

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas

Aprendizagem de Comportamentos Sexuais em
Drosophila mercatorum

Andrei Polejack

Brasília
2002

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Ecologia

Aprendizagem de Comportamentos Sexuais em
Drosophila mercatorum

Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-
graduação em Ecologia
da Universidade de
Brasília como parte dos
requisitos necessários
para a obtenção do título
de mestre em Ecologia.

Aluno: Andrei Polejack

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosana Tidon

Brasília - DF

- 2002 -

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Ecologia

**Aprendizagem de Comportamentos Sexuais em
*Drosophila mercatorum***

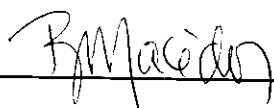
Autor: Andrei de Abreu Sodré Polejack

Dissertação apresentada ao Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ecologia.

À comissão formada por



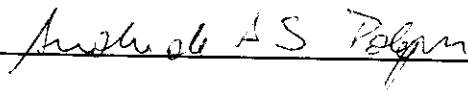
Francisca Carolina do Val
(membro titular)



Regina Helena Ferraz Macedo
(membro titular)



Rosana Tidon
(orientadora)



Andrei de A. S. Polejack
(aluno)

Brasília, 12 de abril de 2002

"Homem! por mais que a Idéia desintegres,
Nessas perquisições que não têm pausa,
Jamais, magro homem, saberás a causa
De todos os fenômenos alegres!"

Augusto dos Anjos

para minhas meninas

Agradecimentos

À Profª Drª Rosana Tidon por acreditar que isto fosse possível, pela confiança em mim depositada e pela mão de mãe na orientação

Ao Prof. Dr. Fábio de Melo Sene pelas linhagens de *Drosophila mercatorum pararepleta*

À Profª Drª Regina Helena Ferraz Macedo pela revisão do manuscrito

À Profª. Drª. Francisca Carolina do Val pelo monólogo da mosca e pelos periódicos

À Profª. Drª. Nilda Maria Diniz pelas dicas e pela revisão do manuscrito

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Evolutiva da UnB: Renata, Arthur, Luzitano, Denise e Bárbara pelo trabalho em conjunto, pela atmosfera ideal de trabalho e principalmente pela cumplicidade

À Profª Drª Maura Helena Manfrin pelas conversas e dicas

Ao Prof Dr. Carlos Thomáz pela teoria de memória e os artigos com *Drosophila*

À minha querida Michelle por não haver pedido divórcio

À minha irmã e amiga Larissa Polejack por me ajudar a ser quem sou

À Diana Simões pela tentativa frustrada das câmaras

Ao CNPq, à FINATEC e à Animal Behaviour Society pelo custeamento financeiro e possibilitação deste projeto

Finalmente, a Deus e à minha família, simplesmente por estarem ali.

Resumo:

Drosophila é um excelente modelo animal para estudos de aprendizagem e memória. Entretanto, formas de aprendizagem mais complexas, como a habilidade de aprender através da observação de um conspecífico, não foram testadas no gênero. Com isso, buscamos evidências da presença de aprendizagem social analisando um estímulo natural das espécies: o comportamento de corte. Expusemos machos virgens à corte de um casal e permitimos ao macho experimental realizar duas cópulas: uma subsequente à exposição do casal, e outra um dia depois. Comparamos suas performances às de um grupo controle, que não presenciou comportamentos sexuais. Medimos os comportamentos da latência da corte, a corte em si (orientação, "tapping" e o vibrar de asas), outros comportamentos e a cópula em 32 sujeitos experimentais e 27 controle de *D. mercatorum*, uma espécie Neotropical. Os resultados mostram que, embora possua características ecológicas para tal, esta espécie não demonstra aprendizagem social. Seus comportamentos sexuais são regidos em grande parte por mecanismos inatos, que podem, contudo, ser modificados por experiência.

Abstract

Drosophila is an excellent animal model for learning and memory studies. However, more complex learning forms, as the ability of learning through the observation of a conspecific, were not tested in the genus. With that in mind, we looked for evidences of the presence of social learning by analyzing a natural stimulus of the species: the courtship behavior. We exposed virgin males to the courtship and mating of a couple and we allowed the experimental subject to accomplish two matings: one subsequent to the couple's exhibition, and other one day later. We compared their performances with a group control, which didn't witness sexual behaviors. We measured the behaviors: courtship latency, courtship (orientation, tapping and wing vibrating), other behaviors and copulation in 32 experimental subjects and 27 control of *D. mercatorum*, a Neotropical species. The results show that, although ecologically fit, this species doesn't demonstrate social learning. Its sexual behaviors are largely governed by innate mechanisms that can be, however, modified by experience.

ÍNDICE

RESUMO:	5
ABSTRACT	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	15
2.2. LOGÍSTICA.....	16
2.3. DESENHO EXPERIMENTAL:	17
2.3.1. 1ª ETAPA EXPERIMENTAL (TREINO):.....	19
2.3.2. 2ª ETAPA EXPERIMENTAL (TESTE 1: imediatamente após a observação):.....	19
2.3.3. 3ª ETAPA EXPERIMENTAL (TESTE 2 - vinte e quatro horas após a observação).....	20
2.4. GRUPO CONTROLE.....	22
2.5. A EVENTUAL TERCEIRA CÓPULA	22
2.6. NÚMERO DE DESCENDENTES	22
3. RESULTADOS.....	24
3.1. RESULTADOS GERAIS.....	24
3.2. TESTANDO A HIPÓTESE DA APRENDIZAGEM SOCIAL (SUJEITOS C vs E).....	26
3.3. TESTANDO A HIPÓTESE DA FACILITAÇÃO (TESTE 1 vs 2).....	28
3.3.1. <i>EXISTE UM PADRÃO? Analisando uma terceira cópula</i>	32
3.4. NÚMERO DE DESCENDETES.....	35
4. DISCUSSÃO	36
4.1. RESULTADOS GERAIS.....	36
4.2. TESTANDO A HIPÓTESE DA APRENDIZAGEM SOCIAL (C vs E).....	37
4.3. TESTANDO A HIPÓTESE DA FACILITAÇÃO (TESTE 1 vs 2).....	41
4.4. NÚMERO DE DESCENDENTES	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
6. BIBLIOGRAFIA	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ritual de corte em <i>Drosophila</i>	12
Figura 2: Câmaras experimentais	17
Figura 3: Componentes da sessão	18
Figura 4: Esquema experimental	21
Figura 5: Comparações entre sujeitos C e E	26
Figura 6: Comparações entre sujeitos C e E: elementos da corte	27
Figura 7: Comparações entre 1 e 2: sessão, outros e cópula	28
Figura 8: Comparações entre 1 e 2: latência da corte e corte	29
Figura 9: Comparações entre 1 e 2: elementos da corte	31
Figura 10: Comparações entre 1, 2 e 3: latência da corte e corte	33
Figura 11: Comparações entre 1, 2 e 3: elementos da corte	34
Figura 12: Número de descendentes	35

1. INTRODUÇÃO

Durante a vida, um animal eventualmente se depara com situações que desencadeiam comportamentos adequados. Aprender é modificar os comportamentos futuros de forma durável, em resposta a uma experiência prévia na vida do indivíduo (Alcock, 1993; Dukas, 1998, Kandel *et al.*, 2000). Embora as informações adquiridas individualmente não possam se propagar geneticamente para os descendentes, a aprendizagem tem um papel fundamental no sucesso daquele indivíduo, uma vez que beneficia sua sobrevivência e adequação ao meio fazendo com que tenha maiores possibilidades de produzir descendentes. Dentre as formas de aprendizagem descritas por psicólogos, a facilitação é a mais simples. Ela é o simples refinamento da função, o mecanismo pelo qual os animais adequam seus comportamentos através da tentativa e erro (Lorenz, 1981). Sugere-se que, por ser uma forma primitiva de aprendizagem, ela seja compartilhada por todos os grupos animais (Tully *et al.*, 1996) e seja o mecanismo pelo qual eles possam ajustar comportamentos inatos (Dukas, 1998).

Fenômenos mais complexos de aprendizagem também ocorrem em muitos grupos animais e dependem de contextos ecológicos específicos para surgirem. Um destes fenômenos é a aprendizagem social, i. e., os indivíduos podem se beneficiar da experiência de outros indivíduos da mesma espécie observando seus comportamentos e aprendendo com eles: sempre que os indivíduos se agregam, há uma oportunidade para que estes aprendam uns com os outros (Shettleworth, 1998). Esta aprendizagem complexa já foi demonstrada com sucesso em primatas e aves e, por essa razão, existe uma visão antropomorfizada de que formas mais complexas surgiram apenas em

grupos filéticos de evolução mais recente. Na verdade, espera-se que a aprendizagem social surja em espécies que se agreguem em grupos, que sejam generalistas e cuja competição por recursos seja intensa (Shettleworth, *op. cit.*). Um animal pode se beneficiar da observação dos comportamentos de outrem de várias formas. Primeiro, no caso de ser generalista, evita a manipulação de novos itens alimentares contaminados ou venenosos. Segundo, tendo competição intensa, pode aprender a localizar recursos mais rapidamente. Finalmente, pode aprender o uso de ferramentas e a resolver problemas comuns à ecologia daquela população. Acredita-se que esta seja uma forma genuína de transmissão de cultura nos animais, definindo cultura como a transmissão de informações de uma geração à seguinte.

Muitas espécies animais poderiam teoricamente ter desenvolvido a habilidade de aprender por observação pois possuem condições ecológicas para tal. *Drosophila* possui estas condições: os membros de várias espécies se agrupam nos sítios de forrageio; é generalista, utilizando diversos microorganismos presentes nos vegetais em decomposição; e é um gênero cuja competição por alimento é intensa e os indivíduos devem ser rápidos na localização do mesmo. No entanto, é um gênero que apresenta ciclo de vida curto, portanto, os comportamentos que beneficiem sua reprodução e sobrevivência devem ser regidos em grande parte por mecanismos inatos que poderiam ser ajustados por aprendizagem. Por exemplo, acredita-se que um macho maduro de *Drosophila* pode mudar suas preferências de corte ao longo do tempo devido aos processos de facilitação e aprendizagem associativa (Jahn, 1997). Assim, uma forte pressão de seleção deve ter selecionado

populações capazes de aprender informações relevantes do meio de forma a utilizá-las eficazmente depois.

Em *Drosophila*, os indivíduos de várias espécies e em diferentes estágios de desenvolvimento convivem nos frutos fermentados e dividem seu tempo forrageando, copulando e ovipositando. Um macho que se aproxima de um vegetal em decomposição irá, além de se alimentar, procurar por potenciais parceiras sexuais que sejam de sua espécie e que estejam disponíveis sexualmente. Para tal, ele exhibe um ritual de corte que é um dos comportamentos mais complexos em *Drosophila* (Spieth, 1974; Connolly & Tully, 1998).

O ritual de corte é dividido em várias etapas que não têm uma ordem precisa (Figura 1), e acredita-se que cada uma destas etapas possuam significados ecológicos importantes. Sumariamente, o macho se orienta e segue um drosofilídeo até que, testando-o através do "tapping" (toque com a pata, onde se localizam quimiorreceptores capazes de perceber informações acerca do objeto tocado), reconheça seu gênero e fertilidade. Caso seja uma fêmea, e caso esta esteja fértil e não inseminada, ele irá então segui-la avidamente vibrando as suas asas como um sinal de sua espécie e de seu vigor (Ewing & Bennet-Clark, 1968; Kyriacou & Hall, 1982; Ritchie *et al.*, 1999). A fêmea então reduz a velocidade de marcha e este macho pode se aproximar e rodeá-la, ainda vibrando as asas. Se a fêmea abrir suas asas em sinal de aceitação, ele irá então levar sua probóscide à genitália da fêmea ("licking") e poderá montá-la e transferir seu esperma (Hall, 1994). É um comportamento complexo, portanto acredita-se que sua base genética seja forte, sendo um comportamento estereotipado para não ser mal interpretado. Ainda assim,

machos devem executar bem este repertório para que consigam o maior número possível de cópulas em seu breve tempo de prontidão fisiológica sexual. Logo, espera-se que sejam capazes de aprender a ajustar este ritual de forma a maximizar seu sucesso reprodutivo e certamente *Drosophila* tem as capacidades cognitivas para tal.

