

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**APRENDIZAGEM E MEMÓRIA EM *Anastrepha fraterculus*  
(WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) e *Grapholita molesta* (BUSCK)  
(LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE)**

**Patrícia Luciane Fernandes Gregório  
Mestre em Fitotecnia (UFRGS)**

**Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia  
Ênfase Entomologia**

**Porto Alegre (RS), Brasil  
Julho de 2013**

## CIP - Catalogação na Publicação

Gregorio, Patrícia Luciane Fernades  
APRENDIZAGEM E MEMÓRIA EM *Anastrepha fraterculus*  
(WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) e *Grapholita*  
*molesta* (BUSCK) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) / Patrícia  
Luciane Fernades Gregorio. -- 2013.  
70 f.

Orientador: Josué Sant'Ana.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Comportamento de Insetos. 2. Aprendizagem e  
Memória em Insetos. I. Sant'Ana, Josué, orient. II.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PATRÍCIA LUCIANE FERNANDES GREGÓRIO  
Bióloga - UNISINOS  
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

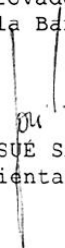
## TESE

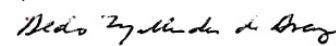
Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### DOUTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 16.07.2013  
Pela Banca Examinadora

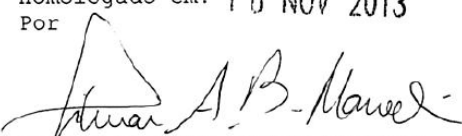
  
JOSUÉ SANT'ANA  
Orientador - PPG Fitotecnia


  
ALDO MELLENDER DE ARAUJO  
PPG Genética e Biologia Molecular/UFRGS

  
ALDO BOLTEN LUCION  
Departamento de Fisiologia/UFRGS

  
ROSANA MATOS DE MORAIS  
FEPAGRO

Homologado em: 18 NOV 2013  
Por

  
GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

  
PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade  
de Agronomia

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Josué Sant' Ana, pelos ensinamentos, incentivo e amizade.

À toda equipe do BIOECOLAB e especialmente a Patrícia Pires pela participação na execução dos bioensaios.

Ao professor André Tubino e ao auxiliar de ensino Lucas da Silva Machado, do laboratório de eletrotécnica da Fundação Liberato Salzano Vieira da Cunha, pelo auxílio na elaboração do aparato utilizado nos bioensaios de aprendizagem.

Ao professor Marco Aurélio Weschenfelder, coordenador do curso de eletrotécnica da Fundação Liberato Salzano Vieira da Cunha, por ceder o laboratório de eletrotécnica para a execução dos bioensaios de aprendizagem associativa.

Às professoras Dra. Luiza Rodrigues Redaelli e Dra. Simone Mundstock Jahnke pelo auxílio durante o curso.

À capes pela bolsa de estudos concedida.

A meu marido Amaury por todo amor companheirismo e incentivo.

Aos meus pais Delci e João Carlos por todo carinho e confiança.

À minha irmã Carla por todos os momentos de alegria e descontração.

À minha avó Lydia (*in memoriam*) por todos os ensinamentos e pelo exemplo de força.

À amiga Marlusa, pela companhia e por todo o auxílio "extra tese".

A todos que de alguma forma estiveram envolvidos com este trabalho, permitindo sua conclusão.

**APRENDIZAGEM E MEMÓRIA EM *Anastrepha fraterculus*  
(WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) e *Grapholita molesta* (BUSCK)  
(LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE)<sup>1</sup>**

Autora: MSc. Patrícia Luciane Fernandes Gregório  
Orientador: Dr. Josué Sant'Ana

**RESUMO**

A aprendizagem caracteriza-se como a mudança de um determinado comportamento, que ocorre como resultado de uma experiência anterior. Esta capacidade pode auxiliar os insetos em estratégias de busca e defesa, conferindo a estes, plasticidade de respostas frente a diferentes estímulos. O presente estudo teve como objetivo, avaliar a ocorrência de aprendizagem e memória em *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) e *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera, Tortricidae). Foram avaliadas as respostas comportamentais de *A. fraterculus*, quando previamente expostas a frutos artificiais confeccionados com ágar, água e polpa de espécies hospedeiras, ou inexperientes, assim como moscas previamente expostas a frutos artificiais contendo óleo essencial de capim-limão ou confeccionados apenas com água e ágar (controle). Também foram verificadas as respostas quimiotáxicas de lagartas e adultos de *G. molesta* experientes ou não com o odor de óleo essencial de capim-limão e a permanência da memória olfativa após a metamorfose. Além disso, foi avaliada a influência de um estímulo aversivo sobre aprendizagem associativa, após o condicionamento das lagartas desta espécie, pareando odor de acetato de etila e choque elétrico, sendo as lagartas e adultos posteriormente testados em olfatômetro Y. A experiência com frutos artificiais contendo polpa de amora influenciou positivamente o número de puncturas e de ovos depositados sobre este substrato, por *A. fraterculus*, sendo que esta memória se manteve por até 72 horas, enquanto que a exposição a substratos contendo polpa de goiaba não afetou o comportamento das moscas. A experiência prévia com óleo essencial de capim-limão alterou o comportamento de escolha do hospedeiro, por *A. fraterculus* e o quimiotáxico de lagartas e adultos de *G. molesta*. Lagartas de *G. molesta* aprenderam de forma associativa e mantiveram a memória adquirida após a metamorfose por 72 horas.

---

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (70 p.). Julho, 2013

**LEARNING AND MEMORY IN *Anastrepha fraterculus*  
(WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) AND *Grapholita molesta*  
(BUSCK) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE)<sup>1</sup>**

Author: MSc. Patrícia Luciane Fernandes Gregório  
Advisor: Dr. Josué Sant'Ana

**ABSTRACT**

Learning is defined as a change in behavior caused by prior experience. Insects' capacity to learn helps improve their search and defense strategies by allowing them a plasticity of response to different stimuli. The aim of this study was to assess learning and memory in *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) and *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera, Tortricidae). Behavioral responses were tested for *A. fraterculus* flies previously exposed to artificial fruits consisting of agar, water, and fruit pulp of host species, flies not exposed to such fruits, flies previously exposed to artificial fruits containing lemongrass essential oil, and flies exposed to fruits made with water and agar (control). Chemotaxic responses of *G. molesta* caterpillars and adults exposed or not exposed to lemongrass essential oil were also assessed, together with the duration of olfactory memory after metamorphosis. The influence of an adverse stimulus on associative learning was also tested, by first conditioning *G. molesta* caterpillars to associate ethyl acetate with an electric shock, and then testing caterpillar and adult behavior in a Y-olfactometer. Prior experience with artificial fruits containing blackberry pulp increased the number of punctures and eggs deposited by *A. fraterculus* on that substrate, with this memory lasting for up to 72 hours. By contrast, exposure to substrates with guava pulp did not affect flies' behavior. Prior experience with lemongrass essential oil modified the host-selection behavior of *A. fraterculus* and the chemotaxy of juvenile and adult *G. molesta*. *G. molesta* caterpillars demonstrated associative learning and maintained the memory for 72 hours after metamorphosis.

---

<sup>1</sup>Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (70p.). July, 2013

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	3
2.2 <i>Grapholita molesta</i> .....	6
2.3 Comunicação em Insetos.....	8
2.4 Aprendizagem , memória e seleção do speideiro.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Criações.....	17
3.1.1 <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	17
3.1.2 <i>Grapholita molesta</i> .....	20
3.2. Bioensaios.....	21
3.2.1 <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	21
3.2.1.1 Preferência por substrato de oviposição.....	21
3.2.1.2 Avaliação do tempo de experiência e retenção de memória.....	22
3.2.1.3 Efeito da exposição prévia ao óleo essencial de capim-limão ( <i>Cymbopogon citratus</i> ) sobre a escolha do substrato.....	23
3.2.1.3.1. Condicionamento na fase larval.....	23
3.2.1.3.2 Condicionamento na fase adulta.....	24
3.2.2 <i>Grapholita molesta</i> .....	25
3.2.2.1. Aprendizagem em lagartas.....	25
3.2.2.2 Memória olfativa após a metamorfose.....	26
3.2.2.3 Memória olfativa adquirida na fase adulta.....	27
3.2.2.4 Aprendizagem associativa.....	28
3.3 Análise dos dados.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	32
4.1.1 Preferência por substratos de oviposição.....	32
4.1.2 Avaliação do tempo de experiência e retenção de memória.....	34
4.1.3 Efeito da exposição prévia ao óleo essencial de capim-limão ( <i>Cymbopogon citratus</i> ) sobre a escolha do substrato de oviposição.....	39
4.1.3.1 Condicionamento na fase larval.....	39
4.1.3.2 Condicionamento na fase adulta.....	40
4.2 <i>Grapholita molesta</i> .....	44

4.2.1 Aprendizagem em lagartas.....	44
4.2.2 Memória olfativa após a metamorfose.....	48
4.2.3 Aprendizagem na fase adulta.....	51
4.2.4 Aprendizagem Associativa.....	54
5 CONCLUSÕES .....	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61



## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Adulto de <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	4
2. Adulto de <i>Grapholita molesta</i> .....	7
3. Gaiola de armação de madeira revestida com tecido voile com adultos de <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	18
4. Substrato de oviposição para <i>Anastrepha fraterculus</i> : placa aberta, vista interna (A) e vista inferior externa (B).....	20
5. Criação de <i>Grapholita molesta</i> : A) gaiola de criação com insetos adultos e B) recortes da gaiola de criação sobre dieta artificial.....	21
6. Equipamento utilizado para o condicionamento larval A) Circuito impresso dentro de caixa Gerbox; B) matriz de contatos; C) fonte de alimentação; D) multímetro; E) pipeta Pasteur; F) bomba de vácuo.....	30
7. Número médio de ovos depositados ( $\pm$ EP) por <i>Anastrepha fraterculus</i> em frutos artificiais contendo diferentes polpas (Tratamentos).....	32
8. Número médio ( $\pm$ EP) de puncturas realizadas por fêmeas de <i>Anastrepha fraterculus</i> em frutos artificiais de goiaba (G) e amora (A), quando previamente expostas aos mesmos por 48 horas (A48 e G48) e 72 horas (A72 e G72) ou quando não houve exposição prévia aos mesmos (inexperientes) (n = 25).....	35
9. Número médio ( $\pm$ EP) de ovos depositados por fêmea de <i>Anastrepha fraterculus</i> em frutos artificiais de goiaba (G) e amora (A), quando previamente expostas aos mesmos por 48 horas (A48 e G48) e 72 horas (A72 e G72) ou quando não houve exposição prévia aos mesmos (inexperientes) (n = 25).....	36

10. Número médio ( $\pm$  EP) de puncturas realizadas por fêmea de *Anastrepha fraterculus* em frutos artificiais com polpa de amora e goiaba, quando não tiveram contato com os frutos (inexperientes) ou quando foram previamente expostas a frutos artificiais contendo polpa de amora por 72 horas e testados após 48, 72 e 96 horas (n = 20). ..... 37
11. Número médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por fêmeas de *Anastrepha fraterculus*, em frutos artificiais contendo óleo essencial de capim-limão ou controle (livre do odor) oriundas de lagartas expostas por todo período de desenvolvimento ao odor do óleo essencial ou inexperientes. .... 40
12. Número médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por fêmeas de *Anastrepha fraterculus*, em frutos artificiais contendo óleo essencial de capim-limão ou controle (água e ágar) quando previamente expostas ao odor do óleo essencial por 72 horas. A) no início da fase adulta; B) aos 15 dias de idade; ou inexperientes. .... 41
13. Números e percentuais de respostas quimiotáticas de lagartas de 5º instar de *Grapholita molesta* aos odores de óleo essencial de capim-limão e acetona, quando previamente expostas a estes por 48 horas após a eclosão e inexperientes (sem contato prévio com os odores), em olfatômetro Y. .... 45
14. Números e percentuais de respostas quimiotáticas de lagartas de 5º instar de *Grapholita molesta* aos odores de óleo essencial de capim-limão e acetona, quando previamente expostas a estes por 10 a 12 dias (A) ou por 24 horas (B) e inexperientes (sem contato prévio com os odores), em olfatômetro Y. .... 46
15. Números e percentuais de respostas quimiotáticas de adultos (♂ e ♀ com 48 a 72h de idade) de *Grapholita molesta* aos odores de óleo essencial de capim-limão e acetona, oriundos de lagartas previamente expostas aos mesmos por todo período de desenvolvimento larval (A); por 24 horas, antes dos testes (B) e inexperientes, em olfatômetro Y. .... 49
16. Números e percentuais de respostas quimiotáticas de adultos (♂ e ♀ com 48 a 72h de idade) de *Grapholita molesta* aos odores de óleo essencial de capim-limão e acetona, quando previamente expostos a estes por 48 horas após a emergência e inexperientes (sem contato prévio com os odores), em olfatômetro Y. .... 52

17. Números e percentuais de respostas quimiotáxicas de lagartas de *Grapholita molesta* ao odor de acetato de etila (AE) e ar ambiente, previamente expostas a cinco tratamentos: apenas ao ar ambiente (N = 33), ar seguido de choque (N = 30), apenas odor de AE (N = 32), odor de Ae seguido de choque (N = 35), odor de AE seguido de choque + odor de AE (N = 34)..... 55
18. Números e percentuais de respostas quimiotáxicas de adultos (♂ e ♀ com 72h de idade) de *Grapholita molesta* ao odor de acetato de etila (AE) e ar ambiente, oriundos de lagartas previamente expostas a cinco tratamentos: apenas ao ar ambiente (N = 25), ar seguido de choque (N = 29), apenas odor de AE (N = 23), odor de AE seguido de choque (N = 25)... 56

## 1 INTRODUÇÃO

A aprendizagem tem papel fundamental em uma variedade de decisões tomadas por diferentes grupos de insetos, sendo considerada uma adaptação para lidar com as imprevisibilidades do ambiente. A resposta instintiva (inata) corresponde à reação comportamental diante de estímulos não experimentados previamente, sendo estes programados geneticamente e selecionados quando conferem vantagens competitivas. A aprendizagem é a associação de novos estímulos experimentados durante a execução de um determinado comportamento, a qual pode auxiliar os insetos em estratégias de busca e defesa, conferindo a estes, plasticidade de respostas frente a diferentes estímulos. A ocorrência da aprendizagem implicitamente assume a existência da memória, como capacidade de reter informações adquiridas. Alguns estudos tem evidenciado a memória olfativa em insetos, relacionada a estímulos recebidos tanto durante a fase larval quanto na adulta, os quais exercem influência sobre o comportamento quimiotático dos mesmos. No entanto, pouco se sabe sobre os processos de aprendizagem e memória em tortricídeos e tefritídeos, e quais fatores podem influencia-los.

Neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram: avaliar a influência do tempo de experiência sobre o comportamento de oviposição e retenção de memória em *Anastrepha fraterculus*; verificar o efeito da exposição prévia ao óleo essencial de capim-limão sobre a escolha do

substrato de oviposição em *Anastrepha fraterculus* e sobre o comportamento quimiotáxico de lagartas e adultos de *Grapholita molesta*, assim como na persistência de memória após a metamorfose nesta espécie; avaliar a influência de estímulos aversivos (choque elétrico) sobre a aprendizagem associativa e a permanência da memória olfativa após a metamorfose em *Grapholita molesta*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Anastrepha fraterculus*

A mosca-das-frutas-sul-americana, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) é a espécie de maior importância econômica do gênero e está distribuída entre os extremos latitudinais da América do Sul (35 °N a 35 °S), ocupando ambientes bastante distintos (Malavasi *et al.*, 2000). Na Argentina, no Uruguai e nos estados do sul e sudeste do Brasil (do Rio Grande do Sul até o centro sul de Minas Gerais e Espírito Santo) é considerada uma praga primária e são nestas regiões onde se concentram as maiores perdas (Nava & Botton, 2010).

Na região sul do país, *A. fraterculus* representa cerca de 97% das espécies deste gênero capturadas nos pomares (Salles, 1991), enquanto nas demais, sua importância decresce em função da ocorrência de outros tefritídeos (Malavasi *et al.*, 2000).

Os adultos de mosca-das-frutas-sul-americana (Figura 1) possuem cerca 7 mm de comprimento e 16 mm de envergadura, cor amarela, com manchas mais escuras no corpo e nas asas. O abdômen apresenta três faixas latitudinais mais claras, uma na parte central e duas laterais (Salles, 1995).



FIGURA 1. Adulto de *Anastrepha fraterculus*.

Os ovos têm coloração branco-creme com diferentes tonalidades (Salles, 2000), são em geral, alongados e ligeiramente curvos, com extremidades afiladas ou arredondadas (Selivon & Perondini, 2000), medindo cerca de 1,5 mm de comprimento e 0,2 mm de largura (Salles, 1995). As larvas apresentam coloração semelhante a dos ovos, corpo liso com onze segmentos, são ápodas e com cabeça retrátil (Salles, 1995), quando totalmente desenvolvidas medem em torno de 6 mm (Salles, 1991). O pupário varia de cor branca a amarelada, mantém distinguíveis os onze segmentos larvais, apresenta forma ovalada, medindo cerca de 6 mm de comprimento e 2 mm de largura (Salles, 1995).

A duração do ciclo da mosca-das-frutas é dependente das condições do meio ambiente. Segundo Salles (2000), a temperatura mais adequada para o desenvolvimento de *A. fraterculus* é de 25 °C com períodos médios

de 2,8; 12,7 e 14,1 dias para os estágios de ovo, larva e pupa, respectivamente. Segundo o autor, nas mesmas condições, o período médio de pré-oviposição é de 22,7 dias e o de oviposição, de 79,1 dias, com média de 25,2 ovos/dia.

O comportamento de oviposição de *Anastrepha* spp. é caracterizado pela exibição de uma sequência de comportamentos, que inclui: chegada ao fruto (através da utilização de estímulos visuais e químicos); procura (a fêmea percorre a superfície do fruto, tocando-a com a parte anterior da cabeça e com a bainha do ovipositor); punctura (a fêmea insere o acúleo na polpa do fruto, não sendo obrigatória a deposição de ovos) e arraste (a fêmea percorre a superfície do fruto, mas com o acúleo protraído) (Sugayama & Malavasi, 2000).

