledge on the cognitive abilities of insects and suggest that associative learning is widespread across insect taxa.

Furthermore, we found that the attraction towards the EO-odour depended on the number of previous rewarding experiences with the odour. Interestingly, one collecting visit was enough to switch the initial aversive response, demonstrating once again, the strength of a single appetitive experience on learning processes in *V. germanica* wasps (e.g. D'Adamo & Lozada, 2011;

Lozada & D'Adamo, 2006, 2011). In addition, more rewarding experiences with the EO-odour (three and five collecting visits) increased the attraction response and led to olfactory memories that persisted over 24 h. Our results provide experimental support to the findings of El-Sayed et al. (2018), who suggested that long-lasting odour memories could be involved in the attractiveness of certain honeydew odours in natural populations of social wasps in New Zealand. Evidence of long-term memory in *V. germanica* wasps was previously reported by Moreyra et al. (2016) regarding spatial cues, demonstrating that foragers can remember the previously rewarding microsite for at least 24 h. Nevertheless, these authors found that eight foraging visits were needed to promote long-term memory of the feeding site, whereas in this study only three visits were needed to promote long-term odour memory. We observed that, after 24 h, the return rate of EO-trained wasps to the learned site when only the EO-odour was present was 10%, 53.1% and 55.1% for one, three and five visits, respectively. Interestingly, these rates are similar to those observed by Moreyra et al. (2016) when the meat source was present at the learned site (22%, 51% and 41% for two, four and eight visits, respectively). The fact that the EO-odour became as attractive as the reward itself highlights the associative strength of the odour signifying the presence of meat. Moreover, this attraction response elicited by the learned EO-odour resulted in changes in foraging decisions, for example, by modifying meat preferences of wasps or leading wasps to consume a less attractive resource (sucrose). These findings agree with the hypothesis that olfactory memories could have an important role in food exploitation by social wasps. Nevertheless, more studies are needed to further understand the role of learned odour cues in foraging, for example, by examining the relative importance of different types of cues (e.g. spatial, visual, olfactory) in relocation behaviour.

Our experimental design is in line with the idea that organisms are entities situated in an environment, which necessarily imposes a certain 'perspective' on them (e.g. Varela, 2000). In this sense, the present work highlights the value of studying behaviour in a context and the importance of this kind of field approach as a complement to more controlled laboratory studies. *Vespula germanica* wasps are also a useful model for the study of olfactory plasticity under appetitive contexts. The fact that an odour stimulus that initially triggered aversive responses can become attractive after appetitive experiences with it demonstrates that these wasps can learn to deal with conflicting foraging situations, reflecting great behavioural plasticity. This is particularly relevant for *V. germanica* social wasps that benefit from the ability to rapidly modify their behaviour in response to novel and changing foraging scenarios, a potentially useful trait for invasion processes (Griffin et al., 2016; Lozada & D'Adamo, 2014).

In conclusion, our results show that spontaneous responses to odours can be modulated by experience in *V. germanica* wasps. Our study supports the notion that behaviour results from the imbrication between the organism and its environment and that significance emerges from experience and not from fixed external information (Palacios & Bozinovic, 2003; Varela, 2000).

#### Declaration of Competing Interests

We declare that we have no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

We acknowledge support from the INIBIOMA-CONICET and CRUB, Universidad Nacional del Comahue, Argentina.

## References

- Akre, R. D. (1982). Social wasps. In H. R. Hermann (Ed.), *Social insects* (pp. 1–105). New York, NY: Academic Press.
- Akre, R. D., Ramsay, C., & Grable, A. (1989). Additional range extension by the German yellowjacket, *Paravespula germanica* (Fabricius), in North America. *Pan-Pacific Entomologist*, 65(1), 79–88.
- Arenas, A., & Farina, W. M. (2012). Learned olfactory cues affect pollen-foraging preferences in honeybees, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour*, 83(4), 1023–1033. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.01.026>.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48. <https://www.jstatsoft.org/article/view/v067i01>.
- Benelli, G., Stefanini, C., Giunti, G., Geri, S., Messing, R. H., & Canale, A. (2014). Associative learning for danger avoidance nullifies innate positive chemotaxis to host olfactory stimuli in a parasitic wasp. *Naturwissenschaften*, 101(9), 753–757. <https://doi.org/10.1007/s00114-014-1210-2>.
- Bitterman, M., Menzel, R., Fietz, A., & Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(2), 107–119. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.97.2.107>.
- Boveé, J. L., Honraet, K., & Rossel, B. (2014). Screening of repellents against vespid wasps. *Insects*, 5(1), 272–286. <https://doi.org/10.3390/insects5010272>.
- Buteler, M., Lozada, M., D'Adamo, P., Melo, R., & Stadler, T. (2016). Behavioural responses of *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) wasps exposed to essential oils. *Australian Entomologist*, 55(3), 308–315. <https://doi.org/10.1111/aen.12187>.
- Dukas, R. (2008). Evolutionary biology of insect learning. *Annual Review of Entomology*, 53, 145–160. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093343>.
- Dukas, R. (2013). Effects of learning on evolution: Robustness, innovation and speciation. *Animal Behaviour*, 85(5), 1023–1030. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.12.030>.
- D'Adamo, P., Corley, J., Sackmann, P., & Lozada, M. (2000). Local enhancement in the wasp *Vespula germanica*: Are visual cues all that matter? *Insectes Sociaux*, 47(3), 289–291. <https://doi.org/10.1007/PL00001171>.
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2003). The importance of location and visual cues during foraging in the German wasp (*Vespula germanica* F.) (Hymenoptera: Vespidae). *New Zealand Journal of Zoology*, 30(3), 171–174. <https://doi.org/10.1080/03014223.2003.9518336>.
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2008). Foraging behavior in *Vespula germanica* wasps relocating a food source. *New Zealand Journal of Zoology*, 35(1), 9–17. <https://doi.org/10.1080/03014220809510099>.
- D'Adamo, P., & Lozada, M. (2011). Cognitive plasticity in foraging *Vespula germanica* wasps. *Journal of Insect Science*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1673/031.011.10301>.
- Edwards, R. (1980). *Social wasps: Their biology and control*. London, U.K.: Rentokil Ltd.
- El-Sayed, A. M., Jósvali, J. K., Brown, R. L., Twidle, A., & Suckling, D. M. (2018). Associative learning of food odor by social wasps in a natural ecosystem. *Journal of Chemical Ecology*, 44(10), 915–921. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0984-7>.
- Elmqvist, D. C., & Landolt, P. J. (2018). Associative learning of food odors by the European paper wasp, *Polistes dominula* Christ (Hymenoptera: Vespidae). *Environmental Entomology*, 47(4), 960–968. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy083>.
- Giurfa, M. (2015). Learning and cognition in insects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 6(4), 383–395. <https://doi.org/10.1002/wics.1348>.
- Griffin, A., Guez, D., Federspiel, I., Diquelou, M., & Lermite, F. (2016). Invading new environments: A mechanistic framework linking motor diversity and cognition to establishment success. In J. Weis, & D. Sol (Eds.), *Biological invasions and animal behaviour* (pp. 26–46). Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.
- Hartlieb, E., Anderson, P., & Hansson, B. S. (1999). Appetitive learning of odours with different behavioural meaning in moths. *Physiology & Behavior*, 67(5), 671–677. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00124-9).
- Jeanne, R. L., & Taylor, B. J. (2009). Individual and social foraging in social wasps. In S. Jarau, & M. Hrnčir (Eds.), *Food exploitation by social insects: Ecological, behavioral and theoretical approaches* (pp. 53–79). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Jernigan, C. M., Halby, R., Gerkin, R. C., Snakevitch, I., Locatelli, F., & Smith, B. H. (2019). Experience-dependent tuning of early olfactory processing in the adult brain. *Journal of Experimental Biology*, 223(1). <https://doi.org/10.1242/jeb.206748>.
- Lozada, M., & D'Adamo, P. (2006). How long do *Vespula germanica* wasps search for a food source that is no longer available? *Journal of Insect Behaviour*, 19, 591–600. <https://doi.org/10.1007/s10905-006-9045-0>.
- Lozada, M., & D'Adamo, P. (2009). How does an invasive social wasp deal with changing contextual cues while foraging? *Environmental Entomology*, 38(3), 803–808. <https://doi.org/10.1603/022.038.0333>.
- Lozada, M., & D'Adamo, P. (2011). Past experience: A help or a hindrance to *Vespula germanica* foragers? *Journal of Insect Behaviour*, 24(2), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s10905-010-9244-6>.
- Lozada, M., & D'Adamo, P. (2014). Learning in an exotic social wasp while relocating a food source. *Journal of Physiology*, 108(2–3), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.05.006>.
- Lozada, M., D'Adamo, P., Buteler, M., & Kuperman, M. N. (2016). Social learning in *Vespula germanica* wasps: Do they use collective foraging strategies? *PLoS One*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152080>. e0152080.
- MacDonald, J. F., Akre, R. D., & Keyel, R. E. (1980). The German yellowjacket (*Vespula germanica*) problem in the United States (Hymenoptera: Vespidae). *Bulletin of the Entomological Society of America*, 26(4), 436–444. <https://doi.org/10.1093/besa/26.4.436>.
- Maia, M. S., & Moore, S. J. (2011). Plant-based insect repellents: A review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 10, S11. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S11>.
- Masciocchi, M., Unelius, C. R., & Buteler, M. (2019). Foraging niche separation of social wasps in an invaded area: Implications for their management. *Journal of Applied Entomology*, 143(10), 1115–1121. <https://doi.org/10.1111/jen.12708>.
- McPheron, L. J., & Mills, N. J. (2007). Discrimination learning of color–odor compounds in a paper wasp (Hymenoptera: Vespidae: *Mischocyttarus flavitarsis*). *Entomologia Generalis*, 29(2–4), 125–134. <https://doi.org/10.1127/entom.gen/29/2007/125>.
- Mengoni, S., Lorenzo-Figueiras, A. N., & Minoli, S. A. (2017). Experience-dependent modulation of the attraction to faeces in the kissing bug *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology*, 98, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.10.018>.
- Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology*, 185(4), 323–340. <https://doi.org/10.1007/s003590050392>.
- Menzel, R. (2009). Learning and memory in invertebrates: Honeybee. In L. R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of neuroscience* (pp. 435–439). Boca Raton, FL: Academic Press.
- Moreyra, S., D'Adamo, P., & Lozada, M. (2012). Cognitive processes in *Vespula germanica* wasps (Hymenoptera: Vespidae) when relocating a food source. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(1), 128–133. <https://doi.org/10.1603/AN11097>.
- Moreyra, S., D'Adamo, P., & Lozada, M. (2014). The influence of past experience on wasp choice related to foraging behavior. *Insect Science*, 21(6), 759–764. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12077>.
- Moreyra, S., D'Adamo, P., & Lozada, M. (2016). Long-term spatial memory in *Vespula germanica* social wasps: The influence of past experience on foraging behavior. *Insect Science*, 24(5), 853–858. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12366>.
- Moreyra, S., & Lozada, M. (2018). How single events can influence decision-making in foraging *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) social wasps. *Australian Entomologist*, 58(2), 443–450. <https://doi.org/10.1111/aen.12337>.
- Overmyer, S. L., & Jeanne, R. L. (1998). Recruitment to food by the German yellowjacket, *Vespula germanica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42(1), 17–21. <https://doi.org/10.1007/s002650050407>.
- Palacios, A. G., & Bozinovic, F. (2003). An 'enactive' approach to integrative and comparative biology: Thoughts on the table. *Biological Research*, 36(1), 101–105. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602003000100008>.
- R Core Team. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
- Raverter Richter, M. (2000). Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behaviour. *Annual Review of Entomology*, 45, 121–150. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.121>.
- Saleh, N., & Chittka, L. (2006). The importance of experience in the interpretation of conspecific chemical signals. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(2), 215–220. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0252-7>.
- Santoro, D., Hartley, S., Suckling, D. M., & Lester, P. J. (2015). Nest-based information transfer and foraging activation in the common wasp (*Vespula vulgaris*). *Insectes Sociaux*, 62, 207–217. <https://doi.org/10.1007/s00040-015-0395-5>.
- Saverschek, N., & Roces, F. (2011). Foraging leafcutter ants: Olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Animal Behaviour*, 82(3), 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.05.015>.
- Shettleworth, S. J. (2001). Animal cognition and animal behaviour. *Animal Behaviour*, 61(2), 277–286. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1606>.
- Shettleworth, S. J. (2010). *Cognition, evolution, and behavior*. New York, NY: Oxford University Press.
- Snell-Rood, E. C. (2013). An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity. *Animal Behaviour*, 85(5), 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.12.031>.
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1995). *Biometry* (3rd ed.). New York, NY: W. H. Freeman.
- Tribe, G. D., & Richardson, D. M. (1994). The European wasp, *Vespula germanica* (Fabricius) (Hymenoptera: Vespidae), in southern Africa and its potential distribution as predicted by ecoclimatic matching. *African Entomology*, 2(1), 1–6.
- Varela, F. (2000). *El fenómeno de la vida* (1st ed.). Santiago, Chile: Dolmen ediciones S.A.
- Vinauger, C., Lahondère, C., Cohuet, A., Lazzari, C. R., & Riffell, J. (2016). Learning and memory in disease vector insects. *Trends in Parasitology*, 32(10), 761–771. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.06.003>.
- Vinauger, C., Lutz, E. K., & Riffell, J. A. (2014). Olfactory learning and memory in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*, 217, 2321–2330. <https://doi.org/10.1242/jeb.101279>.
- Wilson-Rankin, E. E. (2014). Level of experience modulates individual foraging strategies of an invasive predatory wasp. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69(3), 491–499. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1861-1>.
- Yossen, M. B., Lozada, M., Kuperman, M. N., González, S., Gastaldi, B., & Buteler, M. (2019). Essential oils as vespid wasp repellents: Implications for their use as a management strategy. *Journal of Applied Entomology*, 143(6), 635–643. <https://doi.org/10.1111/jen.12631>.
- Zhang, Q. H., Schneidmiller, R. G., & Hoover, D. R. (2013). Essential oils and their compositions as spatial repellents for pestiferous social wasps. *Pest Management Science*, 69(4), 542–552. <https://doi.org/10.1002/ps.3411>.