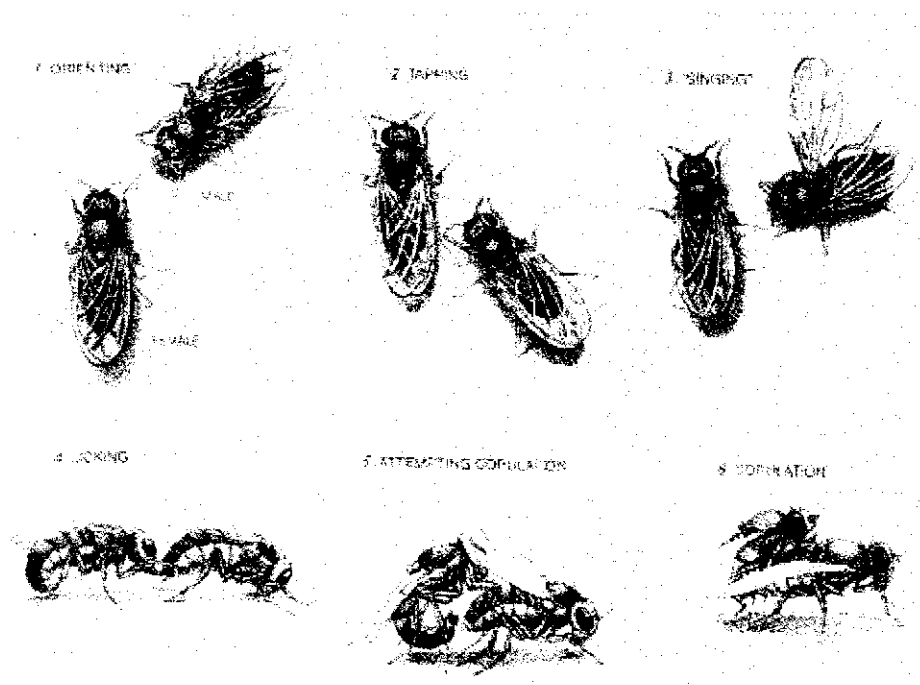


Figura 1: Ritual de corte em *Drosophila*. Retirado de Powell (1997).

Ao contrário do que se acreditava, invertebrados não possuem apenas comportamentos inatos: várias formas de aprendizagem foram demonstradas em *Drosophila*. O mini-cérebro desta mosca é altamente qualificado para estudos acerca das funções cognitivas básicas (Menzel & Glurfa, 1999). Muitos pesquisadores procuram pelas bases genéticas da aprendizagem e memória em humanos utilizando como modelo mutações em *Drosophila* (Corfas & Dudai, 1991; Folkers *et al.* 1993; Tully, 1994, 1996; Tully *et al.*, 1994; DeZazzo & Tully, 1995; Connolly *et al.*, 1996; Prémat, 1998). Habituação, sensitização e aprendizagem associativa podem todas ser demonstradas dentro do contexto de muitos comportamentos de *Drosophila*, incluindo a corte de machos (Hall,

1994). Os condicionamentos clássico (Quinn *et al.*, 1974; Quinn & Dudai, 1976) e operante (Xia *et al.*, 1997, 1998, 1999), assim como a facilitação, estão presentes nas capacidades cognitivas deste animal tão pequeno (Brembs & Heisenberg, 2000). Nos condicionamentos para odores, tanto o condicionamento apetitivo (Tempel *et al.*, 1983), que causa uma maior taxa de resposta pelo indivíduo, quanto o aversivo (Quinn *et al.*, 1974; Pr  at, 1998), que causa o cessar das respostas, foram demonstrados em *Drosophila*. Estes procedimentos experimentais se tornaram os mais utilizados para se entender aprendizagem e memória por possuirem naturezas robustas e facilidade de utiliza  o (Meller & Davis, 1996).

Embora o uso de mutantes de *Drosophila* em pesquisas de aprendizagem e memória seja válido, já se sabe que muitos apresentam anomalias em sua anatomia e morfologia (Tempel *et al.*, 1983; Jahn, 1997). Na maioria dos estudos não houve uma preocupa  o em se utilizar o tipo selvagem e, quando o fazem, grande parte dos estímulos apresentados não são condizentes ao que se encontra *in vivo* para tal gênero. Logo, muitas das conclusões acerca da memória em *Drosophila* podem não ser totalmente verdadeiras já que os sujeitos, os estímulos e o ambiente de experimenta  o são artificiais, fruto de manipula  o laboratorial (Hall, 1994).

Assim, por ser um excelente modelo teórico, *Drosophila*    amplamente utilizada em estudos genético-moleculares. Embora possua características cognitivas importantes, além da presença de várias formas de aprendizagem muito semelhantes com grupos carismáticos como mamíferos e aves (Tully *et al.*, 1996), a verifica  o de aprendizagem social nunca foi antes testada. Com o

objetivo de investigar a presença de aprendizagem social em *Drosophila* as seguintes hipóteses foram levantadas:

*** HIPÓTESE 1: Hipótese da Aprendizagem Social**

Machos virgens, ao observar a corte e a cópula de um macho conspecífico, aprenderiam a melhorar suas próprias performances de corte.

*** HIPÓTESE 2: Hipótese da Facilitação**

Machos aprenderiam a melhorar suas performances de corte através da sua própria experiência, ou seja, quanto maior o número de cópulas, mais adequado o seu comportamento.

No presente estudo, além de levantarmos informações relevantes acerca da biologia de *D. mercatorum*, tivemos o cuidado de montar um aparato experimental que pudesse refletir o ambiente onde machos e fêmeas, virgens e inseminadas, estivessem todos presentes. Ao contrário de pesquisas anteriores, optamos por estudar os comportamentos sexuais como estímulo porque são comportamentos comuns a todas as moscas deste gênero e de importância vital para o fluxo gênico, ou seja, estes comportamentos constituem um forte estímulo natural das espécies. Procuramos manter as variáveis ambientais o mais controladas possíveis e restringimos nossa pesquisa a procurar por evidências que suportem a validade da utilização de *Drosophila* em estudos cognitivos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Drosophila mercatorum (Paterson & Wheller, 1942) pertence ao subgrupo *mercatorum* do grupo *repleta*. Com base na morfologia dos cromossomos metafásicos e na distribuição geográfica, a espécie é dividida em duas subespécies: *D. m. mercatorum*, que ocorre no Peru, Colômbia, América Central e do Norte, Haváí, Austrália, África, Europa e Ásia, geralmente estando associada ao homem, e *D. m. pararepleta*, que ocorre a leste dos Andes, em áreas de vegetação aberta, áreas secas e matas (Vilela *et al.*, 1983; Sene, 1983). Wasserman (1982) sugere que as subespécies de *D. mercatorum* se originaram nas planícies do Brasil-Bolívia e que *D. m. mercatorum* tenha se originado de populações marginais de *D. pararepleta*. Escolhemos usar *D. m. pararepleta* por ser uma espécie neotropical representativa do gênero, com ampla distribuição no Brasil Central (Val *et al.*, 1981). Neste trabalho utilizamos a linhagem D33F43 proveniente de Cristalina, GO, cujas medições de frequência sonora já são conhecidas (Manfrin *et al.*, 1997).

A manipulação seguiu os padrões adotados por drosofilistas (Roberts & Standen, 1998), e de acordo com o Guia Para o Uso de Animais em Pesquisa (Martin & Bateson, 1998). Para a realização dos experimentos os sujeitos eram anestesiados e coletados ao acaso logo após sua emergência da pupa, e deixados para amadurecer sexualmente por sete dias. Para minimizar os efeitos da manipulação utilizamos anestesia à base de CO₂ com recuperação completa dos indivíduos em trinta segundos. Os indivíduos foram mantidos no laboratório em frascos de vidro de 110 ml preenchidos em parte com meio de cultura à base de banana, dentro de uma estufa a 25 ± 1°C com 12/12 horas de

ciclo de claro/escuro (Jacobs, 1960; Hirsch *et al.*, 1995; Helfrich-Förster, 1996). Os machos foram mantidos isolados enquanto fêmeas foram mantidas em um mesmo frasco.

2.2. LOGÍSTICA

Os comportamentos dos sujeitos foram observados sob esteromicroscópio Zeiss SV 6, mediante o uso de dois tipos de câmaras de acrílico manufaturadas especialmente para o presente estudo (Figura 2). O primeiro tipo (A), denominado "Câmara de Observação", possui um anteparo descontínuo que permite a livre passagem de estímulos visuais, olfativos e sonoros entre o sujeito experimental e o casal sendo observado. Ela foi utilizada na primeira etapa experimental, onde o macho experimental observava a corte e cópula de um casal da mesma espécie sem que pudesse interferir nos processos do mesmo. O segundo tipo (B), denominado "Câmara Nupcial", não possui anteparo e foi destinado às etapas dois e três do experimento, onde um casal pôde exercer seus comportamentos de corte e cópula livremente. Ambas câmaras possuem o mesmo diâmetro e altura, especificados de acordo com a capacidade de percepção olfativa destas moscas (Cobb & Ferveur, 1996, Jahn, 1997), com o intuito de prender a atenção do Macho Experimental. O desenho das câmaras foi modificado de Manfrin *et al.* (*op.cit.*) e aos indivíduos era permitido um tempo de habituação nas câmaras para a minimização das perturbações sofridas na manipulação. Após o experimento, as câmaras foram cuidadosamente lavadas com álcool 70% para eliminarmos os efeitos dos ferormônios deixados pelos indivíduos durante a corte e cópula e reservadas até o completo secamento. A coleta de

dados foi feita com o auxílio de um software de análises etológicas (Etholog versão 2.2.5; Ottoni, 1999).



Figura 2: Câmaras de acrílico modificadas de Manfrin *et al.* (1997) para a realização dos experimentos. (A) Câmara de Observação utilizada na primeira etapa experimental (treino), onde o macho virgem, separado pelo anteparo, pode observar sem interferir na corte ou na cópula do casal presente no compartimento adjacente. (B) Câmara Nupcial utilizada nas etapas dois e três (testes) do experimento onde os machos podem cortejar e copular livremente com a única fêmea presente.

2.3. DESENHO EXPERIMENTAL:

Os experimentos foram realizados no período de maior atividade das moscas, pela manhã e ao final da tarde, com os sujeitos sendo treinados e testados sempre no mesmo horário do dia (Hardeland, 1972; Cole, 1995). A sessão, que era iniciada com a introdução da fêmea, foi classificada em quatro partes, de acordo com os comportamentos exibidos: a latência da corte (tempo entre a introdução da fêmea e o início de postura de corte pelo macho), a corte em si, o tempo de cópula e outros comportamentos (Figura 3). A sessão era terminada assim que a fêmea repelisse o macho montante, ou, no caso de não haver cópula, perdurava por no máximo quinze minutos.

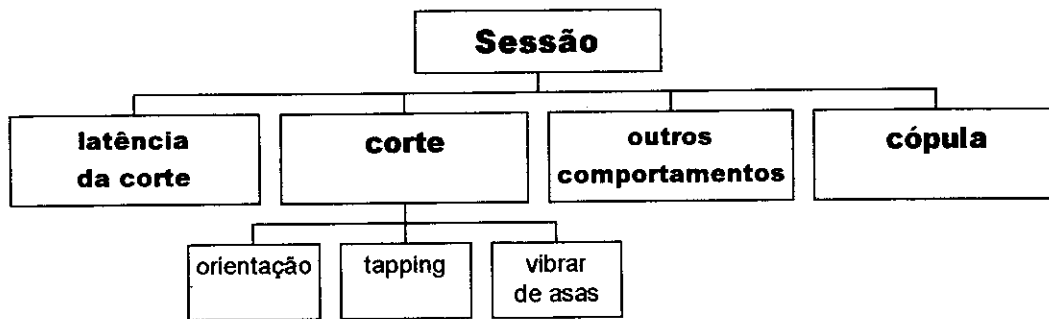


Figura 3: Dados coletados no presente estudo. A sessão se inicia com a introdução da fêmea virgem e perdura até que haja a finalização da cópula, ou por até quinze minutos caso não copulem. A latência da corte indica o tempo (segundos) que o macho leva entre a introdução da fêmea e o início dos comportamentos de corte. Os componentes da corte medidos nesta pesquisa foram a orientação, o "tapping" e o vibrar de asas. A ordem representada acima não é real, os comportamentos da corte ocorrem em ordem e tempo variáveis e intercalados com outros comportamentos, como a limpeza, o descanso e a marcha espontânea.

Os elementos comportamentais foram analisados de acordo com sua duração em segundos. Os comportamentos de corte analisados foram a orientação e perseguição à fêmea, o "tapping" e o vibrar de asas. Os comportamentos de "licking" (o macho leva a probólide ao ovipositor), o "clipping" das asas de machos (abrir e fechar as duas asas em um ângulo de 90°, sem vibração e produção de som) e o comportamento de rodear a fêmea foram bem menos freqüentes e por isso não foram selecionados para serem medidos. Outros comportamentos medidos, mas não relacionados com a corte, como o descanso, a limpeza (grooming), a extensão da probólide e as atividades de marcha espontânea, foram todos incluídos em uma só categoria: outros comportamentos.