O dano da mosca-das-frutas é causado tanto pela oviposição no fruto, quanto pelo hábito alimentar carpófago das larvas, as quais durante a alimentação fazem galerias nos frutos, alterando o sabor, causando amadurecimento precoce, apodrecimento e queda dos mesmos (Salles, 1995; Aguiar-Menezes *et al.*, 2004). Segundo Carvalho (2005), em diversos hospedeiros tais como ameixa, pera, maçã e citros, a epiderme fica marcada no local da punctura e com o desenvolvimento do fruto, forma-se uma concavidade ou deformação depreciando o mesmo. De acordo com esse autor, no local da punctura pode ocorrer a contaminação do fruto por bactérias e fungos, acarretando o apodrecimento do mesmo.



## **2.2 *Grapholita molesta***

*Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera, Tortricidae) tem como centro de origem o continente asiático (Gonzalez, 1989). É considerada uma praga cosmopolita, distribuída em diversas regiões agrícolas do mundo, onde se cultivam espécies fruteiras de Rosaceae, seus principais hospedeiros (Salles, 2000a). No Brasil, é referida principalmente, para a região centro-sul do país, grande produtora de pêssego (Salles, 1998) e maçã (Mello, 2004).

Os adultos de *G. molesta* (Figura 2) possuem aproximadamente 12 mm de envergadura, coloração pardo-escuro-acinzentada, com algumas estrias de cor branca (Monteiro & Hickel, 2004). Conforme Alfonso & Marin (2004), a longevidade média de fêmeas e de machos é de 16,18 e 14,08 dias, respectivamente. Os ovos são pequenos, medindo cerca de 0,7 mm de diâmetro (Monteiro & Hickel, 2004). A postura é feita, preferencialmente, na face inferior das folhas novas, nas brotações e nos frutos, com um período de incubação entre 2 a 6 dias (Grellmann *et al.*, 1991).

As lagartas apresentam cabeça preta e são branco-acinzentadas até o terceiro instar, tornando-se branco-rosadas no quarto e quinto, quando atingem de 12 a 14 mm de comprimento. As pupas ficam abrigadas em casulos de seda e permanecem, geralmente, em fendas da casca dos troncos e ramos, no pedúnculo dos frutos ou em detritos do solo, sob a copa da planta. Estas apresentam coloração castanha e medem, cerca de 6 mm de comprimento (Salles, 2000a; Monteiro & Hickel, 2004). O período larval dura de 11 a 21 dias e a fase de pupa, normalmente, de 9 a 12, quando

acondicionadas a 30 e 20°C, respectivamente, umidade relativa de 75% e fotofase de 14 horas (Grellmann *et al.*, 1991).



FIGURA 2. Adulto de *Grapholita molesta*

A lagarta perfura os brotos novos, não lignificados, ou o pecíolo da folha, migrando para os ramos principais, onde constrói galerias, através do consumo da parte interna do ramo, provocando murchamento e morte dos ponteiros (Fachinello *et al.*, 1996). Segundo Salles (2000a), a fase jovem pode atacar de dois a quatro ponteiros, fazendo uma galeria de cima para baixo e deixando excrementos apenas na entrada desta. Nos frutos, penetram principalmente na base, próximo à cavidade peduncular, perfurando uma galeria em direção ao seu centro (Embrapa, 2005). A galeria, resultante da alimentação destas, contém excrementos envoltos em fios de seda aderidos a uma goma de resina, apresentando um aspecto de teia (Embrapa, 2005). Devido aos danos provocados, os frutos podem cair prematuramente (Monteiro & Hickel, 2004).

### 2.3 Comunicação em Insetos

A comunicação entre animais é realizada através do uso de sinais visuais, acústicos, táteis e/ou químicos. Os insetos, de uma maneira geral, utilizam todos estes sinais no processo de comunicação, a ênfase dada a cada um deles, no entanto, difere entre as espécies. A principal forma de comunicação usada por uma determinada espécie está intimamente relacionada com a natureza de seu habitat, seu comportamento e a interação desta espécie com seu meio ambiente (Evershed, 1986).

A maior parte das comunicações dentro da Classe Insecta é mediada por substâncias químicas. Estas substâncias são as principais responsáveis pelo comportamento reprodutivo, de defesa, localização e seleção do hospedeiro, do habitat e, no caso de insetos sociais, da organização da colônia. Qualquer substância química que liberada por um determinado organismo, provoque uma mudança fisiológica e/ou comportamental em um outro, é denominada de semioquímico. Estes compostos podem ter ação intraespecífica (feromônio) ou interespecífica (aleloquímico) (Corrêa & Sant'Ana, 2001).

Os insetos dependem fortemente do olfato para detectar o ambiente externo (Krieger & Breer, 1999). O encontro do hospedeiro por fitófagos ocorre, muitas vezes, através do reconhecimento de sinais químicos liberados pela planta (Bruce & Pickett, 2011) e depende das proporções dos compostos voláteis liberados e não apenas da detecção da presença ou ausência de compostos específicos, o que permite aos insetos distinguir espécies hospedeiras de não hospedeiras (Bruce *et al.*, 2005).

Estes sinais químicos são percebidos por células nervosas receptoras localizadas dentro de sensilas olfativas, as quais estão presentes, principalmente nas antenas, mas podem também estar localizadas nas mandíbulas, palpos, tarsos (Atkins, 1980; Boeckh, 1984) e ovipositor (Faucheux, 1991).

A cutícula das sensilas quimiorreceptoras é porosa e abriga uma cavidade preenchida com linfa, onde estão alojados os dendritos dos neurônios olfativos (DNOs) (Stensmyr, 2004), os quais são protegidos por mucopolissacarídeos secretados por células acessórias (Kaissling, 1974). As moléculas de odor entram em contato com a linfa, através dos poros cuticulares e podem se ligar a proteínas receptoras específicas (Vogt & Riddiford, 1981).

No sistema olfativo ocorre um processo de transdução que converte o sinal químico em elétrico, e estes impulsos gerados são conduzidos, através do nervo antenal, até o lóbulo antenal, sendo este um centro de integração olfativa, organizado em subunidades funcionais chamadas glomérulos (Hildebrand & Shepherd, 1997). A informação é então direcionada, através do trato anteno-cerebral, passando do lóbulo antenal para o corpo cogumelar "*mushroom body*" (Davis, 1993), o qual está associado aos processos de aprendizagem e memória (Davis, 2005).

#### **2.4 Aprendizagem , memória e seleção do hospedeiro**

No início do século XX acreditava-se que o comportamento dos insetos era essencialmente guiado pelo instinto (Fabre *et al.*, 1918). No entanto, posteriormente foi constatado que a aprendizagem tem papel

fundamental em uma variedade de decisões tomadas por diferentes grupos de insetos (Papaj & Lewis, 1993), sendo considerada uma adaptação para lidar com as imprevisibilidades do ambiente (Alcock, 2005).

Para Matthews & Matthews (2010), a aprendizagem é definida como a mudança de um comportamento, que ocorre como resultado de uma experiência. Estas alterações ocorrem gradualmente através da exposição contínua a determinado estímulo e pode ser modificada por novas experiências. Já a memória, é a capacidade de reter uma determinada informação. Segundo os mesmos autores, em termos fisiológicos aprendizagem e memória podem ser definidos, respectivamente, como aquisição e retenção de representações neuronais de novas informações. A ocorrência da aprendizagem implicitamente assume a existência da memória, como capacidade de reter informações adquiridas por períodos curtos (memória de curta duração) ou longos (memória de longa duração) (Dudai, 2002).

A aprendizagem pode ser ou não associativa. Na aprendizagem não associativa, o indivíduo é exposto a apenas um estímulo, o qual é repetido sucessivamente e gera modificações no comportamento do animal (Squire & Kandel, 1999). A associativa se baseia na relação entre estímulos e reforços positivos (recompensas) ou negativos (punições), através de condicionamento (Matthews & Matthews, 2010).

O condicionamento pode ser clássico (Pavlov, 1927), onde os animais aprendem a associar um estímulo neutro ou condicionado a um estímulo incondicionado; ou operante (Skinner, 1938), quando o indivíduo aprende a associar seu próprio comportamento com um reforço, ocorrendo sem a

presença de um estímulo incondicionado, ou seja, é um comportamento voluntário do organismo.

O processo de condicionamento clássico em animais, sob condições controladas de laboratório, foi primeiramente descrito por Pavlov (1927) através de estudos realizados com cães, associando um estímulo neutro (que de forma inata não provocava qualquer resposta), o som de uma campainha, com um estímulo incondicionado, a carne (que provocava a salivação). Após algumas repetições, o som da campainha tornou-se um estímulo condicionado, levando os cães a salivarem na presença do som e ausência do alimento.

Embora os primeiros indícios de condicionamento clássico com animais tenham sido realizados no final da década de 1920, apenas em 1971, Nelson apresentou as primeiras evidências deste processo em insetos, através de estudos realizados com *Phormia regina* Meigen 1826 (Diptera, Calliphoridae) (Nelson, 1971). Posteriormente este tipo de condicionamento foi utilizado para avaliar a capacidade de aprendizagem de vários grupos de insetos, como lepidópteros (Kroutov *et al.*, 1999; Fan & Hansson, 2001), parasitoides (Dukas & Duan, 2000; Desouhant *et al.*, 2010) e abelhas (Mc Cabe *et al.*, 2007; Mc Cabe & Farina, 2010).