# Context-dependent use of olfactory cues by foragers of *Vespula germanica* social wasps

M. B. Yossen<sup>1</sup> · M. Buteler<sup>1</sup> · M. Lozada<sup>1</sup>

Received: 7 July 2021 / Revised: 10 November 2021 / Accepted: 14 November 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

## Abstract

Food search is guided by cues from different sensory modalities, such as olfactory and visual. In social wasps, olfaction plays a key role in locating new resources. However, while several studies have focused on the importance of odours in predation, less is known about their role during scavenging, when spatial memories become a relevant guidance mechanism. Here, we investigated whether the use of odours during carrion exploitation by *Vespula germanica* wasps depends on whether they are locating or relocating the resource. By means of field choice experiments, we evaluated wasp response to odours: an odour eliciting a spontaneous aversive response, a learnt odour eliciting an appetitive response, and the conspecifics' odour eliciting an attractive response. Experiments were conducted in different contexts, i.e., during food localisation by naïve foragers, re-localisation of a resource at the learnt site and re-localisation of a resource that had been displaced from the learnt site. All olfactory stimuli evaluated markedly influenced foraging decisions in naïve wasps and in experienced wasps when the food was moved from the learnt location. However, odours were ignored during the wasp's return to the foraging site. These results suggest a cue hierarchy, in which local landmarks are more reliable to relocate carrion, while olfaction would be useful to locate novel resources or relocate a known source when spatial memories fail. Our findings demonstrate a context-dependent use of odours during carrion exploitation by *V. germanica* wasps and highlight the importance of spatial memories as an important factor modulating odour response.

**Keywords** Spatial learning · Odour learning · Pheromone · Foraging behavior · Scavenging insects

## Introduction

Social insects use environmental cues from diverse sensory modalities, such as olfactory and visual, to locate food sources (Knaden and Graham 2016; Buehlmann et al. 2020a). Moreover, foraging decisions can involve various types of cognitive processes, including social cues or signals, memories, or individual exploration of the available options (Grüter and Leadbeater 2014). Since the foragers' environments are dynamic, they often display context-dependent strategies, where the relative importance of each cue may differ according to their specific requirements (e.g.,

Hendrichs 1994; D'Adamo and Lozada 2003; Fukushi and Wehner 2004; Moreyra et al. 2006).

In eusocial wasps, olfaction plays a key role in food search (Edwards 1980; Jeanne and Taylor 2009; Raveret-Richter 2000). In addition to the odour of the food itself, other behaviourally relevant odour stimuli can influence foraging decisions and help foragers to identify suitable resources. Social cues can facilitate the localisation of potential food items and increase food acceptance. For example, *Vespula germanica* foragers are attracted by conspecifics' odour, leading to the aggregation of foragers at a food source (local enhancement) (D'Adamo et al. 2000, 2001, 2003). A recent study has suggested that these aggregations in food sources are mediated mainly by pheromones (Buteler et al. 2019). Plant-derived odours also have a relevant role in wasps foraging. For example, terpenes can elicit strong aversive responses both in naïve and experienced wasps, deterring approaches and landings on food baits (Zhang et al. 2013; Buteler et al. 2016; Yossen et al. 2019). Research has shown that, when paired up with protein sources, these

✉ M. Lozada  
lozadam@comahue-conicet.gob.ar;  
mariana.lozada@gmail.com

<sup>1</sup> Laboratorio Ecotono, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA), CONICET, Universidad Nacional del Comahue, Pasaje Gutiérrez 1125, 8400 San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina



aversive odour cues can markedly affect food preferences (D'Adamo et al. 2001; Yossen et al. 2019).