Os machos virgens, quando maduros sexualmente, passavam por três etapas experimentais a saber (esquematisadas na Figura 4):

2.3.1. 1ª ETAPA EXPERIMENTAL (TREINO):

O Macho Experimental era depositado no compartimento de menor área da Câmara de Observação, onde se habituava por um período de 10 minutos (nº 1, Figura 4, Gisquet-Verrier *et al.*, 1989). Introduzia-se então o macho experiente (por haver realizado pelo menos uma cópula com sucesso) no compartimento restante da câmara (nº 2, Figura 4). Uma fêmea virgem escolhida ao acaso era então introduzida junto ao macho experiente, iniciando a sessão (nº 3, Figura 4). Logo, o Macho Experimental observava o macho experiente cortejar e copular (quando aceito) sem poder exercer qualquer tipo de intromissão. Assim que a cópula era terminada pela fêmea, esta era aspirada e depositada em um frasco contendo meio de cultura onde era-lhe permitido ovipositar em um prazo de três dias, sendo depois descartada. O macho experiente era também aspirado e retornava ao seu frasco original. O Macho Experimental, que presenciava e observava a corte e a cópula do casal, passava à segunda etapa do experimento.

2.3.2. 2ª ETAPA EXPERIMENTAL (TESTE 1: imediatamente após a observação):

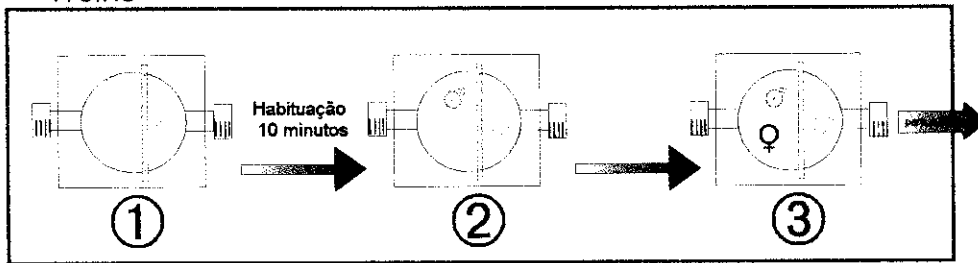
Imediatamente após o término da primeira etapa, o Macho Experimental era aspirado da Câmara de Observação e era introduzido na Câmara Nupcial, descansando por dez minutos para uma diminuição dos efeitos da manipulação (nº 4, Figura 4). Após este tempo, uma segunda fêmea virgem, também escolhida ao acaso, era introduzida na mesma câmara para que o macho virgem pudesse cortejá-la e eventualmente copular (nº 5, Figura 4). O objetivo desta etapa era o de medir quanto tempo este macho levava para exercer os

mesmos comportamentos do macho experiente ao qual ele havia observado minutos antes. Assim que a sessão estava terminada, esta segunda fêmea era também coletada e depositada em um frasco novo onde poderia ovipositar em um prazo de três dias. O Macho Experimental era então aspirado e retornava ao seu frasco original, descansando para a terceira e última etapa experimental.

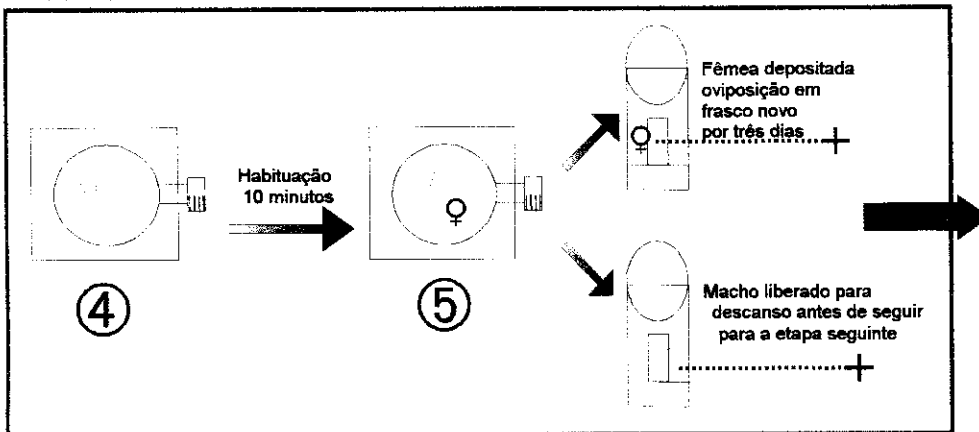
2.3.3. 3ª ETAPA EXPERIMENTAL (TESTE 2 - vinte e quatro horas após a observação)

Esta etapa era realizada 24 horas após a segunda etapa e correspondia exatamente aos mesmos procedimentos descritos na etapa anterior: ao Macho Experimental utilizado nas duas etapas anteriores era permitido cortejar e copular livremente com uma fêmea virgem escolhida ao acaso e de mesma idade da fêmea utilizada no dia anterior (nº 6, Figura 4). O objetivo aqui foi o de se testar a retenção das informações adquiridas na segunda etapa, seja por observação (aprendizagem social), seja pela própria experiência (facilitação). Aqui a fêmea também era retirada assim que se findava a sessão e depositada em um frasco novo onde poderia ovipositar por três dias. É importante ressaltar que neste momento este mesmo Macho Experimental poderia ser designado "macho experiente" ((*), Figura 4) podendo, assim, também ser observado por um novo macho virgem, fechando o ciclo dos sujeitos experimentais.

1ª Etapa:
Treino



2ª Etapa:
Teste



3ª Etapa:
Teste 24 horas depois

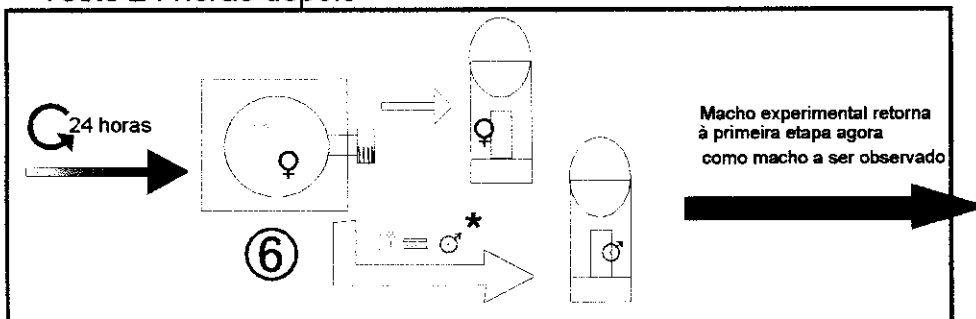


Figura 4: Diagrama das três etapas pelas quais passa o sujeito experimental. Na primeira (Treino, em azul), o Macho Experimental (em laranja) é posto na parte de menor área da Câmara de Observação por dez minutos (1). O macho experiente que será observado (em azul) é então introduzido na outra parte da câmara (2) seguido de uma fêmea virgem (em verde), dando início à sessão (3). O Macho Experimental observa o ritual de corte e a cópula do casal. Na segunda etapa (Teste, em vermelho), que ocorre imediatamente após a primeira, o Macho Experimental é depositado na Câmara Nupcial por dez minutos (4). Uma fêmea virgem é então introduzida dando início à sessão (5) e o macho pode cortejá-la e montá-la livremente. São medidos a latência e os componentes da corte, outros comportamentos e a cópula. Após o término da cópula, a fêmea é aspirada e colocada em um novo frasco onde pode ovipositar por 3 dias. O macho retorna ao seu frasco original e é deixado para descansar por 24 horas, passando à etapa seguinte. A terceira etapa (Treino 24 horas, em verde) ocorre 24 horas após a precedente e o macho pode cortejar e copular livremente com a fêmea virgem (6). Esta fêmea também será mantida em um frasco novo para que oviposite por três dias e o Macho Experimental pode agora ser designado "macho experiente" (*) e retornar à primeira etapa com a participação de um novo macho virgem observador. Para termos de comparação, um grupo controle é sujeito às mesmas etapas diferindo apenas na primeira (treino) onde o indivíduo não assiste a um casal copular, mas apenas uma fêmea virgem.

2.4. GRUPO CONTROLE

Um grupo controle também passava pelas três etapas acima descritas, porém não assistia a uma cópula na primeira etapa mas sim apenas a uma fêmea virgem. Estes sujeitos virgens eram escolhidos ao acaso e provinham da mesma população dos machos experimentais. As sessões foram realizadas nos mesmos horários e da mesma forma em ambos os casos.

2.5. A EVENTUAL TERCEIRA CÓPULA

Os machos experimentais, após terem passado pelas três etapas do experimento, passaram a ser designados como experientes (ver nº 6 (*), Figura 4) e puderam ser observados por novos machos virgens, fechando o ciclo dos sujeitos. Com isso, obtivemos amostras de uma terceira cópula, cujos parâmetros puderam ser comparados com os testes 1 e 2. Se as diferenças encontradas entre as duas cópulas subsequentes fossem resultado da experiência do macho, logo uma terceira poderia nos dar indícios de que existisse um padrão nas variáveis medidas.

2.6. NÚMERO DE DESCENDENTES

Com o objetivo de verificar se alguma das variáveis medidas tem influência sobre a quantidade de descendentes que um macho pode produzir por cópula, as fêmeas que participaram dos experimentos foram mantidas em frascos contendo meio de cultura onde poderiam ovipositar por três dias. Destes ovos eclodiam as larvas e, destas, após emergência da pupa, vieram os adultos que foram então contados. Assim, censos diários dos adultos foram realizados para cada fêmea a partir da primeira emergência da pupa, e perduraram até que se completassem quinze dias após a emergência do último adulto, quando então o

vidro era descartado. Estes censos foram realizados sempre no mesmo horário do dia e os sujeitos eram transferidos a um frasco de vidro vazio para serem então anestesiados e separados por sexo. Dentre estes sujeitos eram escolhidos ao acaso os que iriam participar do experimento. Novamente, os machos foram isolados e as fêmeas depositadas em conjunto, ambos em frascos contendo meio de cultura à base de banana.

3. RESULTADOS

3.1. RESULTADOS GERAIS

Foram analisados 40 machos experimentais e 37 machos controle, totalizando mais de 200 cópulas assistidas em mais de 3000 minutos de observação. Os machos que não copularam durante as observações foram excluídos das análises: 20% de machos experimentais (8 indivíduos) e 27% de machos controle (10 indivíduos). A Tabela 1 mostra os resultados gerais obtidos no presente estudo.

A duração das seguintes variáveis foi medida: sessão, latência da corte, comportamentos de corte, tempo de cópula e outros comportamentos não relacionados com o "display" sexual. Como nenhuma destas variáveis apresentou distribuição normal (Teste de normalidade D'Agostino-Pearson, Biostat 2.0 (Ayres *et al.*, 2000)), usamos o teste U de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$, 1 df.; SYSTAT 7.0), que apresenta 95% do poder estatístico do teste t de Student (Zar, 1999), para efetuarmos as eventuais comparações.

Os machos passaram a maior parte da sessão copulando (em média 52% do tempo de sessão). Outros comportamentos, não relacionados com a corte, como o descanso, a marcha espontânea, a limpeza e a extensão da probólide representaram cerca de 19% do tempo de sessão. Os comportamentos de corte, que incluem o tempo em que o macho levava se orientando e seguindo a fêmea, testando-a através do "tapping" e vibrando as suas asas, somaram em média 17% do tempo de sessão, dos quais 78% correspondiam à orientação, o componente comportamental que mais contribuiu para esta duração.

Tabela 1: Duração dos comportamentos observados (Média \pm SD [Mediana], em segundos) para os sujeitos controle (C) e experimentais (E) nas duas etapas de teste: o teste imediato à observação da corte (1) e o teste 24 horas após a observação (2).

Teste	Controle (C)		Experimental (E)	
	1	2	1	2
	N	N	N	N
Duração da Sessão	314,37 \pm 114,43 [308,60]	323,83 \pm 126,72 [291,02]	312,29 \pm 186,91 [224,24]	350,85 \pm 192,50 [298,93]
Latência da Corte	44,82 \pm 42,73 [33,52]	45,23 \pm 71,07 [13,76]	35,55 \pm 50,98 [22,00]	20,50 \pm 24,86 [13,03]
Corte	46,44 \pm 55,40 [36,33]	66,94 \pm 77,94 [39,71]	38,37 \pm 47,11 [24,17]	73,50 \pm 67,86 [45,70]
Elementos da Corte	37,32 \pm 49,85 [24,86]	56,85 \pm 71,75 [27,15]	26,42 \pm 38,25 [12,15]	54,29 \pm 50,36 [35,19]
Tapping	2,97 \pm 3,28 [2,17]	3,89 \pm 3,26 [2,84]	2,50 \pm 2,95 [1,78]	5,60 \pm 7,00 [2,60]
Vibrar de Asas	6,14 \pm 5,08 [5,39]	6,19 \pm 5,84 [3,09]	9,44 \pm 12,57 [3,97]	13,60 \pm 21,17 [6,33]
Duração da Cópula	166,94 \pm 53,17 [164,89]	164,84 \pm 40,99 [166,52]	180,07 \pm 80,79 [169,31]	169,37 \pm 41,98 [168,32]
Outros Comportamentos	56,18 \pm 70,33 [34,25]	46,83 \pm 58,20 [27,23]	58,31 \pm 85,40 [19,33]	87,50 \pm 131,66 [52,79]

3.2. TESTANDO A HIPÓTESE DA APRENDIZAGEM SOCIAL (Sujeitos C vs E)

Os grupos de sujeitos controle e experimentais não diferiram significativamente nos tempos de sessão ($U=1849$, $p=0.51$), latência da corte ($U=2043.5$, $p=0.09$), nos comportamentos de corte ($U=1821.5$, $p=0.61$), em outros comportamentos ($U=1591$, $p=0.46$) e nem no tempo de cópula ($U=1625$, $p=0.58$; Figura 5). Não houve diferença significativa também na duração dos componentes comportamentais da corte que foram analisados: a orientação ($U=1899.5$, $p=0.35$), o "tapping" ($U=1808.5$, $p=0.66$) e o vibrar de asas ($U=1580$, $p=0.42$; Figura 6).