Através do processo de condicionamento clássico, foi constatada a aprendizagem associativa, em lagartas de *Spodoptera littoralis* Boisduval, 1833 (Noctuidae: Lepidoptera), por Salloum *et al.* (2011), os quais registraram um vínculo entre estímulos olfativos e reforços gustativos, ao parear um estímulo incondicionado, o alimento frutose, a um condicionado, hexanol. Os autores verificaram que lagartas previamente expostas ao

hexanol associado ao alimento, foram significativamente mais atraídas por este composto, quando comparadas a lagartas anteriormente expostas ao hexanol não pareado.

A mesma capacidade de associar estímulos olfativos e gustativos foi observada em larvas de *Drosophila*, através de 10 episódios de experiência de um minuto cada (Scherer *et al.* 2003; Gerber & Stocker 2007; Schipanski *et al.* 2008) ou após três sessões de cinco minutos (Schipanski *et al.* 2008). Já Blackiston *et al.* (2008) verificaram que lagartas de *Manduca sexta* L., 1763 (Lepidoptera: Sphingidae), são capazes de associar o odor de Acetato de Etila a um choque elétrico, após 8 sessões de experiência de 20 segundos cada, sendo que esta associação se manteve após a metamorfose.

A duração da memória associativa em insetos pode variar consideravelmente de minutos a meses dependendo da idade e do sexo do organismo testado, assim como, em função do tipo de estímulo e do número de repetições os quais o inseto é exposto (Neuser *et al.*, 2005).

Adultos de *Periplaneta americana* L., 1758 (Dyctioptera: Blattidae), são capazes de associar o odor de menta a uma recompensa (solução de sacarose), assim como o odor de baunilha com uma punição (solução salina), quando previamente condicionadas e de reter esta informação por quatro dias (Wantanabe *et al.*, 2003).

Em muitas espécies de insetos a seleção da planta hospedeira para alimentação ou oviposição pode ser influenciada tanto pelas características inatas, quanto pela experiência prévia (Miller e Strickler, 1984). Desde o início do século XX, diferentes teorias têm sido propostas para explicar a

indução da preferência pela planta hospedeira por insetos, incluindo o princípio de seleção do hospedeiro de Hopkins (Hopkins, 1917), o novo princípio de Hopkins (Jaenike, 1983) e a hipótese do legado químico (Corbet, 1985).

O Princípio da Seleção do Hospedeiro de Hopkins (PSHH) postula que insetos fitófagos e parasitoides, preferem se alimentar ou ovipositar na mesma espécie na qual se desenvolveram. Este princípio é sustentado por vários estudos, tais como o de Facknath & Wright (2007), os quais avaliaram a influencia da experiência prévia, durante a fase larval, com as plantas hospedeiras, *Solanum tuberosum* (Solanaceae) e *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae), sobre o comportamento oviposição de duas espécies de dípteros galhadores *Liriomyza trifoli* Burgess e *Liriomyza huidobrensis* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) e constataram que ambos dípteros, preferem ovipositar nas espécies das quais se alimentaram na fase larval.

Chow *et al.* (2005) estudaram o efeito da experiência larval com látex de *Hoodia gordonii* (Asclepiadaceae), sobre o comportamento subsequente de *Trichoplusia ni* Hübner, 1802 (Lepidoptera: Noctuidae), e observaram a deterrência de oviposição para látex em mariposas não expostas previamente ao material, já as oriundas de larvas experientes, segundo os autores, preferiram ovipositar no substrato tratado com o látex em detrimento do controle. Resultados semelhantes foram constatados para a mesma espécie por Shikano & Isman (2009). No entanto, em estudos com outras espécies de lepidópteros como *Euphydryas editha* Boisduval, 1852 (Nymphalidae) (Parmesan *et al.*, 1995), *Papilio polyxenes* Fabricius, 1775 (Papilionidae) (Heinz & Feeny, 2005) e *Heliconius erato* Linnaeus, 1758



(Nymphalidae) (Kerpel & Moreira, 2005) o processo de aprendizagem não foi observado.

Segundo Tully *et al.* (1994) a persistência da memória após a metamorfose em insetos holometábolos pode estar relacionada a permanência dos neurônios presentes na fase larval e sua integração subsequente no sistema nervoso adulto. Esta hipótese foi testada por Ray (1999), o qual avaliou a preferência de adultos de *Musca domestica* L., 1758 (Diptera: Muscidae) em olfatômetro Y, após as mesmas, na fase imatura, receberem células nervosas de larvas treinadas com odores de menta e geraniol, e constatou a permanência da memória após a metamorfose.

O Novo Princípio de Hopkins enfatiza a importância da experiência prévia na fase adulta dos insetos sobre a escolha do hospedeiro (Jeanike, 1983). Estudos realizados com *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae), demonstraram que a exposição prévia de moscas adultas a determinados substratos de oviposição pode incrementar sua preferência subsequente pelo mesmo (Jeanike, 1983). Barron e Cobert (2000) também avaliaram a influência da experiência na fase adulta sobre *D. melanogaster*, e constataram que a exposição prévia ao mentol, nesta fase, resultou na indução de respostas positivas a este composto, enquanto que, moscas não expostas ao odor antes dos testes, apresentaram aversão ao mentol.

As informações obtidas na fase imatura também poderiam ser transmitidas ao adulto através da Hipótese do Legado Químico (Corbet, 1985), o qual prediz que compostos químicos presentes no ambiente de desenvolvimento larval, estariam presentes na hemolinfa dos insetos ou na

camada exterior da pupa. Esta hipótese foi confirmada por estudos realizados com parasitoides, demonstrando que a escolha do adulto é influenciada por compostos químicos presentes sobre o exoesqueleto do hospedeiro no qual o parasitoide se desenvolveu (Van Emden *et al.*, 1996; Storeck *et al.*, 2000).

Em relação a dípteros tefritídeos, alguns trabalhos foram realizados visando esclarecer a interferência da experiência prévia no comportamento de espécies desta família. Prokopy *et al.* (1998) constataram que *Rhagoletis pomonella* (Walsh, 1867) é capaz de associar a cor da folhagem com a presença de alimento. Joachim-Bravo *et al.* (2001b) observaram que *Ceratitis capitata* Wiedemann, 1824 (Diptera: Tephritidae), com experiência prévia no substrato contendo ácido cítrico, preferiram ovipositar neste, em relação ao que continha ácido málico.

A influência da experiência prévia com *Sargentia greggii* (Rutaceae), sobre a atratividade de fêmeas de *Anastrepha ludens* Loew, 1873 (Diptera: Tephritidae) em túnel-de-vento, foi comprovada por Robacker & Fraser (2002). Díaz-Fleischer & Aluja (2003) verificaram que fêmeas de *A. ludens* previamente expostas a substratos artificiais de oviposição visitaram significativamente mais os mesmos, quando comparadas as inexperientes. Resultados semelhantes foram obtidos por Gregório *et al.* (2012), para *A. fraterculus*, os quais demonstraram que a experiência com frutos artificiais contendo polpa de guabiroba ou pêsego influencia a preferência das fêmeas.

Em relação à Tortricidae, são escassos os estudos que envolvam os processos de aprendizado. Neste sentido Pszczolkowski & Brown (2005)

constataram que o processo de seleção do hospedeiro, em lagartas neonatas de *Cydia pomonella* L., 1758 (Lepidoptera, Tortricidae), pode ser modificado por uma experiência de aprendizagem (com sacarose), a qual é adquirida com apenas três horas de exposição.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Criações

#### 3.1.1 *Anastrepha fraterculus*

Em todos os bioensaios foram utilizados insetos oriundos da criação estabelecida no Laboratório de Biologia, Ecologia e Controle Biológico de Insetos da Faculdade de Agronomia (UFRGS), a partir de frutos infestados, coletados na região metropolitana de Porto Alegre, RS.

O material coletado foi depositado sobre areia esterilizada, dentro de caixas plásticas cobertas com tecido voile, onde permaneceu até a formação dos pupários. A partir deste momento, a areia era periodicamente peneirada e os pupários transferidos para recipientes plásticos (50 mL), onde eram cobertos por areia esterilizada. Os adultos eram mantidos em gaiolas de armação de madeira, revestida com tecido voile (45 cm x 30 cm x 30 cm) (Figura 3) e recebiam água destilada, oferecida através de tiras de tecido da marca Spontex Resist<sup>®</sup> em recipientes de plástico (50 mL), com tampa perfurada. A dieta dos adultos era composta de açúcar, glúten de milho e levedura de cerveja (3:1:1) e vitamina E (adaptada de Jaldo *et al.*, 2001), disposta em placas de Petri (4 cm de diâmetro x 1 cm).