Food search in eusocial wasps is also influenced by odour learning. Social wasps are known to exhibit remarkable behavioural plasticity and olfactory learning abilities (Raveret-Richter 2000; Lozada and D'Adamo 2014). Several studies have demonstrated that foragers of vespidae species can learn to associate odours with carbohydrate-rich food sources (Jander 1998; El-Sayed et al. 2018). Hornets, *Vespa velutina*, can even form long-lasting olfactory memories with sugar rewards (Gong et al. 2019). Recently, it has been shown that *V. germanica* foragers can also form odour–food associations with protein rewards. Interestingly, appetitive associations with protein can be established after one collecting visit, while several collecting events can result in long-term olfactory memories (Yossen et al. 2020). Moreover, learnt odours not only aid in food localisation but can also increase the acceptance of less appetitive resources (Yossen et al. 2020).

Although the role of odour cues in food localisation has been relatively well documented, less is known about their relevance in a food re-localisation context. Re-localisation of resources is crucial in scavenger species, such as *Vespula germanica*. When a carrion source is discovered, foragers return repeatedly to the specific place where the food was gathered (i.e. relocalisation behaviour) (Lozada and D'Adamo 2014). Upon leaving the resource, wasps perform specialised flights around the source through which they actively acquire visual information of the goal location (Zeil et al. 1996; Collet et al. 2013, 2016). Studies in *V. germanica* have demonstrated that foragers can identify the previously rewarded microsite with striking accuracy (D'Adamo and Lozada 2011, 2014; Lozada and D'Adamo 2014; Wilson-Rankin 2015), and even after 24 h (Moreyra et al. 2017). In addition, spatial memories can notably influence decision making, since foragers tend to prioritise the learnt microsite irrespective of source features such as resource quantity (Moreyra and Lozada 2019).

Most research has focussed on the role of odours and visual landmarks separately, although some of these studies shed light on the interplay between both modalities (Buteler et al. 2016; Lozada and D'Adamo 2006; Lozada and D'Adamo 2011). An earlier study found that the strength of the aversive response to a repellent odour decreased after an appetitive experience at the site, suggesting that learning could modulate odour response (Buteler et al. 2016). Studies in landmark use by *V. germanica* foragers have shown that experienced wasps frequently returned to the learnt microsite even after the food had been displaced nearby or removed (Lozada and D'Adamo 2006; Lozada and D'Adamo 2011). This impairment in food detection after foraging experience suggests that the odour would play a secondary role during food re-localisation. Nevertheless, it should be noted that

the only olfactory cue evaluated in these landmark studies was the resource odour. The importance of other behaviourally relevant odour stimuli in the relocalisation behaviour of *V. germanica* has not been studied in depth. Research on ants has indicated that the relative weight of odours and spatial memories may depend on the type of odour entailed, for instance, olfactory memories or pheromones (Grüter et al. 2011; Czaczkes et al. 2013; Oberhauser et al. 2019). Therefore, examining the role of different types of odours in different contexts could contribute to the understanding of olfaction as a guidance mechanism in vespids.

The aim of this study was to investigate whether the use of odour cues during carrion foraging in *V. germanica* wasps differs while localising or relocalising a food source. By means of field choice experiments, we assessed free-flying wasps' response to odours in three foraging scenarios: (1) carrion localisation by naïve wasps, (2) relocalisation of a stationary carrion source by experienced wasps, and (3) relocalisation of a displaced carrion source by experienced wasps. We used three different types of olfactory stimuli: an odour eliciting a spontaneous aversive response, a learnt odour eliciting an appetitive response, and the conspecifics' odour eliciting an attractive response.

## Materials and methods

### Non-food odours

Odours were chosen based on earlier studies that reported that they can significantly influence food preferences in *V. germanica* foragers (D'Adamo et al. 2000; Yossen et al. 2020). Lavender essential oil odour was used as an aversive cue (hereafter, aversive odour group) since it has been demonstrated that it elicits spontaneous avoidance responses (Zhang et al. 2013; Yossen et al. 2020). On the other hand, lavender essential oil was also used as a learnt appetitive cue (hereafter, learnt odour group). This odour can become attractive through associative learning, after allowing the wasps to collect meat from a source paired up with this odour (Yossen et al. 2020). Commercial lavender essential oil was purchased from Swiss-Just (manufactured under supervision and control of Ulrich Justrich AG, Walzenhausen, Switzerland).

Conspecifics' odour was used as an attractive social stimulus for *V. germanica* foragers (hereafter, conspecific odour group). Several studies have demonstrated that ethanolic extracts obtained from heads of *V. germanica* foragers elicit conspecific attraction and increase resource attractiveness when paired up with protein baits (D'Adamo et al. 2000, 2001, 2003, 2004). Head extracts were obtained following the protocol outlined by D'Adamo et al. (2004). A total of 800 *Vespula germanica* foragers were captured while

collecting meat from a feeder using a hand-held insect aspirator. Captured wasps were immediately transported to the laboratory and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until extraction. Heads were separated with a knife and mechanically ground in a mortar with 16 ml of 96% ethanol. The macerate was pipetted into Eppendorf tubes and centrifuged for 10 min at 14,000 rpm. The supernatant was transferred to a 20 ml glass container and restored to a volume of 16 ml. Head extracts were stored in a freezer ( $-6^{\circ}\text{C}$ ) until use.

### General procedure of field experiments

All the experiments were conducted with free-flying foraging wasps from natural colonies during the peak flight season of *V. germanica* wasps (February to April 2018 and 2021) in San Carlos de Bariloche ( $41^{\circ}\text{S}$ ,  $71^{\circ}\text{W}$ ), Río Negro, Argentina. Fieldwork was carried out along the shores of Gutiérrez, Moreno and Nahuel Huapi lakes, where foraging wasps can be found searching for food and water. Compared to forest or vegetated areas, lakeshores offer open homogeneous habitats, making them convenient for olfactory stimuli work under field conditions by reducing the possibility of odour plume interference. Experiments were performed between 10 a.m. and 5 p.m., on sunny days and under wind conditions ranging between 4 and 7 km/h at ground level, to favour the spread of the odour plume. Wind speed was measured with a digital anemometer (Mastech MS6252A, range:  $1.4 \sim 108.0 \pm 3\%$  km/h).

Behavioural experiments consisted of observing wasps that spontaneously arrived at a meat feeder placed at ground level. The feeder consisted of a cylindrical plastic container (2.5 cm in diameter  $\times$  1 cm high) with 10 g of fresh minced meat inside, set on a white plastic dish (9 cm in diameter  $\times$  0.5 cm high). In both the aversive odour group and the learnt odour group, the treated feeder consisted of a meat feeder with 100  $\mu\text{l}$  of pure lavender essential oil, as prior research showed that this volume generates a strong aversive response in most free-flying naïve wasps under field conditions (Buteler et al. 2016). Lavender oil was applied on a filter paper (7 cm in diameter, Whatman No. 1) placed between the cylindrical container and the white dish. In this way, wasps were exposed to the odour without coming into contact with the essential oil. In the conspecific odour group, the treated feeder contained 100  $\mu\text{l}$  of conspecifics' extract (equivalent to five wasps) applied on a small piece of filter paper (1 cm  $\times$  1.5 cm) placed on the meat, so that the odour plume emanated from the source in a manner similar to how it would naturally occur. The dish, the container, and the meat were completely replaced in each experiment. Once the experiment started, plastic elements and the meat were replaced every 15 min. In experiments involving training and testing phases (see sections below, Fig. 1b, c), the dish, the container, and the meat were also replaced before the

beginning of the testing phase. After use, plastic pieces were washed with water and detergent, then cleaned with 70% ethanol, and left to dry for 24 h before use. Containers and dishes were labelled and always used with a specific non-food odour (i.e., head extract, lavender odour, or none). In the experiments involving lavender odour (aversive odour and learnt odour treatments), the filter paper with essential oil was replaced every 5 min. In experiments with conspecifics' odour, the filter papers containing the head extract and the solvent were substituted every 2 min.

We worked with a single wasp per experiment and any other wasp that landed on the source was removed with an insect aspirator. In experiments carried out with experienced foragers, each wasp was marked at the beginning of the experiment with a washable paint dot in the thorax for further identification (D'Adamo and Lozada 2011) (Fig. 2b). This marking procedure caused minimal disturbance in the wasp. Replicates of each experiment were conducted in different locations (separated by at least 200 m) to sample wasps from different colonies (Edwards 1980; Moreyra et al. 2012).