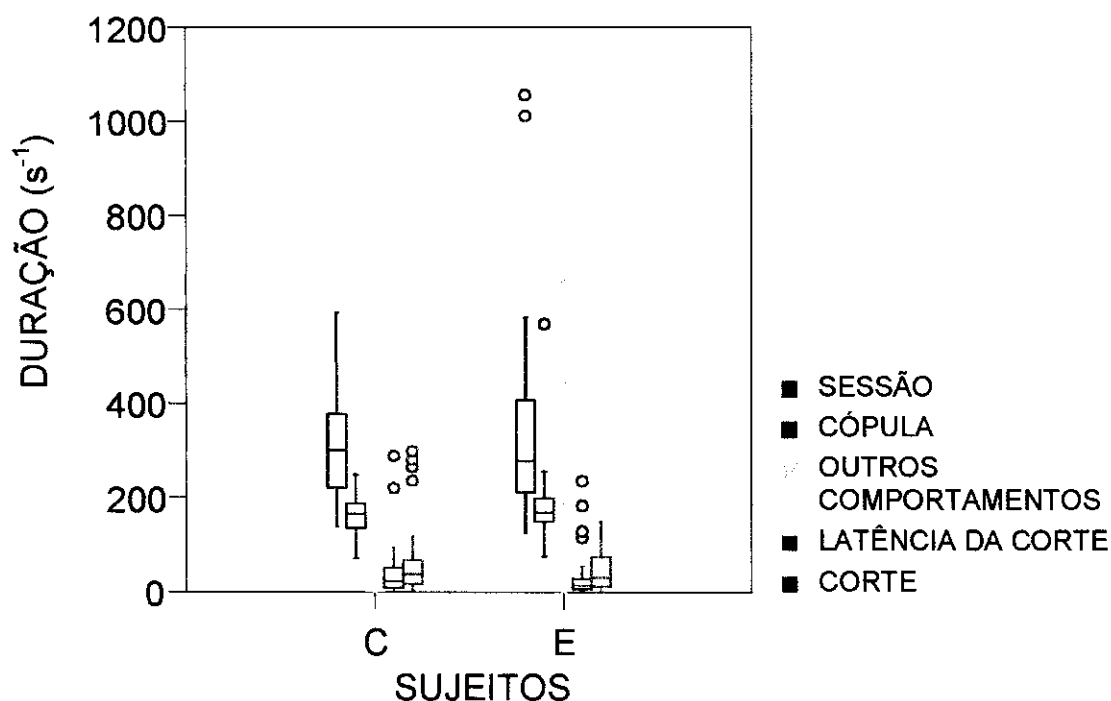


Figura 5: As durações das sessões, do tempo de cópula, de outros comportamentos, da latência da corte e da corte em si não foram estatisticamente diferentes ($p>0.05$) entre os sujeitos controle (C) e experimentais (E). Os blocos representam a amplitude de 50% dos valores e a linha horizontal a mediana (μ , em segundos). As linhas verticais representam a amplitude dos dados do primeiro ao terceiro quartil e os círculos os casos de valores extremos ("outliers").

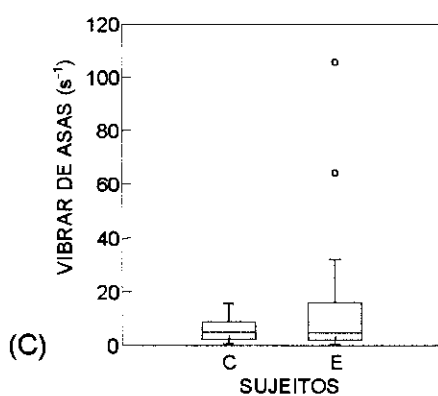
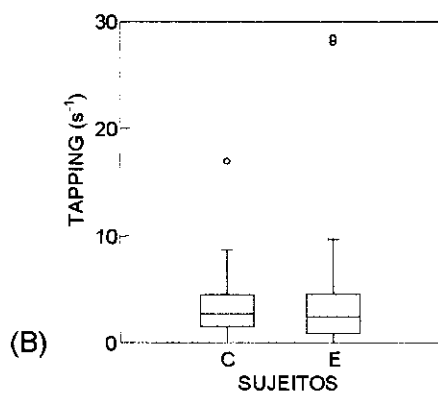
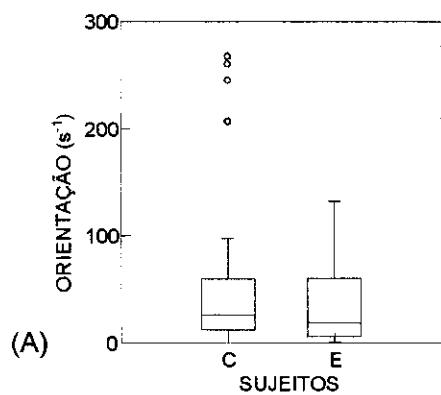


Figura 6: A duração dos elementos que compõe a corte analisados neste experimento não foram estatisticamente diferentes ($p > 0.05$) entre os sujeitos controle (C) e experimentais (E). **(A)** orientação, **(B)** "tapping" e **(C)** vibrar de asas. Os blocos representam a amplitude de 50% dos valores e a linha horizontal a mediana (μ , em segundos). As linhas verticais representam a amplitude dos dados do primeiro ao terceiro quartil e os círculos os casos de valores extremos ("outliers").

3.3. TESTANDO A HIPÓTESE DA FACILITAÇÃO (TESTE 1 vs 2)

Não havendo distinções entre os tratamentos dados aos machos (controle e experimentais), pudemos agrupá-los em uma só população e comparar suas performances entre o teste imediato à observação da corte (teste 1, etapa 2) e o teste 24 horas depois (teste 2, etapa 3) de forma a termos acesso às mudanças em seus comportamentos provindos da sua própria experiência de cópula através da facilitação. Com relação ao desempenho dos machos nesses testes, não foram encontradas diferenças significativas na duração da sessão ($U=1533$, $p= 0.26$) e nem no tempo gasto em outros comportamentos ($U=1543$, $p=0.29$, Figura 7). A similaridade encontrada entre a duração das cópulas nos testes 1 e 2 foi muito alta ($U=1720$, $p=0.91$, Figura 7).

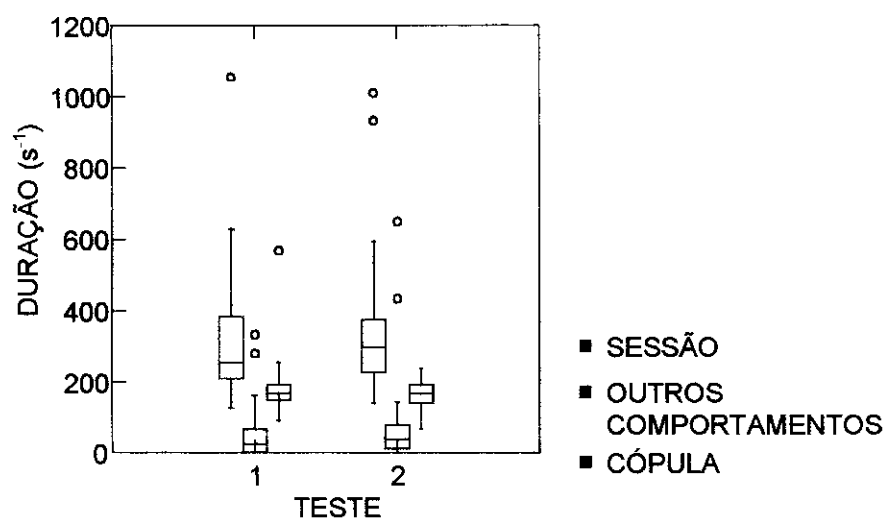


Figura 7: Comparação do teste imediato à observação da corte (teste1, etapa 2) e o teste realizado 24 horas depois (teste2, etapa 3). Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0.05$) na duração das sessões; em outros comportamentos não relacionados com a corte (limpeza, descanso, extensão da probólide e marcha espontânea; e nem duração da cópula. Os blocos representam a amplitude de 50% dos valores e a linha horizontal a mediana (μ , em segundos). As linhas verticais representam a amplitude dos dados do primeiro ao terceiro quartil e os círculos os casos de valores extremos ("outliers").

A latência da corte diferiu entre os testes ($U= 2118.5$, $p=0.04$, Figura 8-A), sendo menor no segundo teste. A duração total da corte (orientação, "tapping" e vibrar de asas, em conjunto) foi significativamente mais longa no segundo teste ($U=1334$, $p=0.03$, Figura 8-B).

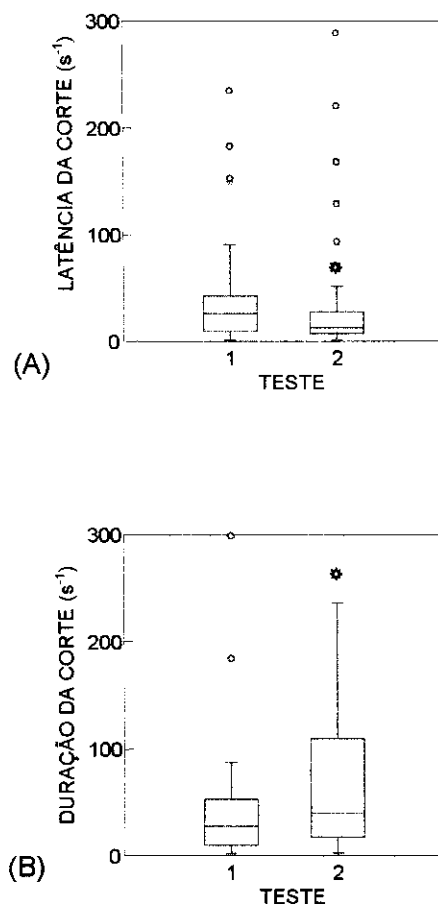


Figura 8: Comparação do teste imediato à observação da corte (teste1, etapa 2) e o teste realizado 24 horas depois (teste2, etapa 3). **(A)** Latência da Corte (tempo entre a introdução da fêmea e o início de postura de corte pelo macho); **(B)** duração total da Corte. (*)= $p<0.05$. Os blocos representam a amplitude de 50% dos valores e a linha horizontal a mediana (μ , em segundos). As linhas verticais representam a amplitude dos dados do primeiro ao terceiro quartil e os círculos os casos de valores extremos ("outliers").

Os componentes comportamentais da corte que foram responsáveis pela diferença constatada foram a orientação (U= 1279, $p=0.01$, Figura 9-A) e o tapping (U=1277, $p=0.01$, Figura 9-B). O vibrar de asas não diferiu entre os testes (U=1619, $p=0.51$, Figura 9-C).

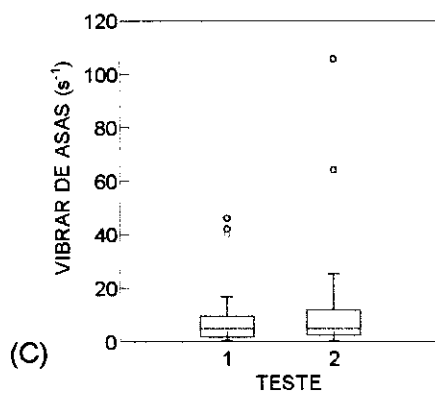
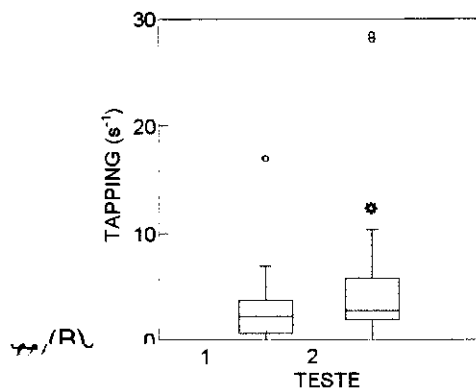
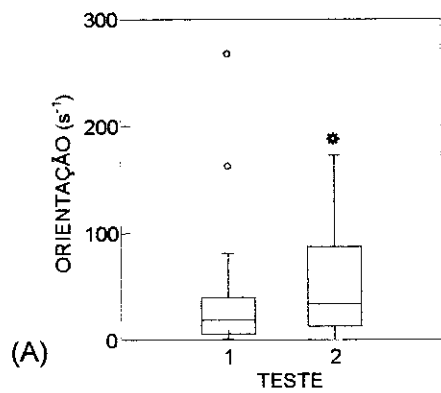


Figura 9: Dentre os componentes da corte, apenas a orientação (A) e o tapping (B) foram significativamente diferentes entre o teste 1 e o teste 2, (*)= $p < 0.05$. (C) duração do vibrar de asas. Os blocos representam a amplitude de 50% dos valores e a linha horizontal a mediana (μ , em segundos). As linhas verticais representam a amplitude dos dados do primeiro ao terceiro quartil e os círculos os casos de valores extremos ("outliers").