Como substrato de oviposição foram utilizados mamão papaya (*Carica papaya* L.), e substratos artificiais. O mamão foi oferecido às moscas

quando estas atingiam 12 dias de idade. O mesmo permanecia na gaiola por dois dias, e após este período substituído por outro. O fruto retirado era acondicionado sobre areia esterilizada em potes plásticos de 2 L, cobertos com voile, por 15 dias. Após este período a areia era peneirada e os pupários recolhidos e depositados em potes plásticos (50 ml), sobre areia esterilizada, onde permaneciam até a emergência. Este substrato foi utilizado apenas para o desenvolvimento dos insetos usados no teste de preferência por substrato de oviposição.



FIGURA 3. Gaiola de armação de madeira revestida com tecido voile com adultos de *Anastrepha fraterculus*.

O substrato artificial de oviposição foi constituído de um painel circular confeccionado com uma tela siliconada de cor preta, presa na parte inferior de uma placa de Petri plástica ( $\varnothing$  9,5 cm) cujo fundo foi retirado (Figura 4).

Este substrato ficava posicionado na parte superior da gaiola, pelo lado externo, contendo uma lâmina de 0,5 cm de água, onde as moscas depositavam os ovos. Diariamente, a água do substrato era retirada e os ovos colocados sobre papel filtro, em placas de Petri de vidro ( $\varnothing$  4 cm). Estas placas eram embaladas em papel jornal, para manter os ovos no escuro, e mantidas em câmara climatizada por 48 horas.

Após este procedimento, o papel filtro juntamente com os ovos era colocado diretamente sobre a dieta das larvas, composta de cenoura crua descascada (125 g), cenoura cozida descascada (125 g), açúcar cristal (125 g), levedo de cerveja (25 g), água (175 mL), Nipagin® (metilparabeno) (1,1 g), ácido cítrico (3,6 g), benzoato de sódio (1,1 g) e sulfato de estreptomicina (0,5 g) (Téran, 1977). Os ingredientes eram misturados em liquidificador e posteriormente, a dieta era distribuída em bandejas quadradas de poliestireno expandido (15 cm X 15 cm X 2 cm). Estas eram tampadas com outra similar, enroladas com jornal e acondicionadas em câmara climatizada onde permaneciam no escuro por dez dias. Decorrido este período, eram abertas e colocadas em bandejas de plástico (40 X 20 X 5 cm), contendo no fundo uma camada de 1 cm de areia, cobertas com tecido tipo voile e mantidas na câmara. Após 12 dias, a areia era peneirada para retirada dos pupários, os quais eram depositados em recipientes plásticos (50 mL) com areia esterilizada, onde permaneciam até a emergência.

Todos os insetos foram criados e testados em câmara climatizada, com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  UR e fotofase de 14 horas.

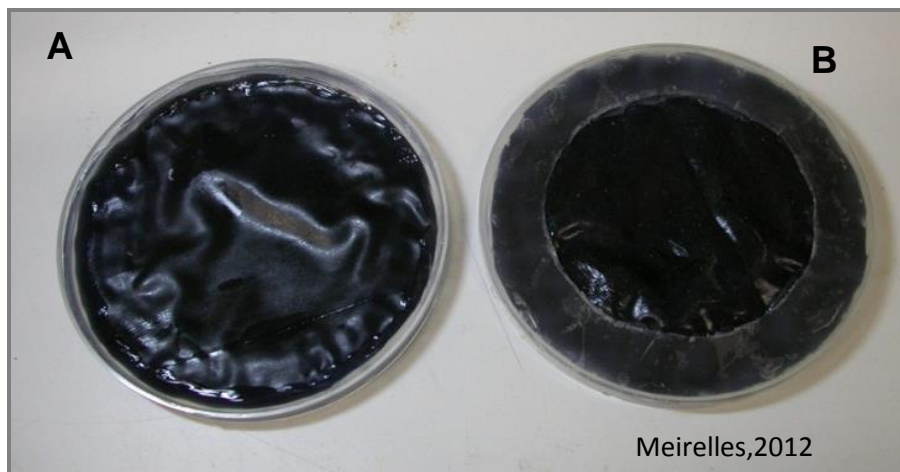


FIGURA 4. Substrato de oviposição para *Anastrepha fraterculus*: placa aberta, vista interna (A) e vista inferior externa (B).

### 3.1.2 *Grapholita molesta*

A criação foi estabelecida no Laboratório de Biologia, Ecologia e Controle Biológico de Insetos da Faculdade de Agronomia (UFRGS), a partir de crisálidas provenientes do Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho (CNPUV).

As crisálidas eram transferidas para gaiolas confeccionadas com garrafas PET de 2 L, sendo o fundo removido e substituído por tecido voile afixado com atilho. A extremidade apical da garrafa era obstruída com algodão embebido em solução de mel a 15% e Nipagin® (metilparabeno) a 0,15%, fixado com a tampa da garrafa (Figura 5A). A cada 48 horas, as gaiolas eram esvaziadas e as posturas desinfectadas com solução de hipoclorito de sódio a 15% (2 % de cloro ativo).

Porções das garrafas PET contendo os ovos eram dispostas, em recipientes plásticos de 500 mL, sobre a dieta artificial (Figura 5B), seguindo a metodologia proposta por Arioli *et al.* (2007). Quando as lagartas atingiam o último instar, os recipientes plásticos eram cobertos com gaze hidrófila (13

firos) para a crisalidação. Posteriormente, estas eram removidas da gaze, desinfectadas com solução de água sanitária a 15% (2 % de cloro ativo). Os insetos foram mantidos e testados em sala climatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $60 \pm 10\%$  U.R.; fotofase de 16 horas).

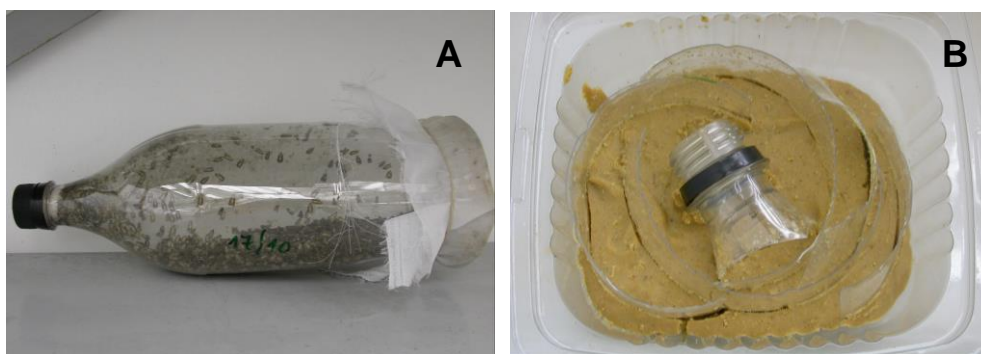


FIGURA 5. Criação de *Grapholita molesta*: A) gaiola de criação com insetos adultos e B) recortes da gaiola de criação sobre dieta artificial.

### 3.2 Bioensaios

#### 3.2.1 *Anastrepha fraterculus*

##### 3.2.1.1 Preferência por substrato de oviposição

Foram utilizados como substratos de oviposição frutos artificiais confeccionados com polpas de amora preta [*Rubus* sp. (Rosaceae)], goiaba [*Psidium guajava* L. (Myrtaceae)], manga [*Mangifera indica* L. (Anacardiaceae)], mamão [*Carica* sp. (Caricaceae)] ou pêssigo [(*Prunus persica* L. (Rosaceae)], da marca Maisfruta<sup>®</sup>.

Fêmeas inexperientes (sem contato com frutos artificiais), com idade entre 15 e 20 dias, acasaladas, foram confinadas em arena plástica de 30 cm de diâmetro e 17 cm de altura, contendo água destilada, dieta artificial e cinco substratos de oviposição, confeccionados com água, ágar e a polpa de cada um dos frutos descritos anteriormente (adaptado de Salles, 1992), bem



como, um contendo apenas água e ágar (controle). Após 24 horas de exposição, foram contabilizados os ovos depositados em cada um dos substratos. Realizou-se 10 repetições com grupos de 12 fêmeas. Os tratamentos foram rotacionados na arena após cada repetição.

### **3.2.1.2 Avaliação do tempo de experiência e retenção de memória**

Foram utilizadas fêmeas acasaladas com idade entre 15 e 25 dias, inexperientes (sem contato prévio com frutos artificiais) e experientes (com contato prévio). Estas últimas foram previamente expostas a frutos artificiais confeccionados a base de ágar e água com polpa de amora ou de goiaba, sendo a escolha das polpas baseada nos resultados obtidos no item 3.2.1.1. Consideraram-se como experientes, as fêmeas que foram previamente expostas aos substratos por 48 e 72 horas, através do seguinte procedimento, realizado para cada um dos períodos: a um grupo de insetos foi oferecido um fruto artificial contendo polpa de amora, a outro, um com polpa de goiaba, já o terceiro, não teve contato prévio com os substratos de oviposição, sendo considerado inexperiente. Para a aquisição de experiência, os insetos foram confinados, cinco a cinco, em gaiolas plásticas de 16 cm de diâmetro. Imediatamente após este período, as fêmeas de cada grupo foram individualmente testadas em arenas confeccionadas com caixas Gerbox (11 X 11 X.3,5 cm) cobertas com filme PVC. As fêmeas foram aclimatadas por 30 minutos, na arena de testes, antes do início dos ensaios.