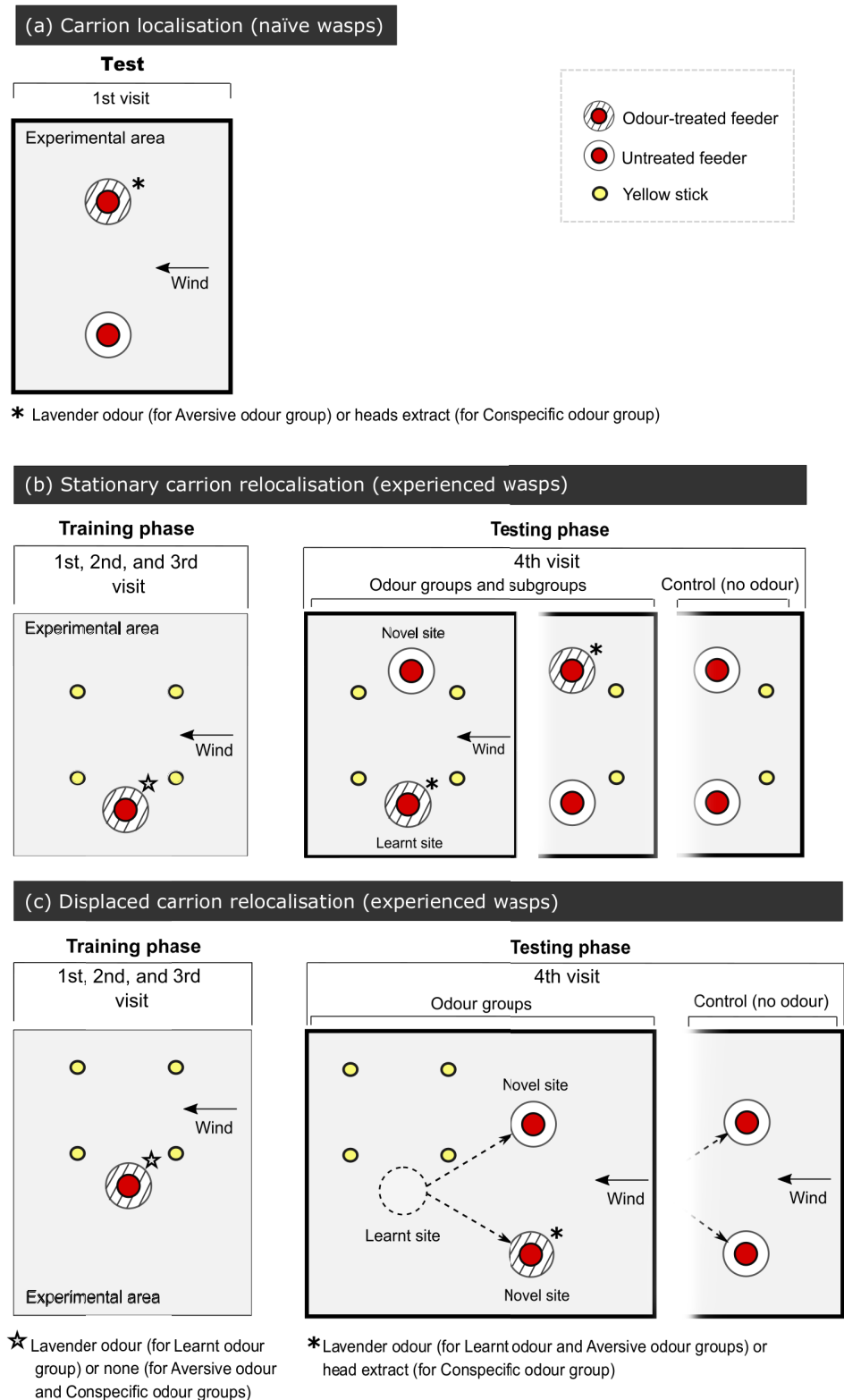
### Naïve wasps' preference (carrion localisation scenario)

To investigate the role of non-food odours in wasps' food choices, we first assessed the behaviour of naïve foragers, i.e. wasps without previous collecting experience with the meat feeder in preference tests. In this case, we evaluated two treatments: aversive odour and conspecific odour. In the aversive odour group, two identical feeders were offered, one of which contained lavender odour (see “Non-food odours” section above) and the other had no additional odour (Fig. 1a). Feeders were placed 60 cm from each other and perpendicular to the wind direction to avoid any overlapping of odour plumes. The same setup was used for the conspecific odour group, except that one of the feeders contained the head extract while the other one had the same volume of solvent (ethanol). When a wasp spontaneously arrived at the experimental area, we recorded the chosen feeder. The wasp choice was recorded both in terms of its first approach and its first landing. An approach occurred when the focal wasp arrived within 20 cm of a feeder. Landing was recorded when the wasp's legs touched the meat. Data was recorded by observation.

### Experienced wasps' preference during stationary carrion relocalisation

Here, we evaluated the role of odours in experienced wasps during the relocalisation of a stationary food source, when the influence of the learnt microsite was included (hereafter, stationary carrion relocalisation). To favour spatial learning

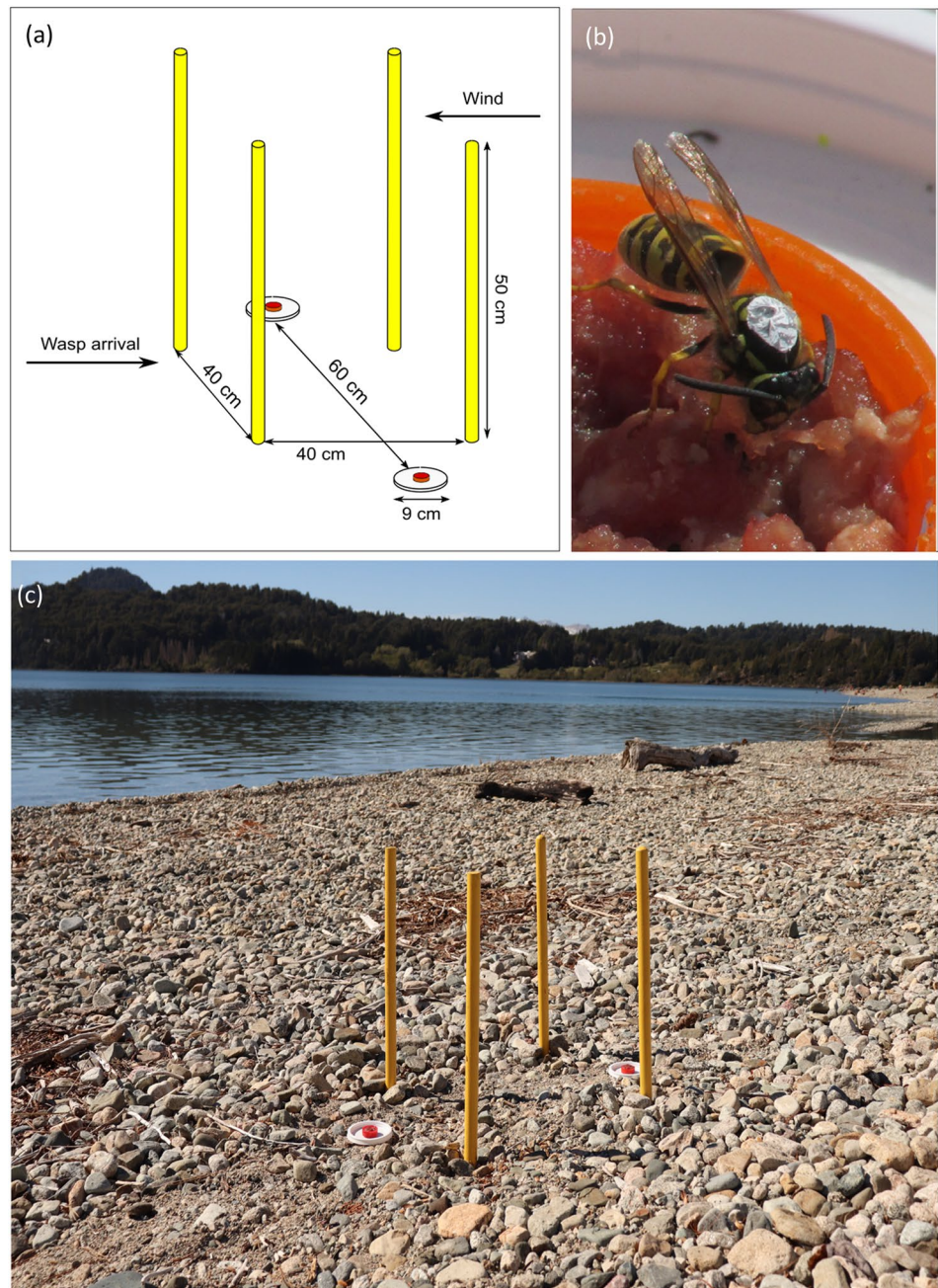
**Fig. 1** Diagram of the experimental design and spatial array used to examine the role of non-food odours in wasps' food choices in different foraging scenarios. **a** First, we evaluated naïve wasps' preference (i.e., carrion localisation context) for a meat source treated with an additional non-food odour versus an untreated identical meat source. Depending on the non-food odour used, two treatments were evaluated: aversive odour group and conspecific odour group. Afterwards, we assessed the preference of experienced wasps for a meat source with an additional non-food odour versus an untreated identical meat source, under two scenarios: **b** stationary carrion relocation (i.e., with influence of the learnt site), and **c** displaced carrion relocation (i.e., without influence of the learnt site). In this case, three treatments were assessed: aversive odour group, learnt odour group, and conspecific odour group. Both carrion relocation experiments involved a training phase and a testing phase. During the training, wasps were allowed to collect food during three consecutive visits from an untreated feeder, except in the learnt odour group, in which the training feeder contained lavender odour to promote the associative learning of the odour. Wasp choice was recorded in terms of first approach and first landing



of food location, four yellow wooden sticks (2.5 cm in diameter × 50 cm high; Fig. 2a) were inserted on the ground of the experimental area forming a square Fig. (40 × 40 cm,

Fig. 2c), since previous studies have demonstrated that the addition of conspicuous visual landmarks in open areas, such as lakeshores, significantly improved the discrimination

**Fig. 2** **a** Detailed spatial array used during the testing phase of stationary carrion experiments (*a* represents a feeder, *b* represents a wooden stick). Feeders were placed at ground level, forming a line perpendicular to the wind direction. **b** Photograph of a *Vespula germanica* foraging wasp collecting a piece of meat and detail of the washable mark used for identification. **c** Photograph of one of the locations where experiments were carried out (pictures: M. B. Yossen)



of the feeding microsite by *V. germanica* foragers (D'Adamo and Lozada 2007). The training feeder was placed 10 cm to the side of the square formed by the sticks (Fig. 2a) and its relative position (i.e., right or left, relative to wind direction) was randomized between experiments. To prevent possible odour cross-contamination, we used three sets of wooden sticks, one for each odour used (i.e., head extract, lavender odour, and none). Moreover, the sticks were cleaned with ethanol 70% between experiments.