3.3.1. EXISTE UM PADRÃO? Analisando uma terceira cópula

A duração dos comportamentos de uma terceira cópula foi medida (cópula 3, n=21) utilizando os sujeitos que haviam participado do projeto e puderam ser observados por novos machos virgens. Assim como nas comparações anteriores, não diferiram entre as três cópulas (teste U de Mann-Whitney, $\alpha=5\%$, 1 df.; SYSTAT 7.0): o tempo de sessão (entre as cópulas 2 e 3: U=750, p=0.15; entre 1 e 3: U=662, p=0.64), os outros comportamentos (entre 2 e 3: U=695, p=0.41; entre 1 e 3: U=602.5, p=0.85) e a duração da cópula (entre 2 e 3: U=723, p=0.26; entre 1 e 3: U=698, p=0.39).

Como nos resultados anteriores (ver Figura 8-A), a latência da corte foi significativamente diferente entre as cópulas 2 e 3 (U=798.5, p=0.05, Figura 10-A) e entre as cópulas 1 e 3 (U=884, p=0.004, Figura 10-A). Contudo, contrário ao observado entre os testes 1 e 2 (ver Figura 8-B), a duração total da corte não diferiu entre as cópulas 2 e 3 (U=666, p=0.61, Figura 10-B) e nem entre 1 e 3 (U=481, p=0.13, Figura 10-B). O mesmo foi verificado quando analisamos isoladamente os elementos desta corte. A duração da orientação foi significativamente semelhante tanto entre as cópulas 2 e 3 (U=644, p=0.79, Figura 11-A) quanto entre as cópulas 1 e 3 (U=456, p=0.07, Figura 11-A), apesar de ter diferido entre os testes 1 e 2 (ver Figura 9). O mesmo se repete para o "tapping" (entre 2 e 3: U=720, p=0.27; entre 1 e 3: U=569, p=0.58, Figura 11-B) e para o vibrar de asas (entre 2 e 3: U=768, p=0.10; entre 1 e 3: U=716.5, p=0.29, Figura 11-C).

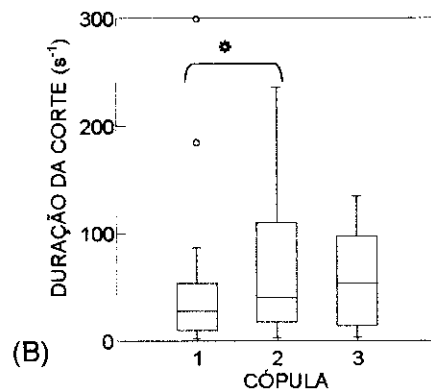
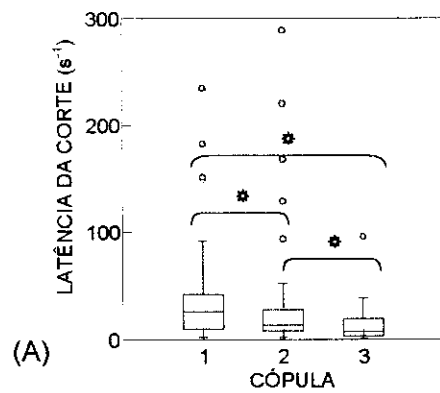


Figura 10: Comparação do teste imediato à observação da corte (teste1, etapa 2) do teste realizado 24 horas depois (teste2, etapa 3) e uma terceira cópula. **(A)** Latência da Corte (tempo entre a introdução da fêmea e o início de postura de corte pelo macho); **(B)** duração total da Corte. (*)= $p < 0.05$. Os blocos representam a amplitude de 50% dos valores e a linha horizontal a mediana (μ , em segundos). As linhas verticais representam a amplitude dos dados do primeiro ao terceiro quartil e os círculos os casos de valores extremos ("outliers").

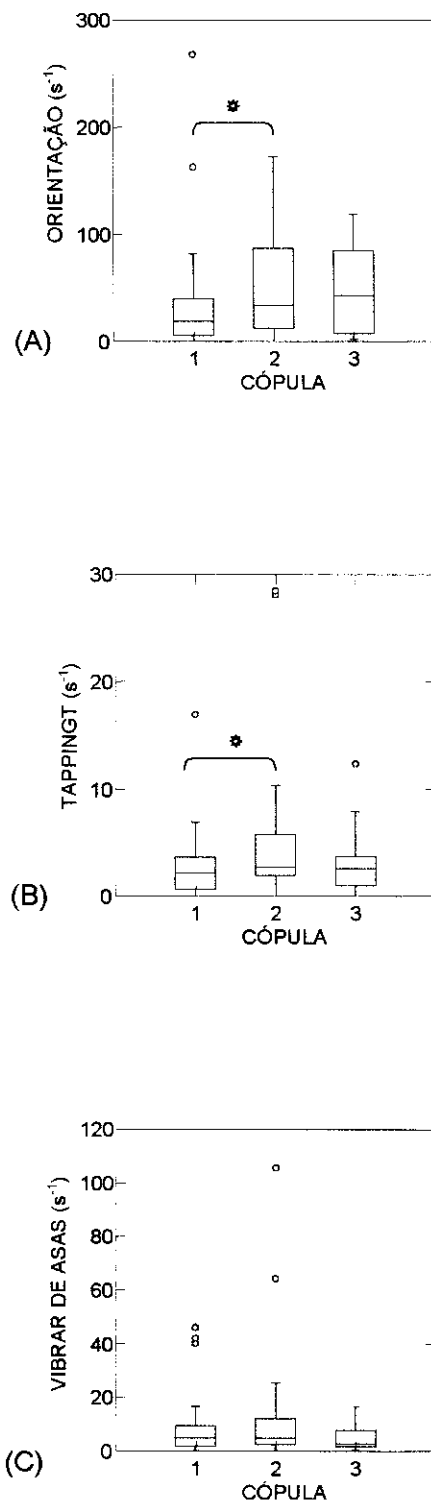


Figura 11: Comparação dos elementos da corte no teste imediato à observação da corte (teste1, etapa 2) do teste realizado 24 horas depois (teste2, etapa 3) e uma terceira cópula. **(A)** Orientação; **(B)** "Tapping"; **(C)** Vibrar de asas. (*)= $p < 0.05$. Os blocos representam a amplitude de 50% dos valores e a linha horizontal a mediana (μ , em segundos). As linhas verticais representam a amplitude dos dados do primeiro ao terceiro quartil e os círculos os casos de valores extremos ("outliers").

3.4. NÚMERO DE DESCENDENTES

Foram analisadas as proles de 131 fêmeas que produziram em média 87 ± 36 descendentes em um período médio de 22 dias. A razão sexual foi de 1:1 entre fêmeas e machos que emergiram das pupas (em média 41 ± 18 fêmeas e 45 ± 19 machos). Não foram encontradas diferenças significativas entre o número de descendentes adultos produzidos pelos machos controle e experimentais (teste U de Mann-Whitney; $n=118$, 1 df., $p>0.05$; SYSTAT 7.0) e a prole produzida nas diferentes cópulas também não foi diferente (teste Kruskal-Wallis; $n=139$, 2 df., $p>0.05$; SYSTAT 7.0; Figura 12).

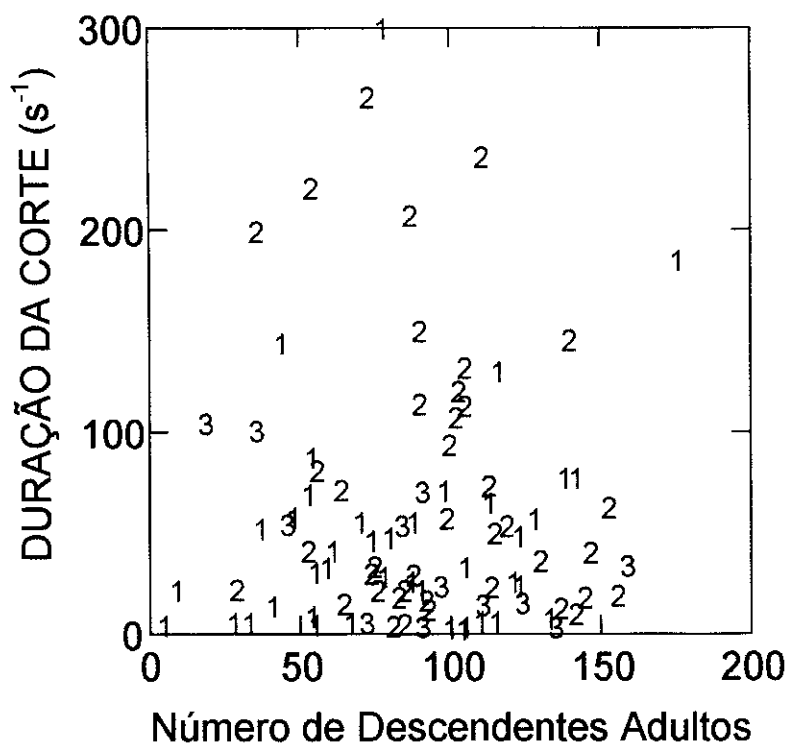


Figura 12: Número de descendentes adultos provindos dos diferentes tempos de corte apresentados nas três cópulas. 1=primeiro teste (em azul), imediato à observação da corte; 2= segundo teste (em vermelho) realizado 24 horas após a observação; 3=terceira cópula (em verde), quando os machos eram então observados.

4. DISCUSSÃO

4.1. RESULTADOS GERAIS

Dentre os 77 sujeitos, 18 não foram capazes de atingir a cópula no tempo previsto de sessão por terem sido claramente rejeitados pelas fêmeas que os repeliam com chutes e outros comportamentos aversivos. Embora muitos pesquisadores tenham investigado os critérios que regem a escolha do parceiro pelas fêmeas, esses ainda não são totalmente conhecidos (Sturtevant, 1921; Manning, 1967; Cook & Cook, 1975; Spiess, 1982; Cobb & Ferveur, 1996; Wiley & Poston, 1996, Yamamoto *et al.*, 1998). Contudo, enumeramos alguns destes critérios que poderiam estar agindo de forma unitária ou em conjunto. Primeiro, a fêmea sinaliza sua condição fisiológica através da presença de duas classes de ferormônios: afrodisíacos, como o 7,11 heptacosadieno (7,11 HD), que indica sua disponibilidade para acasalar e estimula o vibrar de asas no macho, e antiafrodisíacos, como o 7-tricoseno (7-T), que reduz a taxa de corte pelo macho (Cobb & Ferveur, 1996). A percepção e discernimento destes ferormônios por parte do macho são importantes nos processos de rejeição e aceitação pela fêmea (Hall, 1994), mas são muito difíceis de serem controlados experimentalmente. Segundo, o vibrar de asas tem papel importante na sinalização da condição do macho (Hoikkala *et al.*, 1998) e seriam necessários esforços para se medir as frequências sonoras dos indivíduos rejeitados, o que não foi o propósito deste projeto. Finalmente, os sinais morfométricos seriam outra possibilidade, porém não foram encontradas correlações significativas entre tamanho do corpo, assimetria flutuante em traços bilaterais e o sucesso reprodutivo em várias espécies de drosofilídeos

(Krebs & Markow, 1989; Whittier & Kaneshiro, 1995; Markow *et al.*, 1996; Boake *et al.*, 1997; Boake & Konigsberg, 1998; Promislow *et al.*, 1998). Não podemos, assim, afirmar certamente quais os elementos que promoveram esta rejeição.

4.2. TESTANDO A HIPÓTESE DA APRENDIZAGEM SOCIAL (C vs E)

O tratamento dado aos machos parece não ter causado nenhum efeito nas variáveis medidas neste experimento, uma vez que machos controle e experimentais não diferiram na duração de nenhum dos comportamentos medidos.

Teoricamente, essa semelhança observada entre os dois grupos de machos poderia ser um artefato causado pelo efeito da manipulação ou do aparato. Acreditamos não ser este o caso por três razões. Primeiro, os machos, quando introduzidos nas câmaras, foram devidamente manipulados com um nível mínimo de estresse e o tempo de habituação proposto foi o suficiente para que o macho se engajasse em comportamentos de descanso e limpeza após exploração da câmara. Segundo, foi demonstrado que a anestesia, mesmo aplicada com 20 horas de antecedência, tem um efeito limitante em estudos comportamentais com *Drosophila* (Barron, 2000). Contudo, os indivíduos utilizados neste experimento foram anestesiados apenas na coleta pós emergência da pupa, ou seja, sete dias antes dos testes, e se espera que este tempo tenha sido suficiente para o completo desaparecimento dos efeitos do anestésico. Finalmente, os machos virgens, quando colocados em separado na câmara, pareciam ter sua atenção concentrada na corte do macho demonstrador pois se mostravam agitados e se orientavam e tentavam seguir o casal mesmo com o aparato o impedindo. Assim, não acreditando serem estes

resultados um puro efeito da logística, sugerimos que não há aprendizagem social em *Drosophila mercatorum* para os comportamentos de corte.