O comportamento de cada inseto foi observado por 30 minutos e registrado com auxílio do Software Etholog 2.2 (Ottoni, 2000). As categorias comportamentais avaliadas foram: inspeção (caminhando sobre o fruto ou

tocando sua superfície com o aparelho bucal); arraste (arrastando o ovipositor na superfície do fruto); punctura (introduzindo o acúleo no fruto) e repouso (parada sobre o fruto sem tocá-lo com aparelho bucal).

Após o período de observação os substratos de oviposição foram substituídos e as fêmeas permaneceram nas arenas de teste individualmente expostas aos frutos artificiais (um de amora e outro de goiaba) por 24 horas, a fim de avaliar sua oviposição. Foram realizadas 25 repetições para cada um dos tratamentos.

Para verificar a retenção de memória, fêmeas foram submetidas a um período de experiência de 72 horas, através do seguinte procedimento: a um grupo de insetos foi oferecido um fruto artificial contendo polpa de amora e o outro não teve contato prévio com os substratos de oviposição, sendo considerado inexperiente. Os experimentos comportamentais foram conduzidos conforme metodologia já descrita neste item. Neste bioensaio, no entanto, não foi registrado o número de ovos depositados pelas moscas. Os testes foram conduzidos após intervalos de 48, 72 e 96 horas sem contato com os substratos, sendo realizadas 20 repetições para cada um dos tratamentos.

### **3.2.1.3 Efeito da exposição prévia ao óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) sobre a escolha do substrato de oviposição**

#### **3.2.1.3.1 Condicionamento na fase larval**

Grupos de larvas de *A. fraterculus* com até um dia de vida foram expostos aos seguintes tratamentos: a) 1 mL de óleo essencial de capim-limão (0,5  $\mu$ L/mL de acetona) em papel filtro; b) apenas papel filtro. Os

tratamentos foram oferecidos juntamente com a dieta, durante todo o período de desenvolvimento larval. O óleo essencial foi aplicado sobre um círculo de papel filtro (3,5 cm de diâmetro, o qual foi colocado sobre a dieta artificial das larvas, dentro de placas (4 cm de diâmetro X 1 cm de altura). Na dieta, os papéis filtro foram trocados diariamente, durante o período de condicionamento.

Antes da formação dos pupários, aproximadamente 12 dias após a eclosão, os insetos foram transferidos para recipientes de plástico (50 mL), com areia esterilizada onde permaneceram até a emergência. A partir deste momento foram transferidas para gaiolas plásticas (30 x 20 x 15 cm) contendo água e alimento. Quando as fêmeas atingiram 15 dias de idade, tanto as expostas ao capim limão na fase larval quanto as não expostas, foram confinadas quatro a quatro, em gaiolas plásticas de 16 cm de diâmetro e 7 cm de altura. A estas foram oferecidos frutos artificiais, um confeccionado com ágar, água e óleo essencial de capim-limão (1 mL de óleo / 60 mL de água), e outro composto por água e ágar (controle). As moscas permaneceram expostas aos tratamentos por 24 horas. A memória olfativa após a metamorfose foi avaliada após este período, através do número médio de ovos registrados nos substratos de oviposição.

#### **3.2.1.3.2 Condicionamento na fase adulta**

Foram utilizados dois grupos de moscas com 28 casais cada, os quais foram confinados, quatro a quatro, em gaiolas plásticas de 16 cm de diâmetro. Um dos grupos foi exposto por 72 horas, no início da fase adulta (até 24 horas após emergência), a um fruto artificial confeccionado com ágar, água e óleo essencial de capim-limão (1 mL de solução (0,5 µL de

óleo/mL de água), ou apenas por água e ágar (controle). O outro grupo foi exposto, quando atingiu 15 dias de idade, aos mesmos tratamentos pelo mesmo período. Quando atingiram 18 dias de idade, as fêmeas foram expostas a dois substratos artificiais de oviposição, um contendo o óleo essencial e outro composto apenas por água e ágar. A memória foi avaliada através do número médio de ovos depositados nos substratos referentes a cada tratamento.

### **3.2.2 *Grapholita molesta***

#### **3.2.2.1 Aprendizagem em lagartas**

Foram utilizadas lagartas de 5<sup>o</sup> instar expostas aos tratamentos por a) 48 horas no início da fase larval; b) submetidas aos odores desde a eclosão até 10 a 12 dias de idade (período em que apresentavam coloração rosada) ou c) sobre a ação dos mesmos por 24 horas, somente no final do último instar larval (a partir do momento que saíam da dieta em direção à gaze hidrófila). Todos imaturos avaliados tinham de entre 9 e 11 mm de comprimento.

Os insetos foram expostos aos seguintes tratamentos, impregnados em porções (1,5 X 4 cm) de papel filtro: a) óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) 1 mL (0,5 µL/mL) da marca Tecpon (T1); b) 1 mL de acetona (solvente) (T2) e c) papel filtro, sem adição de odor (T3). Após a evaporação do solvente (2 minutos), os papeis foram colocados individualmente dentro de bandejas de criação, sobre a dieta artificial das lagartas, sendo, inclusive em T3, trocados diariamente.

As lagartas foram transferidas para recipientes com dieta livre dos odores do óleo essencial e do solvente, 24 horas antes do início dos testes de olfatometria. As respostas quimiotáxicas das lagartas foram avaliadas através da utilização de olfatômetro Y de dupla escolha, com diâmetro de 2 cm, arena inicial de 10 cm, bifurcada em dois “braços” de 8 cm (metodologia adaptada de Gökçe *et al.*, 2005). O fluxo de ar, previamente filtrado com carvão ativo, era conduzido para dentro do sistema com o auxílio de um propulsor conectado a um fluxímetro, a uma taxa de 0,8 L/min. O olfatômetro era invertido (rotação de 180°), a cada três repetições e a cada seis, era lavado com sabão neutro e etanol, e seco em estufa de esterilização a 150 °C. Após este procedimento, os papéis filtro eram renovados. As lagartas expostas ao óleo, assim como aquelas sem contato com o mesmo, foram submetidas a testes de escolha, confrontando sempre a acetona com o odor do óleo. Cada inseto era observado por até 10 minutos. Os papéis utilizados no olfatômetro foram impregnados com 100 µL tanto do solvente puro, quanto do óleo (5 µL/mL) (adaptado de Carlsson *et al.*, 1999). Este protocolo experimental foi também adotado para os bioensaios de olfatometria, referentes aos itens 3.2.2.2 e 3.2.2.3. Foram avaliadas de 32 a 40 lagartas por tratamento.

### **3.2.2.2 Memória olfativa após a metamorfose**

Foram utilizados neste experimento três grupos de fêmeas: a) oriundos de lagartas expostas aos odores de óleo essencial de capim-limão ou acetona por todo período de desenvolvimento; b) submetidas aos mesmos tratamentos por 24 horas antes dos testes e c) insetos

inexperientes, conforme metodologia descrita no item 3.2.2.1. Após o período de condicionamento, as lagartas foram separadas em tubos de ensaio contendo dieta artificial, onde permaneceram até a formação das crisálidas. A partir deste momento, eram transferidas para recipientes plásticos (50 mL), onde permaneceram até a emergência. As respostas quimiotáticas de adultos, com idade entre 48 e 72 horas, foram avaliadas em olfatômetro Y. Foram avaliados de 21 a 41 adultos por tratamento.

### **3.2.2.3 Memória olfativa adquirida na fase adulta**

Insetos de ambos os sexos, com até 24 horas após a emergência, foram individualizados em recipientes plásticos de 50 mL, e expostos aos tratamentos, conforme metodologia descrita no item 3.2.2.1. Após a evaporação do solvente, 2 minutos, os papeis foram colocados, individualmente dentro dos recipientes, onde os insetos estavam confinados, sendo cada papel filtro substituído após 24 horas. Imediatamente após o período de condicionamento, os insetos foram testados em olfatômetro Y. Avaliou-se de 33 a 40 insetos por tratamento.

### 3.2.2.4 Aprendizagem associativa

Os ensaios referentes a este item foram realizados no laboratório de eletrotécnica da Fundação Dr. Liberato Salzano Vieira da Cunha, sob condições controladas ( $25 \pm 1$  °C e  $70 \pm 10\%$  UR).