We examined three odour treatments: aversive odour, learnt odour, and conspecific odour. We also conducted a control treatment in which no odours were added to the

feeder, to evaluate the role of the learnt microsite in food choices without the influence of non-food olfactory cues. In all cases, the experiment involved two phases: a training and a testing phase (Fig. 1b).

*Training phase:* The feeder used during the training phase varied according to the treatment: wasps of the aversive odour, conspecific odour, and control groups were trained with meat only, whereas wasps of the learnt odour treatment were allowed to collect meat from a source paired up with the lavender odour to promote the associative learning of this stimulus. After arriving at the experimental area, a naïve wasp was allowed to land

on the meat source and then was immediately marked as detailed in the General procedure of field experiments section. The marked wasp was then allowed to cut and carry a piece of meat to the nest during three consecutive visits.

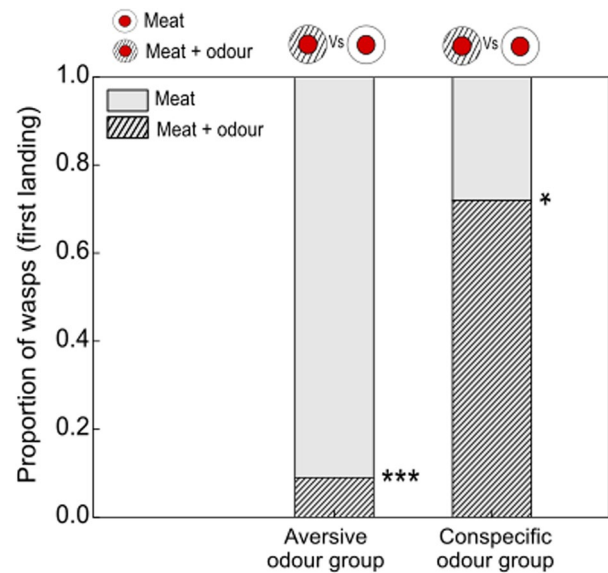
**Testing phase:** Before the fourth visit, the training feeder was removed and two new food sources were installed: one feeder was placed at the original training position (i.e., learnt site) while the other one was located on the opposite side of the square, 60 cm away (i.e., novel site) (Fig. 1b). As in the naïve wasp experiments, one of the feeders was treated (either with lavender oil or head extract) and the other one remained untreated, except in the case of the conspecific odour group in which 100 µl of solvent were added. Depending on the relative position of the odour-treated feeder (i.e., learnt site or novel site), two wasp subgroups were independently tested within each treatment. When the marked wasp returned to the experimental area, we recorded the chosen feeder. The wasp choice was recorded in terms of its first approach and first landing.

### Experienced wasps' preference during displaced carrion relocalisation

Here, we evaluated the role of odours in experienced wasps' choices, but excluding the influence of the learnt microsite through the displacement of the food source from its original position (i.e., displaced carrion relocalisation). As in stationary carrion relocalisation experiments, we evaluated three odour treatments (aversive odour, learnt odour, and conspecific odour) and a control treatment consisting of food without the addition of other odour cues. The experimental area was also visually enriched with four yellow wooden sticks and experiments involved a training phase and a testing phase (Fig. 1c).

**Training phase:** This was conducted as detailed in stationary carrion relocalisation experiments.

**Testing phase:** Before the fourth visit, the training feeder was removed and two new feeders were placed 1.5 m upwind from the original training site, 60 cm from each other. This V-shaped spatial array allowed us to decouple the new feeders from the learnt location, and thus avoid the influence of the learnt microsite in wasps' preference (Yossen et al. 2020). As detailed in the stationary carrion relocalisation experiments, one of the feeders contained the additional non-food odour, either lavender odour or conspecifics' odour, while the other one was untreated (except in the conspecific odour group, in which it contained ethanol). When the marked wasp returned to the experimental area, we recorded its choice in terms of its first approach and first landing.



**Fig. 3** Landing preference of naïve wasps for a meat source with one of two non-food odours versus an identical untreated source. Two treatments were evaluated: aversive odour group and conspecific odour group. (\*\*\*) indicates  $p < 0.0001$ , (\*) indicates  $p < 0.05$

### Data analysis

Exact binomial test was used to analyse the preference for the odour-treated food source versus the untreated source and determine whether the frequency of wasps on each feeder differed from the expected 50% random distribution. Separate statistical tests were conducted for each experiment (i.e., carrion localisation, stationary carrion relocalisation, and displaced carrion relocalisation) and treatment (i.e., aversive odour, learnt odour, conspecific odour, and control). Approach and landing responses were analysed independently. Statistical analyses were conducted using R version 3.6.1 (R Core Team 2019) at  $\alpha = 0.05$ .

## Results

### Naïve wasps' preference (carrion localisation scenario)

Naïve wasps of the aversive odour group displayed a strong rejection of the meat source with lavender odour as a low percentage of wasps approached and landed on the treated source (11% and 9%, respectively) (Exact binomial test, first approach:  $p < 0.0001$ ; first landing:  $p < 0.0001$ ;  $n = 44$ ). In the conspecific odour group, most of the wasps chose the meat source treated with head extract, both in terms of the first approach (72%) (Exact binomial test, first approach,

$p = 0.004$ ,  $n = 46$ ) and first landing (72%) (Exact binomial test, first landing,  $p = 0.004$ ,  $n = 46$ ; Fig. 3).

### Experienced wasps' preference during stationary carrion relocalisation

In most treatments, we found a significant preference for the source placed at the learnt location, irrespective of whether the feeder was treated with an odour or not.

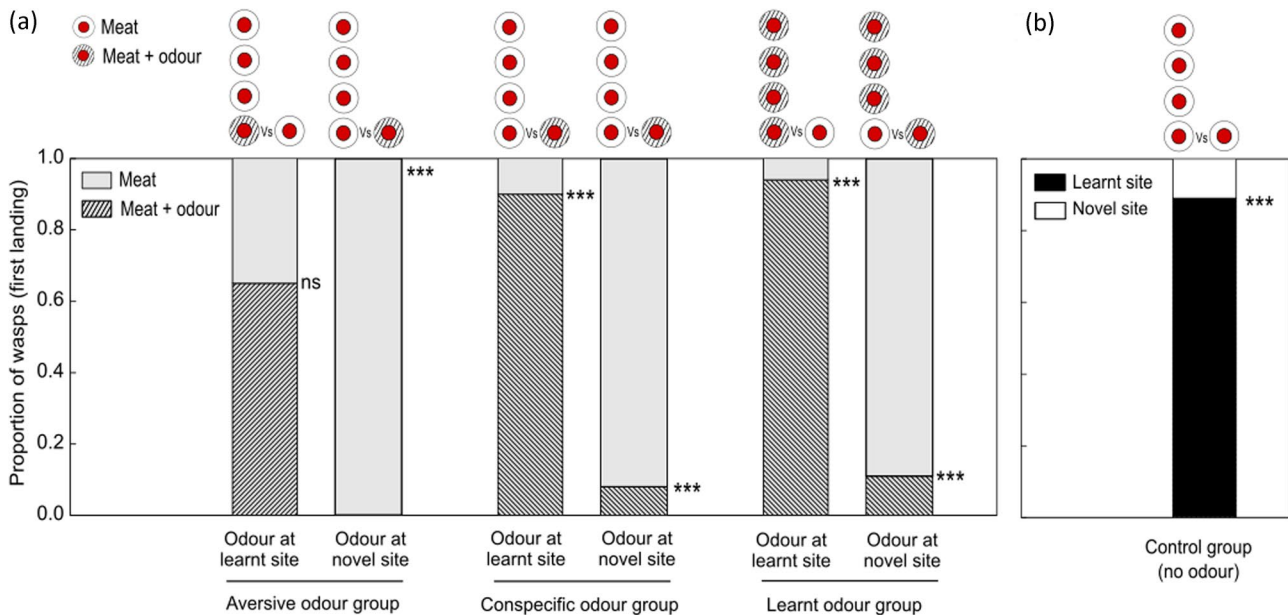
In the aversive odour group, when the feeder with the lavender odour was placed at the learnt site and the untreated feeder at the novel site, 86.5% of the wasps directed their flight towards the treated feeder (Exact binomial test, first approach:  $p < 0.0001$ ,  $n = 37$ ). However, many wasps that had approached the learnt site finally landed on the untreated meat source placed at the novel location. Even though there was a trend towards a preference for the learnt site in terms of the first landing (64.8%), it was not statistically significant (Exact binomial test, first landing:  $p = 0.09$ ,  $n = 37$ ; Fig. 4a). When the aversive lavender odour was released from the novel location, all returning wasps chose the learnt site where the untreated feeder was located (Exact binomial test, first approach:  $p < 0.0001$ ; first landing:  $p < 0.0001$ ;  $n = 35$ ; Fig. 4b).