Drosophila possui uma peculiaridade interessante. Alguns animais, como mamíferos e aves, podem aprender diferentes significações para o mesmo estímulo quando este é apresentado em contextos diferentes. O animal pode, então, considerá-los entidades sensoriais separadas que podem ser associadas de diferentes formas. Para tal, conta com diferentes substratos neurais responsáveis pelo processo de formas de aprendizagem distintas. Contudo, *Drosophila* utiliza um sistema diferente: os sinais contextuais e os estímulos condicionados são filtrados pela mesma estrutura cerebral, os corpos cogumelosos (Armstrong *et al.*, 1998; Heisenberg, 1998; Wolf *et al.*, 1998). Logo, *Drosophila* não deve possuir a flexibilidade necessária para estabelecer conexões diferentes, condicionais, entre estímulos condicionados e o contexto (Menzel & Glurfa, 1999; Liu *et al.*, 1999), ou seja, um macho que observa outro cortejar pode não associar aquele comportamento ao seu próprio, considerando-os entidades distintas e não associativas. Experimentos de condicionamento aversivo de odores realizados com *D. melanogaster* mostraram que o comportamento de um indivíduo não é influenciado pelo comportamento de outros membros do mesmo grupo em um contexto alimentar (Tully *et al.*, 1994; DeZazzo & Tully, 1995), mostrando semelhança com nossos resultados no contexto reprodutivo.

Segundo Futuyama (1998), se os genótipos diferem no grau em que cada comportamento pode ser modificado por experiência, então a extensão em que cada comportamento é inato ou aprendido pode evoluir por seleção natural. A quantidade de modificação por aprendizagem freqüentemente parece ser

adaptativa, de acordo com a ecologia e o modo de vida da espécie. Se a espécie é selecionada a aprender apenas aquelas tarefas vantajosas a ela, então a habilidade de aprender será altamente dependente do contexto em que aquela espécie evoluiu.

Assim, passamos a analisar a ecologia de nossa espécie de estudo. Pertencente ao grupo *repleta*, no qual não se conhece especificidade com plantas hospedeiras, *Drosophila mercatorum* é uma espécie generalista e altamente competitiva por seus recursos, compostos por microorganismos que se desenvolvem em diferentes plantas, como Palmae, Bromeliaceae, Euphorbiaceae, Loganiaceae, Rubiaceae, Moraceae, Cactaceae e Leguminosae (Pereira *et al.*, 1983). Ser generalista significa também experimentar itens alimentares que possam ser impalatáveis ou até mesmo venenosos. Neste caso, as populações de *Drosophila* que investiram tempo e energia consumindo itens alimentares que fossem nocivos à sua sobrevivência provavelmente sofreram diminuição de seu valor adaptativo, ou até mesmo morte. Não seria adaptativo a uma mosca de ciclo de vida curto possuir tal flexibilidade. Assim, as populações devem ter sido moldadas a perceber e utilizar apenas uma parte dos microorganismos presentes em tecidos vegetais em decomposição pois os genótipos das populações que permitiam uma maior variedade de itens em sua dieta, incluindo os nocivos, devem ter sofrido queda em sua frequência, ou até mesmo extinção.

Quanto à socialidade, os indivíduos de *D. mercatorum* se agregam em grupos nos sítios de forrageio, onde têm a oportunidade de aprenderem uns com os outros. Entretanto, nestes locais coexistem várias espécies de drosofilídeos e em diferentes estágios de desenvolvimento e é comum vermos

vários machos cortejando fêmeas, inclusive de espécies diferentes da sua. Assim, não seria vantajoso aprender variações provindas de outras espécies pois estas mesmas poderiam diminuir a receptibilidade das fêmeas conspecíficas.

No geral, parte do que faz a aprendizagem social possível são as especializações de percepção, atenção ou motivação (Shettleworth, 1998). Sendo assim, precisamos analisar em maiores detalhes como e o quê um animal pode aprender do comportamento de outro. A ação do demonstrador, ou alguma parte dela, chama a atenção do observador para certos estímulos do meio. Quando o observador se depara com estes estímulos, pode então liberar o comportamento requerido. Sendo assim, não é o observador em si que desencadeia uma resposta e sim os estímulos presentes no ambiente no qual ele se encontrava quando da observação (Heyes *et al.*, 2000). Logo, a atenção do observador é chamada para os elementos do meio, no caso, para a fêmea e para o aparato experimental e não para os comportamentos do macho demonstrador. Com isso, quando colocado sozinho com uma fêmea virgem, o observador será estimulado a exercer comportamentos de corte e não sabemos se foi estimulado pela fêmea *per se*, pelos estímulos do meio apresentado anteriormente ou por características da fêmea que, naturalmente, estimulariam qualquer macho, como seu movimento ou seu ferormônio afrodisíaco.

Tomados em conjunto, estes resultados nos levam a crer que fenômenos de aprendizagem social não devem estar presentes em espécies, como *D. mercatorum*, que possuam ciclo de vida curto e sofreram pressões de seleção ao longo do tempo a moldar seu genótipo a ponto de maximizar a

percepção e captação de recursos. Com este tipo de restrição, os comportamentos devem ter se tornado rígidos, pouco variáveis, com um forte componente inato. Logo, no contexto ecológico de *Drosophila*, a aprendizagem social não representaria vantagem alguma pela presença de membros de diversas espécies nos sítios de agrupamentos e pela competição intensa, o que não lhes permitiria acesso às informações de conspecíficos. Possivelmente as melhores candidatas a aprendizagem social em invertebrados sejam aquelas espécies de ciclo de vida mais longo (mais de uma estação reprodutiva) e que possuam um sistema social sofisticado, como, por exemplo, abelhas (*Apis*).

4.3. TESTANDO A HIPÓTESE DA FACILITAÇÃO (TESTE 1 vs 2)

Uma vez descartada a ocorrência de aprendizagem social, comparamos as performances entre as cópulas subsequentes dos machos, procurando por diferenças que indicassem um aprendizado pela própria experiência, i. e., por facilitação. O tempo de sessão nos diferentes testes foi estatisticamente semelhante, o que nos sugere que as diferenças encontradas nos comportamentos que compõem esta sessão são verdadeiramente associadas às diferenças entre os testes devido ao ganho de experiência pelos machos.

Os comportamentos não relacionados com a corte, como limpeza ("grooming"), extensão da probóscide e atividade de marcha espontânea, não diferiram entre os testes. Os machos estiveram igualmente mais concentrados na corte e cópula e devotaram menos tempo aos outros comportamentos.

O tempo de cópula foi muito similar entre os testes sugerindo que há um tempo ideal para que o macho transfira seu esperma com a segurança de garantir seu sucesso reprodutivo. Este comportamento parece ter sido

rigidamente selecionado e provavelmente possui uma base genética pouco variável entre indivíduos (Carson, 1987).

Apenas dois dos componentes deste experimento foram significativamente diferentes: a latência da corte e a corte em si, mais precisamente a orientação e o "tapping".

A latência da corte é o tempo que os machos levam para iniciar a corte após a introdução da fêmea na câmara. Este tempo foi menor no segundo teste, realizado 24 horas após a observação da corte, sugerindo que os machos aprendem por facilitação a iniciar a corte o quanto antes, suportando nossa segunda hipótese. Este resultado é suportado quando observamos um declínio ainda maior da latência da corte em uma terceira cópula (ver fig. 10-A) indicando que quanto mais experiente o macho, mais rápido este irá iniciar a corte, se orientando e testando potenciais parceiras sexuais. Encontramos evidências em *Drosophila silvestris* onde machos experientes iniciam a corte em menor tempo em relação a machos virgens (Boake & Konigsberg, 1998) e os mutantes *cacophony* (*cac*) e *dissonance* (*diss*) exibem sucesso reprodutivo baixo pois demoram mais que o tipo selvagem para iniciar a corte (Yamamoto & Nakano, 1998).

Em geral, machos passam boa parte do tempo cortejando fêmeas enquanto estas estão forrageando. O custo deste comportamento é alto pois deixam de se alimentar e se expõem mais à predadores, tendo sido, portanto, selecionados a testar e descobrir parceiras em potencial da forma mais eficaz: testando-as e abandonando o quanto antes as tentativas frustradas, resultado da memória de encontros casuais no passado (Dukas, 1998). Suportando esta idéia, sabe-se que machos de *Drosophila* expostos sucessivas vezes a fêmeas

inférteis em laboratório diminuem sua taxa de resposta às mesmas. Nas fases iniciais da corte percebem o ferormônio antiafrodisiaco produzido por fêmeas inseminadas e aprendem a não mais cortejar quem quer que o porte. Acredita-se ser este um condicionamento de corte, que ocorre também quando os machos aprendem a não cortejar machos virgens possivelmente devido à presença do mesmo ferormônio (Siegel & Hall, 1979; Gailey *et al.*, 1985; Zawistowski, 1988; Joiner & Griffith, 1997, 1999; Kamyshev *et al.*, 1999; Neckameyer *et al.*, 2000).

Embora tenham iniciado a corte em menor tempo, os machos devotaram significativamente mais tempo à corte no segundo teste. Os elementos da corte que difeririam foram os do início deste ritual, a orientação e o "tapping", e não o vibrar de asas, que ocorre após o macho ter se aproximado e testado a fêmea. Se a facilitação é o refinamento da função, se espera que os machos demorem menos tempo cortejando para assim conseguirem copular, fruto da experiência prévia, como no caso da latência da corte. Em termos adaptativos, seria também esperado que machos gastassem a menor quantidade de energia possível para atingir o objetivo da corte, i. e., que sua corte fosse o mais eficiente e rápida possível para que ele pudesse transferir seu espermatozóide e assim tentar inseminar outras fêmeas. Contudo, a proporção de tempo gasto na corte é significativamente influenciada pelas fêmeas (Boake & Hoikkala, 1995; Boake *et al.*, 2000) que ativamente escolhem o macho com o qual irão copular.

Há uma redução na receptividade das fêmeas quando os machos portam um ferormônio feminino resultado do contato com fêmeas em cópulas anteriores, indicativo de que sua quantidade de esperma seria inferior a de um

macho virgem (Scott *et al.*, 1988). Assim, é possível que a corte tenha aumentado no segundo teste devido à diminuição da receptividade pelas fêmeas que perceberam os ferormônios da cópula do primeiro teste. Este dado se apoia no fato de que apenas os comportamentos do início da corte, aqueles relativos à aproximação e o teste da fêmea, diferiram entre os testes. Os machos foram obrigados a gastar mais energia perseguindo e tateando a fêmea que possivelmente os aceitou, como resultado de um experimento com apenas um macho ("no-choice experiment" - experimento sem escolha). Os machos tendem a aumentar sua corte quando rejeitados continuamente por fêmeas, contudo, este aumento não lhes confere vantagem alguma (Spiess, 1982). Assim, quando analisamos uma terceira cópula, percebemos que a corte foi muito semelhante com o segundo teste (ver fig 10-B), indicando que a receptividade das fêmeas continuou a mesma, ou seja, os machos foram obrigados a persegui-las pelo mesmo tempo após o seu "debut" sexual.

Em *Drosophila melanogaster*, machos virgens cortejam por mais tempo e são preferidos por fêmeas virgens porque acredita-se que estas saibam reconhecer o macho com maior quantidade de esperma disponível e, além disso, machos que passam menos tempo cortejando tem seu sucesso reprodutivo reduzido (Markow *et al.*, 1978). Então a proporção de tempo devotado à corte deve evoluir por seleção sexual através das disputas dos machos por cortes mais rápidas e da escolha da fêmea por sinais custosos, honestos e longos (Thornhill & Gwynne, 1998; Promislow *et al.*, 1998).

Modelos de especiação e seleção sexual enfatizam a importância do número de machos amostrados por fêmeas (Boake *et al.*, 2000). Cópulas anteriores de uma fêmea com um macho de um certo tipo mudam sua atitude a

favor do macho amostrado, sendo esta preferência dependente da frequência deste tipo de macho na população. Geralmente fêmeas demonstram preferência pelo tipo raro, em menor frequência na população. A este efeito damos o nome de "vantagem do macho raro" (Knoppien, 1985). Ao que parece a fêmea tende a rejeitar o primeiro macho a cortejá-la e assim procedendo ela acaba por amostrar mais de um macho (Spiess, 1982).

Estes resultados, em conjunto, podem estar indicando que as fêmeas naturalmente tendem a rejeitar a cópula de um primeiro macho e, se este mesmo macho estiver portando ferormônios de cópulas anteriores, sua rejeição será ainda maior, como o percebido no teste 2 e na terceira cópula. Ainda assim elas copulam pois no presente experimento não lhe foi permitido amostrar mais de um macho da população.