O equipamento utilizado para o condicionamento dos insetos era composto por um circuito impresso em papel fotográfico, confeccionado no Software Pad2Pad. Este material foi depositado sobre uma placa com substrato de fenolite (polímero com camada de cobre - 105 mm X 105 mm X 5 mm), na qual foi realizada a transferência térmica deste circuito. Após este procedimento, foi efetuada a corrosão da placa em uma solução de Cloreto de Ferro III – perclorato de ferro, diluído em água (3:10). O tempo de corrosão foi de aproximadamente 10 minutos. O circuito utilizado era composto por uma trilha condutiva em zig-zag, com 2 mm de distância entre trilhas, por onde circulava a corrente elétrica do circuito (polo positivo), e o restante da placa, compondo o polo negativo. Esta placa de circuito impresso (Figura 6A) foi conectada a uma matriz de contatos (*proto-board*) (Figura 6B) constituída de material plástico, cobrindo trilhas metálicas condutivas. A esta matriz foram acoplados dois resistores de 10k ohms (com tolerância de 5%) associados em série (divisor de tensão) sendo um deles variável (potenciômetro) e o outro fixo para a fim de controlar a corrente elétrica que insidia sobre as lagartas. A placa de circuito impresso foi ligada em paralelo com o resistor fixo, sendo os resistores submetidos à tensão elétrica de 30 Volts em corrente contínua. O circuito foi ligado a uma fonte de alimentação elétrica de bancada digital MPC-3006D (Minipa) (Figura 6C ) responsável por fornecer a tensão elétrica contínua, onde era possível

controlar a corrente que circulava através das lagartas (18 Volts) e visualizar a corrente e tensão do circuito. Foi empregado multímetro digital UNI-T UT83, (Figura 6D) para efetuar as medições de tensão e corrente sobre a placa de circuito impresso, a qual foi depositada dentro de uma caixa Gerbox (110 mm X 110 mm X 35 mm), onde os insetos foram condicionados (arena de condicionamento).

Lagartas de 10 a 12 dias de idade (entre 9 e 11 mm de comprimento) sofreram processo de condicionamento em grupos de 10 indivíduos. Os insetos foram condicionados, utilizando o aparato descrito anteriormente. Alíquotas de Acetato de Etila (AE), na dose de 20  $\mu$ L foram pipetados e aplicados sobre recortes de papel filtro em forma de sanfona (20 mm x 15 mm) e estes introduzidos, na extremidade posterior de uma pipeta, Pasteur, (Figura 6E) a qual foi acoplada a uma bomba de vácuo (Figura 6F). A extremidade oposta da pipeta foi inserida em um orifício existente na tampa da arena, onde as lagartas estavam acondicionadas, a fim de liberar o odor sobre os insetos, os quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: a) 10 segundos ao odor de AE e mais 10 segundos ao AE + choque elétrico; b) 10 segundos de ar ambiente seguido de 10 segundos de choque; c) 20 segundos de odor de AE apenas; d) 20 segundos de ar ambiente apenas; e) 10 segundos de odor de AE seguido de 10 segundos de choque (adaptado de Blackiston *et al.*, 2008).



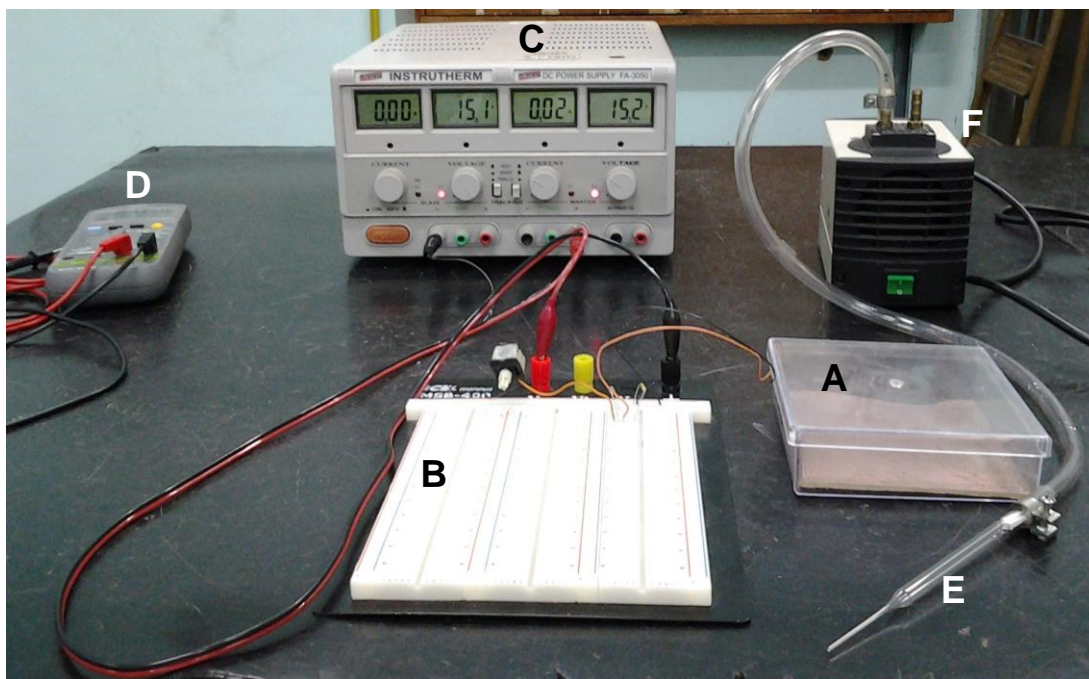


FIGURA 6. Equipamento utilizado para o condicionamento larval: A) circuito impresso dentro de caixa Gerbox; B) matriz de contatos; C) fonte de alimentação; D) multímetro; E) pipeta Pasteur; F) bomba de vácuo.

Este procedimento foi repetido com os mesmos grupos de lagartas por mais três vezes, com intervalos de 30 minutos, totalizando quatro sessões em um mesmo dia. Nos intervalos entre as sessões, os insetos foram mantidos na dieta de criação.

No dia seguinte ao processo de condicionamento os imaturos foram individualmente testados em olfatômetro Y de dupla escolha, com diâmetro de 2 cm, arena inicial de 10 cm, bifurcada em dois “braços” de 8 cm (metodologia adaptada de Gökçe *et al.*, 2005). Em um dos braços foi acoplado um recipiente de vidro com capacidade de 200 mL, onde foi introduzido um recorte de papel filtro em forma de sanfona (80 mm x 50 mm) impregnado com 100  $\mu$ L de AE. O fluxo de ar era conduzido para dentro do sistema com o auxílio de um propulsor conectado a um fluxímetro, a uma taxa de 0,8 L/min. O olfatômetro era rotacionado em 180°, a cada três

repetições e a cada seis, era lavado com sabão neutro e etanol, e seco em estufa de esterilização a 150 °C. Após este procedimento, o papel filtro era renovado.

Após os testes as lagartas foram separadas em bandejas de criação conforme seu tipo de condicionamento, onde permaneceram até a formação das crisálidas. Três dias após a emergência, os insetos foram novamente testados no mesmo olfatômetro. O comportamento dos insetos foi observado por até 10 minutos. Foram avaliadas de 30 a 35 lagartas e de 23 a 29 adultos por tratamento. Os testes foram realizados na escotofase, com o auxílio de uma luz vermelha (60 W, luminância igual a 0,518 klx).

### **3.3 Análise dos Dados**

Os dados de preferência por substratos de oviposição foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, os de aprendizagem e memória de *A. fraterculus* analisados pelo teste de Mann-Whitney. Os bioensaios referentes aos testes de olfatometria de *G. molesta*, foram analisados pelo Qui-quadrado. Em todos os experimentos foi respeitado um intervalo de confiança no nível 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 *Anastrepha fraterculus*

#### 4.1.1 Preferência por substratos de oviposição

O número médio de ovos depositados nos substratos contendo polpa de amora ( $23,9 \pm 3,4$ ) foi significativamente maior, quando comparado ao substrato controle ( $1 \pm 1,9$ ) ( $H = 22,91$ ,  $gl = 5$ ,  $P < 0,0001$ ) e aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ). Os substratos compostos por polpa de goiaba e pêsego não diferiram significativamente do controle, nem entre si ( $P > 0,05$ ) (Figura 7).

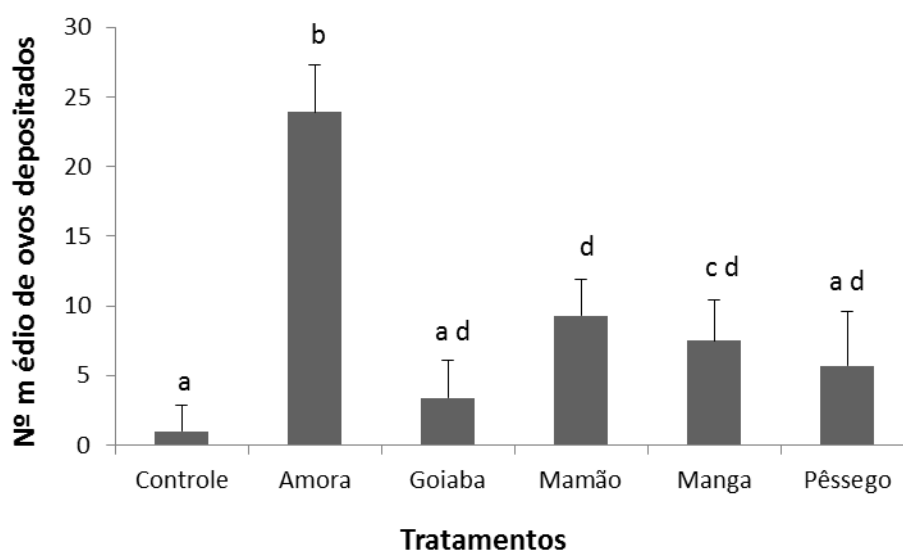


FIGURA 7. Número médio de ovos depositados ( $\pm$  EP) por *Anastrepha fraterculus* em frutos artificiais contendo diferentes polpas (Tratamentos). Barras seguidas por letras distintas diferem entre si (Kruskal-Wallis,  $P < 0,05$ ).