In the learnt odour group, a strong preference for the learnt location was observed in both wasp subgroups.

When the lavender-treated feeder was located at the learnt site and the untreated feeder at the novel site, 94% of the wasps approached and landed on the treated meat source (Exact binomial test, first approach:  $p < 0.0001$ ; first landing:  $p < 0.0001$ ,  $n = 33$ ; Fig. 4a). When the treated feeder was placed at the novel site and the untreated feeder at the learnt site, 89.2% of the wasps approached and landed on the untreated meat source (Exact binomial test, first approach:  $p < 0.0001$ ; first landing:  $p < 0.0001$ ,  $n = 37$ ; Fig. 4b).

Similar to what was observed in the learnt odour treatment, when the feeder with conspecifics' odour was placed at the learnt site and the untreated feeder at the novel site, wasps of the conspecific odour group showed a clear preference (both in terms of first approach and first landing) for the feeder placed at the learnt location (90%) (Exact binomial test, first approach:  $p < 0.0001$ ; first landing,  $p < 0.0001$ ;  $n = 39$ ; Fig. 4a). In the reciprocal wasp subgroup in which the conspecifics' odour was located in the novel site and the untreated feeder at the learnt site, 92% of the wasps approached and landed on the untreated feeder (Exact binomial test, first approach,  $p < 0.0001$ ; first landing,  $p < 0.0001$ ,  $n = 34$ ; Fig. 4b).

Wasps also displayed a strong preference for the learned site (89%) when no additional odour was added to the food source during the testing phase (control group), both in terms of the first approach (Exact binomial test, first



**Fig. 4** Landing preference of experienced wasps for a food source with one of three non-food odours versus an identical untreated source, during the stationary carrion relocalisation. One feeder was located exactly in the same place as the training feeder (i.e., learnt site) while the other feeder was located 60 cm away, on the opposite side of the square (i.e., novel site). Three treatments were evaluated:

aversive odour, learnt odour, and conspecific odour. Depending on the relative position on the odour-treated feeder, two wasp subgroups were independently tested: **a** non-food odour at the learnt position and **b** non-food odour at the novel position. **c** Wasps' preference when no odours were added to the food sources (control group) (\*\*\*) indicates  $p < 0.0001$ , *ns* indicate no statistically significant differences

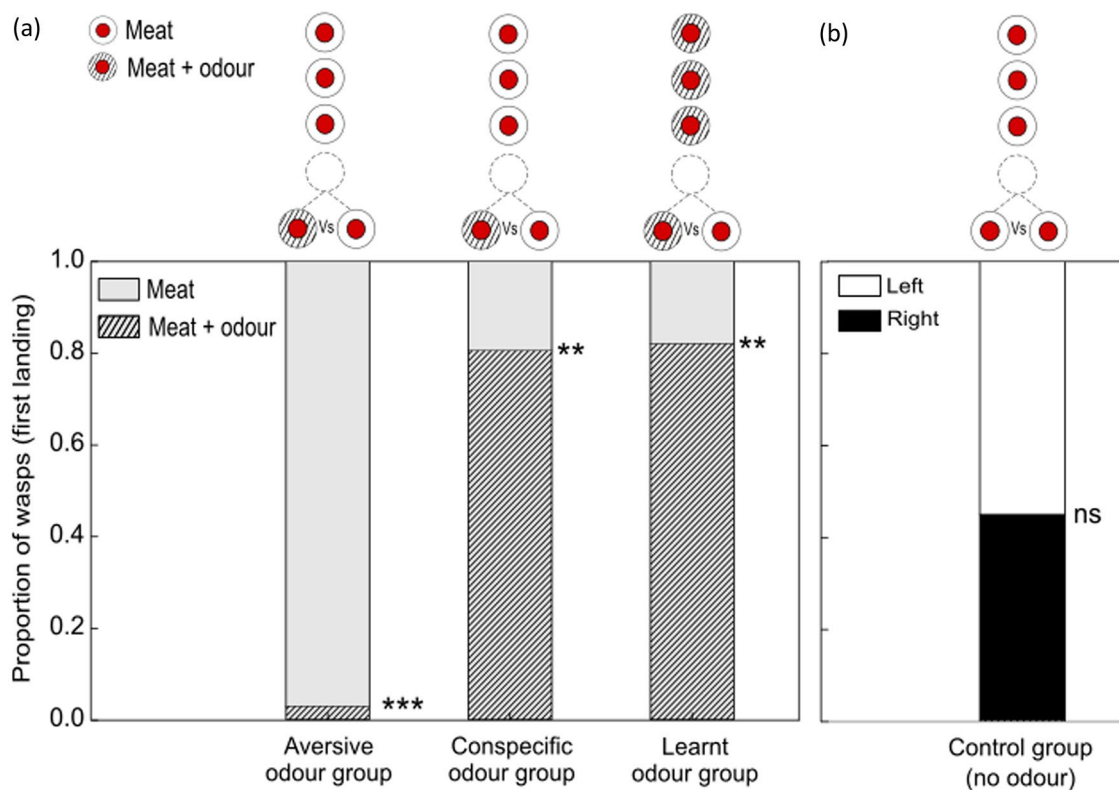
approach:  $p < 0.0001$ ,  $n = 35$ ) and first landing (Exact binomial test, first landing:  $p < 0.0001$ ,  $n = 35$ ; Fig. 4c).

### Experienced wasps' preference during displaced carrion relocation

When the two meat sources were placed 1.5 m upwind from the original training position, we found similar preference patterns to those observed during food localisation by naïve foragers. In the aversive odour group, all wasps that had been trained with meat alone avoided the food source with the lavender odour (Exact binomial test, first approach:  $p < 0.0001$ ; first landing:  $p < 0.0001$ ;  $n = 35$ ; Fig. 5). On the contrary, wasps of the learnt odour group showed a marked preference for the meat source with the learnt lavender odour (Exact binomial test, first approach:  $p < 0.001$ ; first landing:  $p < 0.001$ ;  $n = 38$ ; Fig. 5). Similarly, the presence of the head extract in the conspecific odour group also promoted a greater preference for the treated meat source (Exact binomial test, first approach:  $p < 0.001$ ; first landing:  $p < 0.001$ ,  $n = 34$ ; Fig. 5a). The control group revealed no significant differences in side preference (Exact binomial test, first approach:  $p = 0.63$ ; first landing:  $p = 0.63$ ,  $n = 40$ ; Fig. 5b).

### Discussion

This is the first study to demonstrate that the role of olfactory cues during carrion foraging in *V. germanica* varies considerably depending on whether wasps are locating or relocating a food source. Results obtained under the current experimental conditions reveal that, although odours play a central role in food searching, they are ignored when wasps return to a learnt foraging site. We found that odours markedly influenced foraging decisions in naïve wasps. However, during food relocation, experienced wasps flew towards the food source placed at the learnt location irrespective of the presence of any additional olfactory cue. Interestingly, when the food was decoupled from learnt visual landmarks by moving it to a novel position, experienced wasps used olfactory cues to find the resource as naïve foragers did. These findings suggest a hierarchy in the use of cues, in which local landmarks are more important for relocating the food source when the foraging scenario remains unaltered, while odours are used to locate a novel resource, or for relocating a known source



**Fig. 5** Landing preference of experienced wasps during the displaced carrion relocation. **a** Preference for a food source treated with one of three non-food odours versus an identical untreated source. Three treatments were evaluated: aversive odour, learnt odour, and conspecific odour. **b** Preference for an untreated food source placed on the right versus an identical source placed on the left, in relation to the wind direction (control group). (\*\*\*) indicates  $p < 0.0001$ , (\*\*) indicates  $p < 0.001$ , *ns* indicate no statistically significant differences

when local landmarks become inaccurate (e.g. when carcasses are displaced from their original position).

Interestingly, all odours evaluated in the present study were found to be irrelevant in guiding experienced wasps' first approach during stationary carrion experiments. Similar findings were found when assessing the resource (meat) odour (Lozada and D'Adamo 2011; D'Adamo and Lozada 2014). These studies have shown that, upon returning, trained foragers of *V. germanica* flew towards the learnt microsite even though the food had been moved 60 cm crosswind from its original position. The irrelevance of the olfactory cues upon relocalisation, irrespective of the odour type, suggests that olfaction (as a guidance modality) would not be involved in stationary food relocation. These findings differ from results obtained in ants, in which the interaction between odour and visual modalities depends on the type of olfactory cue implicated (e.g. social or learnt cue). For example, it has been shown that the trail pheromone becomes less relevant for *Lasius niger* ants as they gain experience along the path and spatial memories are acquired (Grüter et al. 2011), but it can still remain relevant in more complex trails (Czaczkes et al. 2013). In contrast, odour memories were more important than route memories in guiding experienced ants through the Y-maze (Oberhauser et al. 2019). However, it has also been shown that the combination of both modalities often improves the accuracy in goal localisation, since bimodal cues are often more rapidly learnt than unimodal cues (Steck et al. 2011; Buehlmann et al. 2020b). Further studies might contribute to elucidate whether such discrepancies in cue use are associated with differences in lifestyle and ecology, or are simply caused by experimental conditions.