O som produzido pelo vibrar das asas dos machos não diferiu em sua duração entre os testes. O vibrar de asas é um sinal importante na corte de *Drosophila* (Ewing & Bennet-Clark, 1967; Kyriacou & Hall, 1982; Robertson, 1983), constituindo um indicador da qualidade do macho (Hoikkala *et al.*, 1998). Este é um estímulo sonoro percebido pelas antenas e decodificado nos lóbulos antenais no cérebro da fêmea (Hall, 1994). Experimentos realizados com machos mudos, i. e., com as asas cortadas, e gravações em fita do som de outros machos, suportam a hipótese de que este é um estímulo sonoro uma vez que as fêmeas podem ser estimuladas pelo som apenas, sem verem as asas dos machos (Hall, 1994; Boake & Poulsen, 1997). Também foi demonstrado que fêmeas, quando ouvem o estímulo de machos, ficam mais estáticas e adotam a postura de aceitação da corte elevando o abdômen e

abrindo suas asas (Boake & Hoikkala, 1995; Crossley *et al.*, 1995; Hoikkala & Welbergen, 1995; Cobb & Ferveur, 1996).

O vibrar de asas foi decomposto em dois sons, sendo o primeiro responsável pela discriminação específica, específico de cada espécie ou até mesmo de populações simpátricas, nestas promovendo isolamento sexual (Ewing & Miyan, 1986; Manfrin *et al.*, 1997; Ritchie *et al.* 1999), e o segundo responsável pela discriminação individual, indicando o vigor daquele macho (Ikeda *et al.*, 1981). Comportamentos como este, que servem como comunicação, devem ser estereotipados para não serem mal interpretados. O programa genético que controla esses comportamentos deve ser fechado, ou seja, deve ser razoavelmente renitente a quaisquer mudanças durante o ciclo de vida individual. Outros comportamentos, como os que controlam a escolha do alimento ou do habitat, devem conter certa dose de flexibilidade para permitir a incorporação das experiências novas; tais comportamentos devem ser controlados por um programa aberto (Mayr, 1998).

Assim, no presente estudo apontamos evidências de que machos de *D. mercatorum* aprendem através de sua própria experiência a reconhecer mais rapidamente os estímulos que devem desencadear os devidos comportamentos de corte.

4.4. NÚMERO DE DESCENDENTES

O gênero *Drosophila* não exibe cuidados parentais e o investimento na progênie se dá apenas na energia e no metabolismo necessários para a produção de gametas, escolha do parceiro, atividades sexuais e oviposição. Os pais investem semelhante energia em cada indivíduo de cada sexo, e a seleção natural, na ausência de circunstâncias não usuais, deve favorecer uma razão sexual de 1:1 na concepção (Trivers, 1972). Como esperado, encontramos esta razão na progênie dos vários indivíduos amostrados neste experimento.

Quando procuramos por diferenças no número de descendentes adultos produzidos em cada cópula, verificamos que nem o efeito do tratamento e nem a experiência de cópula do macho influenciaram na produção de seus descendentes. Não podemos relacionar a quantidade de descendentes adultos produzidos com o valor adaptativo dos sujeitos pois efeitos de densidade larval são determinantes no sucesso da prole adulta (Santos, 1996), e estes efeitos não foram controlados neste experimento. A quantidade de meio disponível foi suficiente para a nutrição das larvas e esta mesma quantidade não foi totalmente consumida.

A duração dos comportamentos sexuais medidos não foi capaz de alterar a quantidade de descendentes adultos. Tampouco fomos capazes de relacionar qualquer diminuição na quantidade de esperma transferido às fêmeas em cópulas subsequentes haja visto que não encontramos diferenças no número de indivíduos adultos produzidos, apoiando resultados anteriores de que o tempo ideal para a recuperação do esperma do macho é de 24 horas (Markow *et al.*, 1978). Entretanto, não podemos dizer certamente se o prazo de

três dias para oviposição foi o bastante para que as fêmeas pudessem esgotar suas reservas de esperma. Em suma, não houveram relações entre a experiência do macho e seu sucesso reprodutivo em termos da maior produção de descendentes adultos. Propomos pesquisas futuras que controlem tanto a densidade larval quanto a taxa de sobrevivência de fêmeas inseminadas comparadas com fêmeas não inseminadas. Para isso, é necessário que se transfira diariamente as fêmeas a frascos novos, até que suas reservas de esperma sejam totalmente esgotadas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aprendizagem social não é um processo que deve estar relacionado à *Drosophila* pois este é um gênero que deve ter evoluído a ter seus comportamentos sexuais estereotipados, com forte determinação genética. A quantidade de mecanismos inatos presente nos comportamentos deste gênero não invalida seu uso como modelo em estudos de aprendizagem e memória. Informações acerca da biologia e ecologia das diversas espécies de *Drosophila* são importantes para que possamos acessar a história evolutiva e os padrões da aprendizagem nos diversos grupos animais. O contexto ecológico destas espécies ainda é pouco estudado e necessita de maior atenção em pesquisas futuras.

Embora seu ciclo de vida seja curto, machos de *D. mercatorum* são capazes de modificar suas respostas aos estímulos que desencadeiam comportamentos de corte, tornando-se mais rápidos conforme maior a experiência de cópulas adquiridas. Chamamos a atenção ao fato de que foi necessário apenas uma apresentação dos estímulos de corte para que o macho os associasse e aprendesse a iniciar a corte em menor tempo na cópula subsequente. Certamente quanto maior o número de cópulas, maior será a experiência do macho que irá maximizar a eficácia de sua percepção destes estímulos.

Concordamos que para se ter acesso aos processos que regem a seleção sexual, é preciso analisar ambos os sexos em conjunto. O sucesso de cópula do macho é o componente mais importante do valor adaptativo em *Drosophila* (Powell, 1997) e modelos de seleção sexual propõe que as fêmeas ganham benefícios diretos ou indiretos através de sua escolha pelo macho

(Møller & Thornhill, 1998). Entretanto, em *D. melanogaster*, os componentes que aumentam o valor adaptativo dos machos têm um efeito contrário em fêmeas, diminuindo sua sobrevivência e sua fertilidade, resultado de substâncias que viajam junto com o esperma (Rice, 1998; Civetta & Clark, 2000; Chippindale *et al.*, 2001). Assim, fêmeas podem garantir seu sucesso reprodutivo cruzando com aqueles machos que são mais vigorosos na corte, já que este vigor pode estar correlacionado com uma quantidade de esperma adequada e uma necessidade de transferi-lo (Trivers, 1972; Markow *et al.*, 1978). É possível que este vigor esteja relacionado a outros componentes destes comportamentos que não suas durações. A frequência do som produzido pelo vibrar de asas, a rapidez em se reconhecer os estímulos necessários para se iniciar a corte e a pouca dispersão podem fazer parte deste vigor.

De qualquer forma, os comportamentos complexos da corte de *Drosophila* devem ter evoluído por seleção sexual uma vez que fêmeas, rigorosas em suas escolhas, tem muito a perder copulando com machos de má qualidade e, machos, por sua vez, devem tentar inseminar o maior número de fêmeas sinalizando bem suas características. Como não sabemos quais os elementos escolhidos por fêmeas, não podemos relacionar o que é de boa ou má qualidade, do ponto de vista das fêmeas. O "efeito do macho raro" vem a nos mostrar que as fêmeas devem ter sido selecionadas a escolherem genótipos de machos que portem novidades, os que estão em menor frequência na população. Isso nos leva a crer que, além da vantagem de se amostrar mais de um tipo de macho, as fêmeas devam estar se beneficiando

destas novidades, que, por sua vez, devem estar correlacionadas com um aumento no valor adaptativo dos membros da espécie.

Serão necessários estudos posteriores que relacionem a experiência do macho em cópulas sucessivas com a latência da corte e os comportamentos de rejeição da fêmea. Também sugerimos pesquisas que controlem a densidade larval em estudos do valor adaptativo de machos e fêmeas de *Drosophila*. A "vantagem do macho raro" deve ser investigada no tocante às vantagens que novidades exibidas pelos machos tragam no possível aumento do valor adaptativo indireto de fêmeas.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALCOCK, J. 1993. **Animal Behavior: An Evolutionary Approach**. 5ª edição, Sinauer Associates, Inc.
- ARMSTRONG, J. D.; DE BELLE J. S.; WANG, Z. & KAISER, K. 1998. Metamorphosis of the mushroom bodies: large-scale rearrangements of the neural substrates for associative learning and memory in *Drosophila*. **Learn. Mem.**, 5: 102-114.
- AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D. L. & SANTOS, A. S. 2000. **Biostat 2.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, Brasil.
- BARRON, A. B. 2000. Anaesthetising *Drosophila* for behavioural studies. **J. Ins. Physio.** 46: 439-442.
- BOAKE, C. R. B. & HOIKKALA, A. 1995. Courtship behaviour and mating success of wild-caught *Drosophila silvestris* males. **Anim. Behav.** 49: 1303-1313.
- BOAKE, C. R. B. & KONIGSBERG, L. 1998. Inheritance of male courtship behavior, aggressive success, and body size in *Drosophila silvestris*. **Evolution** 52: 1487-1492.
- BOAKE, C. R. B. & POULSEN, T. 1997. Correlates versus predictors of courtship success: courtship song in *Drosophila silvestris* and *D. heteroneura*. **Anim. Behav.** 54: 699-704.
- BOAKE, C. R. B.; DeANGELIS, M.P. & ANDREADIS, D. K. 1997. Is sexual selection and species recognition a continuum? Mating behavior of the stalk-eyed fly *Drosophila heteroneura*. **PNAS** 94: 12442-12445.

- BOAKE, C. R. B.; ANDREADIS, D. K. & WITZEL, A. 2000. Behavioural isolation between two closely related Hawaiian *Drosophila* species: the role of courtship. **Anim. Behav.** 60: 495-501.
- BREMBS, B. & HEISENBERG, M. 2000. The operant and the classical in conditioned orientation of *Drosophila melanogaster* at the flight simulator. **Learn. Mem.**, 7: 104-115.
- CARSON, H. L. 1987. The contribution of sexual behavior to Darwinian fitness. **Behav. Genet.** 17: 597-611.
- CHIPPINDALE, A. K.; GIBSON, J. R. & RICE, W. R. 2001. Negative genetic correlation for adult fitness between sexes reveals ontogenetic conflict in *Drosophila*. **PNAS** 98: 1671-1675.
- CIVETTA, A. & CLARK, A. G. 2000. Correlated effects of sperm competition and postmating female mortality. **PNAS** 97: 13162-13165.
- COBB, M. & FERVEUR, J. 1996. Evolution and genetic control of mate recognition and stimulation in *Drosophila*. **Behav. Processes**, 35: 35-54.
- COLE, B. J. 1995. Fractal time in animal behaviour: the movement activity of *Drosophila*. **Anim. Behav.** 50: 1317-1324.
- CONNOLLY, J.; ROBERTS, I. J.; ARMSTRONG, D.; KAISER, K.; FORTE, M.; TULLY, T. & O'KANE, C. 1996. Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. **Science** 274: 2104-2107.
- CONNOLLY, J. & TULLY, T. 1998. Behavior, learning and memory. In: ***Drosophila A Practical Approach***: 265-317. 2ª edição. Oxford University Press.
- COOK, R. & COOK, A. 1975. The attractiveness to male of female *Drosophila melanogaster*. effects of mating, age and diet. **Anim. Behav.** 23: 521-526.

- CORFAS, G. & DUDAI, Y. 1991. Morphology of a sensory neuron in *Drosophila* is abnormal in memory mutants and changes during aging. **PNAS** 88: 7252-7256.
- CROSSLEY, S. A.; BENNET-CLARK, H. C. & EVERT, H. T. 1995. Courtship song components affect male and female *Drosophila* differently. **Anim. Behav.** 50: 827-839.
- DEZAZZO, J. & TULLY, T. 1995. Dissection of memory formation: from behavior pharmacology to molecular genetics. **TINS**, 18: 212-218.
- DUKAS, R. 1998. Evolutionary ecology of learning. In: **Cognitive Ecology: The Evolutionary Ecology of Information Processing and Decision Making.**: 129-174. Dukas, R. (ed.). Univ. of Chicago Press.
- EWING, A. W. & BENNET-CLARK, H. C. 1968. The courtship songs of *Drosophila*. **Behaviour** 31: 288-301.
- EWING, A. W. & MIYAN, J. A. 1986. Sexual selection, sexual isolation and the evolution of song in the *Drosophila repleta* group of species. **Anim. Behav.** 34: 421-429.
- FOLKERS, E.; DRAIN, P. & QUINN, W. G. 1993. *radish*, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. **PNAS** 90: 8123-8127.
- FUTUYMA, D. J. 1998. **Evolutionary Biology**. 3ª edição. Sinauer Associates, Inc.
- GAILEY, D. A.; HALL, J. C. & SIEGEL, R. W. 1985. Reduced reproductive success for a conditioning mutant in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 111: 795-804.

- GISQUET-VERRIER, P.; DEKEYNE, A. & ALEXINSKY, T. 1989. Differential effects of several retrieval cues over time: evidence for time-dependent reorganization of memory. **Anim. Learn. & Behav.** 17: 394-408.
- HALL, J. C. 1994. The mating of a fly. **Science**, 264: 1702-1714.
- HARDELAND, R. 1972. Species differences in the diurnal rhythmicity of courtship behaviour within the *melanogaster* group of the genus *Drosophila*. **Anim. Behav.** 20: 170-174.
- HEISENBERG, M. 1998. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. **Learn. Mem.** 5: 1-10.
- HELFRICH-FÖRSTER, C. 1996. *Drosophila* rhythms: from brain to behavior. **Cell & Develop. Biol.** 7: 791-802.
- HEYES, C. M.; RAY, E. D.; MITCHELL, C. J. & NOKES, T. 2000. Stimulus enhancement: controls for social facilitation and local enhancement. **Learn. Motiv.** 31: 83-98.
- HIRSCH, H. V. B.; BARTH, M.; LUO, S.; SAMBAZIOTIS, H.; HUBER, M.; POSSIDENTE, D.; GHIRADELLA, H. & TOMPKINS, L. 1995. Early visual experience affects mate choice of *Drosophila melanogaster*. **Anim. Behav.** 50: 1211-1217.
- HOIKKALA, A. & WELBERGEN, P. 1995. Signals and responses of females and males in successful and unsuccessful courtships of three Hawaiian lek mating *Drosophila* species. **Anim. Behav.** 50: 177-190.
- HOIKKALA, A.; ASPI, J. & SUVANTO, L. 1998. Male courtship song as an indicator of male genetic quality in an insect species, *Drosophila montana*. **Proc. R. Soc. Lond. B.** 265: 503-508.

- IKEDA, H.; IDOJI, H. & TAKABATAKE, I. 1981. Intraspecific variation in the thresholds of female responsiveness for auditory stimuli emitted by the male in *Drosophila mercatorum*. **Zool. Mag.**, 90: 325-332.
- JACOBS, M. E. 1960. Influence of light on mating of *Drosophila melanogaster*. **Ecology** 41: 182-188.
- JAHN, W. J. 1997. **Preference learning in *Drosophila* courtship: its characterization and ecological role**. Ph.D Thesis, Temple University, PA, EUA.
- JOINER, M. A. & GRIFFITH, L. C. 1997. CaM kinase II and visual input modulate memory formation in the neuronal circuit controlling courtship conditioning. **J. Neuros.** 17: 9384-9391.
- JOINER, M. A. & GRIFFITH, L. C. 1999. Mapping the anatomical circuit of CaM kinase-dependent courtship conditioning in *Drosophila*. **Learn. Mem.** 6: 177-192.
- KAMYSHEV, N. G.; ILIADI, K. G. & BRAGINA, J. V. 1999. *Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory. **Learn. and Mem.**, 6: 1-20.
- KANDEL, E. R.; KUPFERMANN, I. & IVERSEN, S. 2000. Learning and Memory, In: **Principles of Neural Science**: 1227-1246 Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessel, T. M. (eds.). 4ª edição, McGraw Hill Pubs.
- KNOPPIEN, P. 1985. Rare male mating advantage: a review. **Biol. Rev.** 60: 81-117.
- KREBS, R. A. & MARKOW, T. A. 1989. Courtship behavior and control of reproductive isolation in *Drosophila mojavensis*. **Evolution** 43: 908-913.

- KYRIACOU, C. & HALL, J. 1982. The function of song rhythms in *Drosophila*. **Anim. Behav.** 30: 794-801.
- LIU, L.; WOLF, R.; ERNST, R. & HEISENBERG, M. 1999. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. **Nature** 400: 753-756.
- LORENZ, K. 1981. **Os Fundamentos da Etologia**. Editora Unesp.
- MANFRIN, M. H.; PRADO, P. R. R. & SENE, F. M. 1997. Analyses of sound components of sexual courtship of two subspecies of *Drosophila mercatorum* (Diptera: Drosophilidae). **Rev. Bras. Biol.** 57: 349-355.
- MANNING, A. 1967. The control of sexual receptivity in female *Drosophila*. **Anim. Behav.** 15: 239-250.
- MARKOW, T. A.; QUAID, M. & KERR, S. 1978. Male mating experience and competitive courtship success in *Drosophila melanogaster*. **Nature** 276: 821-822.
- MARKOW, T. A.; BUSTOZ, D. & PITNICK, S. 1996. Sexual selection and a secondary sexual character in two *Drosophila* species. **Anim. Behav.** 52: 759-766.
- MARTIN, P. & BATESON, P. 1998. Guidelines for the use of animals in research. In: **Measuring Behaviour: An Introductory Guide**. Martin, P. & Bateson, P. (eds). 2ª edição. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- MAYR, E. 1998. **O Desenvolvimento do Pensamento Biológico**. Editora UnB. Brasília, Brasil.
- MELLER, V. H. & DAVIS, R. L. 1996. Biochemistry of insect learning: lessons from bees and flies. **Insect Biochem. Molec. Biol.** 26: 327-335.

- MENZEL, R. & GLURFA, M. 1999. Cognition by a mini brain. **Nature** 400: 718-719.
- MØLLER, A. P. & THORNHILL, R. 1998. Male parental care, differential parental investment by females and sexual selection. **Anim. Behav.** 55: 1507-1515.
- NECKAMEYER, W. S.; WOODROME, S.; HOLT, B. & MAYER, A. 2000. Dopamine and senescence in *Drosophila melanogaster*. **Neurobiol. Age.** 21: 145-152.
- OTTONI, E. B. 1999. **Etholog** versão 2.2.5. Lab. of Comp. Psychology and Ethology. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- PATTERSON, J. T. & WHELLER, M. R. 1942. Description of new species of the subgenera *Hirtodrosophila* and *Drosophila*. **Univ. Texas. Publ.** 4213: 67-109.
- PEREIRA, M. A. Q. R.; VILELA, C. R. & SENE, F. M. 1983. Notes on breeding and feeding sites of some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). **Ciênc. Cult.** 35: 1313-1319.
- POWELL, J. R. 1997. **Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model.** Oxford University Press. New York.
- PRÉAT, T. 1998. Decreased odor avoidance after electric shock in *Drosophila* mutants biases learning and memory tests. **J. Neurosc.** 18: 8534-8538.
- PROMISLOW, D. E. L.; SMITH, E. A. & PEARSE, L. 1998. Adult fitness consequences of sexual selection in *Drosophila melanogaster*. **PNAS** 95: 10687-10692.
- QUINN, W.; HARRIS, W. A. & BENZER, S. 1974. Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. **PNAS** 71: 708-712.

- QUINN, W. & DUDAI, Y. 1976. Memory phases in *Drosophila*. **Nature** 262: 576-577.
- RICE, W. R. 1998. Male fitness increases when females are eliminated from gene pool: implications for the Y chromosome. **PNAS** 95: 6217-6221.
- RITCHIE, M. G.; HALSEY, E. J. & GLEASON, J. M. 1999. *Drosophila* song as species specific mating signal and the behavioural importance of Kyriacou & Hall cycles in *D. melanogaster* song. **Anim. Behav.** 58: 649-657.
- ROBERTS, D. B. & STANDEN, G. N. 1998. The Elements of *Drosophila* Biology and Genetics. In: ***Drosophila a Practical Approach***: 1- 54. Roberts, D. B. & Standen, G. N. (eds). 2ª edição. Oxford University Press.
- ROBERTSON, H. M. 1983. Mating behavior and the evolution of *Drosophila mauritiana*. **Evolution** 37: 1283-1293.
- SANTOS, M. 1996. Apparent directional selection of body size in *Drosophila buzzatii*: larval crowding and male mating success. **Evolution** 50: 2530-2535.
- SCOTT, D.; RICHMOND, R. C. & CARLSON, D. A. 1988. Pheromones exchanged during mating: a mechanism for mate assessment in *Drosophila*. **Anim. Behav.** 36: 1164-1173.
- SENE, F. M. 1983. Geographic and ecological patterns of chromosome polymorphism in *Drosophila mercatorum pararepleta*. **Rev. Bras. Genet.** 9: 573-591
- SHETTLEWORTH, S. J. 1998. **Cognition, Evolution and Behavior**. Oxford University Press.
- SIEGEL, R. W. & HALL, J. C. 1979. Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. **PNAS** 76: 3430-3434.

- SPIESS, E. B. 1982. Do female flies choose their mates? **Am. Nat.** 119:675-693.
- SPIETH, H. T. 1974. Courtship behavior in *Drosophila*. **A. Rev. Ent.** 1974: 385-405.
- STURTEVANT, A. H. 1921. **The North American Species of *Drosophila***. Carnegie Inst. Wash. Publ. Lancaster, PA, EUA.
- TEMPEL, B. L.; BONINI, N.; DAWSON, D. R. & QUINN, W. 1983. Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. **PNAS** 80: 1482-1486.
- THORNHILL, R. & GWYNE, D. T. 1998. The evolution of sexual differences in insects. In: **Exploring Animal Behavior: Readings From the American Scientist**: 184-191. 2^a edição. Sherman, P. W. & Alcock, J. (eds.). Sinauer Associates, Inc.
- TRIVERS, R. L. 1972. Parental investment and sexual selection. In: **Foundations of Animal Behavior: Classic Papers With Commentaries**: 795-838. Houck, L. D. & Drickamer, L. C. (eds.). Chicago Press.
- TULLY, T., 1994. Gene disruption of learning and memory: a structure-function conundrum? **Sem. Neurosc.** 6: 59-66.
- TULLY, T. 1996. Discovery of genes involved with learning and memory: An experimental synthesis of Hirschian and Benzerian perspectives. **PNAS** 93: 13460-13467.
- TULLY, T.; PRÉAT, T.; BOYNTON, S. C. & DEL VECCHIO, M. 1994. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. **Cell** 79: 35-47.
- TULLY, T.; BOLWIG, G.; CHRISTENSEN, J.; CONNOLY, J.; DEZAZZO, J.; DUBNAU, J.; JONES, C.; PINTO, S.; REGULSKI, M.; SVEDBERG, B. &

- VELINZON, K. 1996. Genetic dissection of memory in *Drosophila*. **J. Physio. (Paris)** 90: 383-383.
- VAL, F. C.; VILELA, C. R. & MARQUES, M. D. 1981. Drosophilidae of the Neotropical region. In: **The Genetics and Biology of *Drosophila***. Vol. 3a. Ashburner, M., Carson, H. L. & Thompson, J. N. (eds.). Academic Press, London.
- VILELA, C.; PEREIRA, M. A. Q. R. & SENE, F. M. 1983. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. II. The *repleta* group. **Cienc. Cult.** 35: 66-70.
- WASSERMAN, M. 1982. The *repleta* species group. In: **The Genetics and Biology of *Drosophila***. Vol. 3. Ashburner, M., Carson, H. L. & Thompson, J. N. (eds.). Academic Press, London.
- WHITTIER, T. S. & KANESHIRO, K. Y. 1995. Intersexual selection in the mediterranean fruit fly: Do females choice enhance fitness? **Evolution** 49: 990-996.
- WILEY, R. H. & POSTON, J. 1996. Indirect mate choice, competition for mates, and coevolution of the sexes. **Evolution** 50: 1371-1381.
- WOLF, R.; WITTIG, T.; LIU, L.; WUSTMANN, G.; EYDING, D. & HEISENBERG, M. 1998. *Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile, and motor learning. **Learn. Mem.** 5: 166-178.
- XIA, S.; LIU, L.; FENG, C. & GUO, A. 1997. Drug disruption of short-term memory in *Drosophila melanogaster*. **Pharmac. Biochem. Behav.** 58: 727-735.
- XIA, S.; LIU, L.; FENG, C. & GUO, A. 1998. Multiple-phase model of memory consolidation confirmed by behavioral and pharmacological analyses of

- operant conditioning in *Drosophila*. **Pharmac. Biochem. Behav.** 60: 809-816.
- XIA, S.; FENG, C. & GUO, A. 1999. Temporary amnesia induced by cold anesthesia and hypoxia in *Drosophila*. **Physiol. Behav.** 65: 317-623.
- YAMAMOTO, D. & NAKANO, Y. 1998. Genes for sexual behavior. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 246: 1-6.
- YAMAMOTO, D.; FUJITANI, K.; USUI, K.; ITO, H. & NAKANO, Y. 1998. From behavior to development: genes for sexual behavior define the neuronal sexual switch in *Drosophila*. **Mechan. Develop.** 73: 135-146.
- ZAR, J. H. 1999. **Biostatistical Analysis**. 4^a edição. Prentice-Hall, Inc.
- ZAWISTOWSKI, S. 1988. A replication demonstrating reduced courtship of *Drosophila melanogaster* by associative learning. **J. Comp. Psychol.** 102: 174-176.