We found that odours are secondarily used during carrion relocalisation when local landmarks fail to identify the reward location. A similar pattern in cue use was previously reported by Raveret-Richter and Jeanne (1985) in *Polybia sericea*, a strictly predatory wasp, while relocating prey remains. They found that nearby visual landmarks triggered intense search behaviour in returning foragers, while odour cues of the prey were more likely to elicit landings. Similar observations were later reported by Moreyra et al. (2007) in experienced *V. germanica* wasps. Possibly, these parallels between species with different feeding strategies might indicate that dominance of spatial memories constitutes a widespread relocalisation mechanism in a great variety of species (e.g., Tolman 1948). Flexibility in the use of cues would allow wasps to deal with changing scenarios since displacement of food resources is frequent in natural settings (Lozada and D'Adamo 2011). Our findings are in line with previous research demonstrating that the introduction of contextual changes (e.g., addition of novel resources or changes in landmarks colour) during carrion relocalisation can promote disengagement from past experiences,

facilitating the discovery of new resources (D'Adamo and Lozada 2014; Moreyra and Lozada 2020).

Context dependency in cue use by social wasps has also been demonstrated in other wasp species and in different foraging scenarios. Hendrichs et al. (1994) demonstrated that *V. germanica* can rapidly switch between olfactory and visual modalities depending on the habitat features. Under dense foliage conditions, prey localisation by *V. germanica* was guided mainly by kairomones, while in open habitats both visual and olfactory stimuli played a relevant role in directing wasp foraging. Another study showed that local enhancement can depend on several factors, such as the degree of habitat anthropisation (Wilson-Rankin 2015). This work also showed that attraction to conspecifics seems to be greater in the absence of other food-related cues, suggesting that local enhancement is more likely to occur in naïve foragers, as was demonstrated in stingless bees (Slaa et al. 2003). Interestingly, our results show that naïve *V. germanica* wasps are equally attracted by the conspecific odour as experienced foragers are while searching for a resource that has been displaced. Thus, spatial learning constitutes another factor modulating the response to social stimuli.

Several studies have shown that the searching behaviour during food relocalisation can also be influenced by the type of resource being exploited (e.g., carbohydrates or protein) (D'Adamo and Lozada 2003; Moreyra et al. 2007; Wilson-Rankin 2014). It should be noted that the results of the current study were obtained in the context of protein scavenging. However, social wasps also exploit carbohydrate-rich sources, such as fruit and aphid honey-dews, which constitute the main source of energy for adults (Edwards 1980). As opposed to carrion, which typically constitutes an ephemeral resource distributed as point sources, carbohydrate sources are a semi-permanent resource generally distributed in patches. Previous studies in *V. germanica* have reported differences in search response over the learnt feeding location between wasps trained with protein and carbohydrates (D'Adamo and Lozada 2003; Moreyra et al. 2007). After removal of the food source, returning protein-trained wasps performed a higher number of hoverings and landings over the learnt microsite than did honey-trained wasps. Along the same line, when ants return to a foraging location and the food is no longer there, they engage in a different systematic search pattern depending on the type of resource exploited (e.g., Traniello 1988; Fourcassié and Traniello 1994; Schultheiss and Cheng 2013). These authors found that the spread of the search path was wider for protein than for carbohydrates sources. These behavioural patterns are in accordance with the fact that protein sources tend to be scattered and less clumped in nature than carbohydrates. Therefore, it would be interesting to further investigate how experienced wasps use odour and visual cues while relocating carbohydrate resources.



Overall, this work provides new insights into the role of olfaction in short-range navigation of *V. germanica* foragers while exploiting abundant protein resources. On one hand, the results indicate a context-dependent use of olfactory cues, in which their role radically varies according to the activity that the forager is performing: either in searching for a new food source, or in relocating a stationary food source, or in relocating a food source that was moved from the original position. On the other hand, these findings provide corroborating evidence that spatial memories constitute the primary guidance mechanism involved in carrion relocation, as suggested in earlier studies (e.g., Lozada and D'Adamo 2014). The present study sheds new light on the behavioural plasticity of vespids while exploiting resources under dynamic contexts.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10071-021-01583-4>.

**Acknowledgements** We thank Damasía Lozada for revising the English text and Administración de Parques Nacionales for granting us permission to carry out the experiments in Nahuel Huapi National Park.

**Author contributions** MBY, MB, and ML contributed to the design of the research. MBY and MB carried out laboratory work. MBY performed behavioural experiments and statistical analyses. MBY, MB, and ML wrote the paper.

**Funding** This work was supported by the National University of Comahue and National Council of Scientific and Technological Research of Argentina (CONICET), and grants from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2016 0293) to M.B.

**Data availability** The datasets for this study can be found in the supplementary materials.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

## References

- Buehlmann C, Aussel A, Graham P (2020a) Dynamic multimodal interactions in navigating wood ants: what do path details tell us about cue integration? *J Exp Biol* 223:jeb221036. <https://doi.org/10.1242/jeb.221036>
- Buehlmann C, Mangan M, Graham P (2020b) Multimodal interactions in insect navigation. *Anim Cog* 23:1129–1141. <https://doi.org/10.1007/s10071-020-01383-2>
- Buteler M, Lozada M, D'Adamo P, Melo R, Stadler T (2016) Behavioural responses of *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) wasps exposed to essential oils. *Austr Entomol* 55:308–315. <https://doi.org/10.1111/aen.12187>
- Collett M, Chittka L, Collett TS (2013) Spatial memory in insect navigation. *Curr Biology* 23:R789–R800. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.020>
- Collett TS, Philippides A, de Ibarra NH (2016) Insect navigation: how do wasps get home? *Curr Biology* 26:470–482. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.003>
- Czaczkes TJ, Grüter C, Ellis L, Wood E, Ratnieks FL (2013) Ant foraging on complex trails: route learning and the role of trail pheromones in *Lasius niger*. *J Exp Biol* 216:188–197. <https://doi.org/10.1242/jeb.076570>
- D'Adamo P, Lozada M (2003) The importance of location and visual cues during foraging in the German wasp (*Vespula germanica* F.) (Hymenoptera: Vespidae). *N Z Jo Zool* 30:171–174. <https://doi.org/10.1080/03014223.2003.9518336>
- D'Adamo P, Lozada M (2007) Foraging behavior related to habitat characteristics in the invasive wasp *Vespula germanica*. *Insect Sci* 14:383–388. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2007.00165.x>
- D'Adamo P, Lozada M (2011) Cognitive plasticity in foraging *Vespula germanica* wasps. *J Insect Sci* 11:1–11. <https://doi.org/10.1673/031.011.10301>
- D'Adamo P, Lozada M (2014) How context modification can favor the release of past experience in *Vespula germanica* wasps, enabling the detection of a novel food site. *J Insect Behav* 27:395–402. <https://doi.org/10.1007/s10905-013-9434-0>
- D'Adamo P, Corley J, Sackmann P, Lozada M (2000) Local enhancement in the wasp *Vespula germanica*: Are visual cues all that matter? *Insectes Soc* 47:289–291. <https://doi.org/10.1007/PL00001717>
- D'Adamo P, Corley JC, Lozada M (2001) Attraction of *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) foragers by conspecific heads. *J Econ Entomol* 94:850–852. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.4.850>
- D'Adamo P, Lozada M, Corley JC (2003) Conspecifics enhance attraction of *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) foragers to food baits. *Ann Entomol Soc Am* 96:685–688. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2003\)096\[0685:CEAOVG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2003)096[0685:CEAOVG]2.0.CO;2)
- D'Adamo P, Lozada M, Corley JC (2004) An attraction pheromone from heads of worker *Vespula germanica* wasps. *J Insect Behav* 17:809–821. <https://doi.org/10.1023/B:JOIR.0000048990.22170.96>
- Edwards R (1980) Social wasps. Their biology and control. Rentokil Ltd
- El-Sayed AM, Jósvali JK, Brown RL, Twidle A, Suckling DM (2018) Associative learning of food odor by social wasps in a natural ecosystem. *J Chem Ecol* 44:915–921. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0984-7>
- Fourcassié V, Traniello JF (1994) Food searching behaviour in the ant *Formica schaufussi* (Hymenoptera, Formicidae): response of naive foragers to protein and carbohydrate food. *Anim Behav* 48:69–79. <https://doi.org/10.1006/anbe.1994.1212>
- Fukushi T, Wehner R (2004) Navigation in wood ants *Formica japonica*: context dependent use of landmarks. *J Exp Biol* 207:3431–3439. <https://doi.org/10.1242/jeb.01159>
- Gong Z, Tan K, Nieh JC (2019) Hornets possess long-lasting olfactory memories. *J Exp Biol* 222:jeb00881. <https://doi.org/10.1242/jeb.200881>
- Grüter C, Leadbeater E (2014) Insights from insects about adaptive social information use. *Trends Ecol Evol* 29:177–184. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.01.004>
- Grüter C, Czaczkes TJ, Ratnieks FLW (2011) Decision making in ant foragers (*Lasius niger*) facing conflicting private and social information. *Behav Ecol Sociobiol* 65:141–148. <https://doi.org/10.1007/s00265-010-1020-2>
- Hendrichs J, Katsoyannos BI, Wornoayporn V, Hendrichs MA (1994) Odour-mediated foraging by yellowjacket wasps (Hymenoptera: Vespidae): predation on leks of pheromone-calling mediterranean

- fruit fly males (Diptera: Tephritidae). *Oecologia* 99:88–94. <https://doi.org/10.1007/BF00317087>
- Jander R (1998) Olfactory learning of fruit odors in the eastern yellow jacket, *Vespula maculifrons* (Hymenoptera: Vespidae). *J Insect Behav* 11:879–888. <https://doi.org/10.1023/A:1020868311982>
- Jeanne RL, Taylor BJ (2009) Individual and social foraging in social wasps. In: Jarau S, Hrnčir M (eds) Food exploitation in social insects: ecological, behavioral, and theoretical approaches. CRC Press, pp 53–79
- Knaden M, Graham P (2016) The sensory ecology of ant navigation: from natural environments to neural mechanisms. *Annu Rev Entomol* 61:63–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023703>
- Lozada M, D'Adamo P (2011) Past experience: a help or a hindrance to *Vespula germanica* foragers? *J Insect Behav* 24:159–166. <https://doi.org/10.1007/s10905-010-9244-6>
- Lozada M, D'Adamo P (2014) Learning in an exotic social wasp while relocating a food source. *J Physiol Paris* 108:187–193. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.05.006>
- Moreyra S, Lozada M (2019) How single events can influence decision-making in foraging *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae) social wasps. *Austral Entomol* 58:443–450. <https://doi.org/10.1111/aen.12337>
- Moreyra S, D'Adamo P, Lozada M (2007) Odour and visual cues utilised by German yellowjackets (*Vespula germanica*) while relocating protein or carbohydrate resources. *Aust J Zool* 54:393–397. <https://doi.org/10.1071/ZO06029>
- Moreyra S, D'Adamo P, Lozada M (2012) Cognitive processes in *Vespula germanica* wasps (Hymenoptera: Vespidae) when relocating a food source. *Ann Entomol Soc Am* 105:128–133. <https://doi.org/10.1603/AN11097>
- Moreyra S, D'Adamo P, Lozada M (2017) Long-term spatial memory in *Vespula germanica* social wasps: the influence of past experience on foraging behavior. *Insect Sci* 24:853–858. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12366>
- Oberhauser FB, Schlemm A, Wendt S, Czaczkes TJ (2019) Private information conflict: *Lasius niger* ants prefer olfactory cues to route memory. *Anim Cogn* 22:355–364. <https://doi.org/10.1007/s10071-019-01248-3>
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Raveret-Richter M (2000) Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behaviour. *Annu Rev Entomol* 45:121–150. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.121>
- Raveret-Richter M, Jeanne RL (1985) Predatory behavior of *Polybia sericea* (Olivier), a tropical social wasp (Hymenoptera: Vespidae). *Behav Ecol Sociobiol* 16:165–170. <https://doi.org/10.1007/BF00295151>
- Schultheiss P, Cheng K (2013) Finding food: outbound searching behavior in the Australian desert ant *Melophorus bagoti*. *Behav Ecol* 24:128–135. <https://doi.org/10.1093/beheco/ars143>
- Slaa EJ, Wassenberg J, Biesmeijer JC (2003) The use of field-based social information in eusocial foragers: local enhancement among nestmates and heterospecifics in stingless bees. *Ecol Entomol* 28:369–379. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2003.00512.x>
- Spencer EE, Barton PS, Ripple WJ, Newsome TM (2020) Invasive European wasps alter scavenging dynamics around carrion. *Food Webs* 1:e00144
- Steck K, Hansson BS, Knaden M (2011) Desert ants benefit from combining visual and olfactory landmarks. *J Exp Biol* 214:1307–1312. <https://doi.org/10.1016/j.jo.2020.e00144>
- Tolman EC (1948) Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev* 55:189–208. <https://doi.org/10.1037/h0061626>
- Traniello JFA (1988) Variation in foraging behavior among workers of the ant *Formica schaufussi*; Ecological correlates of search behavior and the modification of search pattern. In: Jeanne RL (ed) Interindividual behavioral variation in social insects. Westview Press, pp 91–112
- Wilson-Rankin EE (2014) Social context influences cue-mediated recruitment in an invasive social wasp. *Behav Ecol Sociobiol* 68:1151–1161. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1726-7>
- Wilson-Rankin EE (2015) Level of experience modulates individual foraging strategies of an invasive predatory wasp. *Behav Ecol Sociobiol* 69:491–499. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1861-1>
- Yossen MB, Lozada M, Kuperman MN, Gonzalez S, Gastaldi B, Buteler M (2019) Essential oils as vespidae wasp repellents: implications for their use as a management strategy. *J Appl Entomol* 143:635–643. <https://doi.org/10.1111/jen.12631>
- Yossen MB, Buteler M, Lozada M (2020) Foraging experience modulates response to aversive odour cues in social wasps. *Anim Behav* 164:113–122. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.04.007>
- Zeil J, Kelber A, Voss R (1996) Structure and function of learning flights in ground-nesting bees and wasps. *J Exp Biol* 199:245–252. <https://doi.org/10.1242/jeb.199.1.245>
- Zhang QH, Schneidmiller RG, Hoover DR (2013) Essential oils and their compositions as spatial repellents for pestiferous social wasps. *Pest Manag Sci* 69:542–552. <https://doi.org/10.1002/ps.3411>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Terms and Conditions

Springer Nature journal content, brought to you courtesy of Springer Nature Customer Service Center GmbH (“Springer Nature”).

Springer Nature supports a reasonable amount of sharing of research papers by authors, subscribers and authorised users (“Users”), for small-scale personal, non-commercial use provided that all copyright, trade and service marks and other proprietary notices are maintained. By accessing, sharing, receiving or otherwise using the Springer Nature journal content you agree to these terms of use (“Terms”). For these purposes, Springer Nature considers academic use (by researchers and students) to be non-commercial.

These Terms are supplementary and will apply in addition to any applicable website terms and conditions, a relevant site licence or a personal subscription. These Terms will prevail over any conflict or ambiguity with regards to the relevant terms, a site licence or a personal subscription (to the extent of the conflict or ambiguity only). For Creative Commons-licensed articles, the terms of the Creative Commons license used will apply.

We collect and use personal data to provide access to the Springer Nature journal content. We may also use these personal data internally within ResearchGate and Springer Nature and as agreed share it, in an anonymised way, for purposes of tracking, analysis and reporting. We will not otherwise disclose your personal data outside the ResearchGate or the Springer Nature group of companies unless we have your permission as detailed in the Privacy Policy.

While Users may use the Springer Nature journal content for small scale, personal non-commercial use, it is important to note that Users may not:

1. use such content for the purpose of providing other users with access on a regular or large scale basis or as a means to circumvent access control;
2. use such content where to do so would be considered a criminal or statutory offence in any jurisdiction, or gives rise to civil liability, or is otherwise unlawful;
3. falsely or misleadingly imply or suggest endorsement, approval, sponsorship, or association unless explicitly agreed to by Springer Nature in writing;
4. use bots or other automated methods to access the content or redirect messages
5. override any security feature or exclusionary protocol; or
6. share the content in order to create substitute for Springer Nature products or services or a systematic database of Springer Nature journal content.

In line with the restriction against commercial use, Springer Nature does not permit the creation of a product or service that creates revenue, royalties, rent or income from our content or its inclusion as part of a paid for service or for other commercial gain. Springer Nature journal content cannot be used for inter-library loans and librarians may not upload Springer Nature journal content on a large scale into their, or any other, institutional repository.

These terms of use are reviewed regularly and may be amended at any time. Springer Nature is not obligated to publish any information or content on this website and may remove it or features or functionality at our sole discretion, at any time with or without notice. Springer Nature may revoke this licence to you at any time and remove access to any copies of the Springer Nature journal content which have been saved.

To the fullest extent permitted by law, Springer Nature makes no warranties, representations or guarantees to Users, either express or implied with respect to the Springer nature journal content and all parties disclaim and waive any implied warranties or warranties imposed by law, including merchantability or fitness for any particular purpose.

Please note that these rights do not automatically extend to content, data or other material published by Springer Nature that may be licensed from third parties.

If you would like to use or distribute our Springer Nature journal content to a wider audience or on a regular basis or in any other manner not expressly permitted by these Terms, please contact Springer Nature at

[onlineservice@springernature.com](mailto:onlineservice@springernature.com)