A escolha do hospedeiro, antes da oviposição, é fundamental para a sobrevivência e sucesso da prole, já que as larvas possuem pouca mobilidade e dependem dos recursos nutritivos selecionados pelas fêmeas no momento da postura (Singer, 1986; Renwick, 1989). Insetos polívoros, apesar da possibilidade de oviposição em vários hospedeiros diferentes, não selecionam da mesma forma todas as espécies (West & Cunningham, 2002), sendo algumas mais atrativas em relação a outras (Joachim-Bravo & Silva-Neto, 2004). No presente trabalho observou-se que fêmeas de *A. fraterculus* preferiram substratos de oviposição contendo polpa de amora em relação às demais. Comportamento semelhante foi constatado em *C. capitata* por Joachim-Bravo *et al.* (2001a), os quais observaram que fêmeas preferiram ovipositar em mamão papaia, em detrimento a banana, maçã e laranja.

Durante processo de escolha, a decisão da fêmea por aceitar ou rejeitar uma planta é influenciada por características físicas e químicas do provável hospedeiro, no entanto características físicas são geralmente inespecíficas, uma vez que, variam até dentro da mesma espécie (Bernays & Chapman, 1994). Gregório *et al.* (2010), constataram em laboratório, que a cor dos substratos artificiais de oviposição, confeccionados a base de água, ágar e corante, não afeta o número médio de ovos depositados nestes substratos por *A. fraterculus*.

Compostos químicos presentes na planta hospedeira parecem ser o fator determinante que permite as fêmeas discriminar diferenças e fornecem informações relacionadas ao estágio fenológico, status nutricional e a presença de substância de defesa das plantas (Jones 1991, Bernays &

Chapman, 1994; Schoonhoven *et al.*, 2005). Desta forma, no presente estudo, a escolha do substrato artificial contendo polpa de amora pode estar relacionada à maior compatibilidade química entre o substrato e os receptores olfativos (antenas) e/ou gustativos (aparelho bucal e ovipositor), presentes no corpo dos insetos (Atkins, 1980; Boeckh, 1984; Faucheux, 1991). Esta compatibilidade pode ter sido responsável por direcionar a escolha de fêmeas através de pistas químicas, que indicaram uma possível qualidade nutricional do substrato que seria mais adequado para o desenvolvimento da prole.

#### **4.1.2 Avaliação do tempo de experiência e retenção de memória**

O número médio de puncturas observado em substratos de oviposição confeccionados com polpas de amora e goiaba, não diferiu estatisticamente quando ambos foram expostos a fêmeas inexperientes ( $U = 296,5$ ,  $P = 0,75$ ). O mesmo foi observado quando as fêmeas passaram por um período de experiência de 48 ou 72 horas com frutos artificiais contendo polpa de goiaba ( $P > 0,05$ ) (Figura 8). No entanto, aquelas expostas, em ambos os períodos, ao substrato de oviposição contendo polpa de amora, preferiram puncturar nestes substratos quando comparados aos que continham goiaba ( $P < 0,05$ ) (Figura 8). O tempo de exposição prévia, não influenciou a preferência das fêmeas ( $P > 0,05$ ). Assim como não foram observadas diferenças significativas relacionadas às frequências dos demais atos comportamentais (inspeção, repouso e arraste) de *A. fraterculus* em frutos artificiais de amora ou goiaba, independentemente do tempo de exposição ou do fruto. ( $P > 0,05$ ).

Em relação ao número médio de ovos depositados, fêmeas inexperientes, assim como as previamente expostas por 48 ou 72 horas a frutos contendo polpa de goiaba não apresentaram preferência pelos substratos ( $P > 0,05$ ) (Figura 9). No entanto, fêmeas expostas por 48 ou 72 horas, antes dos testes, a frutos artificiais contendo polpa de amora, preferiram ovipositar nestes, em comparação aos que continham polpa de goiaba ( $U = 60,5$ ,  $P < 0,0001$ ;  $U = 73$ ,  $P < 0,0001$ , respectivamente) (Figura 9).

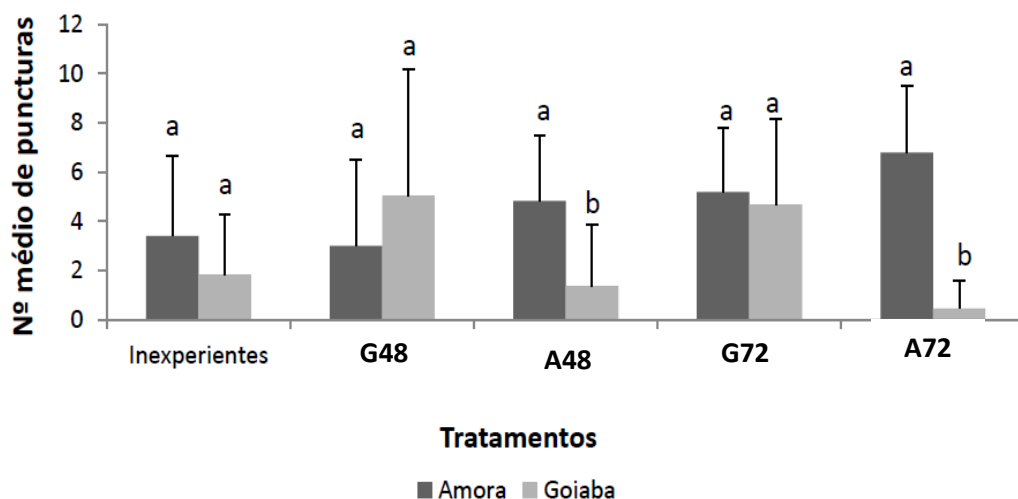


FIGURA 8. Número médio ( $\pm$  EP) de puncturas realizadas por fêmeas de *Anastrepha fraterculus* em frutos artificiais de goiaba (G) e amora (A), quando previamente expostas aos mesmos por 48 horas (A48 e G48) e 72 horas (A72 e G72) ou quando não houve exposição prévia aos mesmos (inexperientes) ( $n = 25$ ). Barras seguidas por letras diferentes, nas colunas dentro de um mesmo tratamento, diferem entre si (Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ).

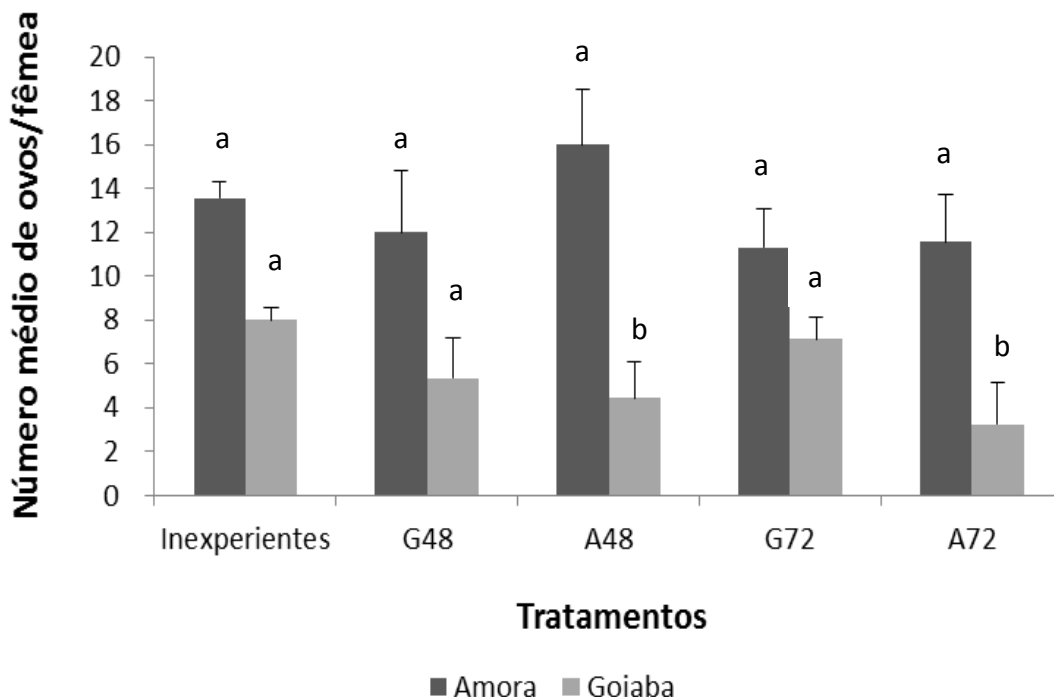


FIGURA 9. Número médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por fêmea de *Anastrepha fraterculus* em frutos artificiais de goiaba (G) e amora (A), quando previamente expostas aos mesmos por 48 (A48 e G48) e 72 horas (A72 e G72) ou quando não houve exposição prévia aos mesmos (inexperientes) ( $n = 25$ ). Barras seguidas por letras diferentes, nas colunas dentro de um mesmo tratamento, diferem entre si (Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ).

Fêmeas expostas por 72 horas a frutos artificiais contendo polpa de amora e testadas após o intervalos de 48 ou 72 horas, sem contato com os substratos, preferiram puncturar nestes em detrimento aos compostos por polpa de goiaba ( $U = 93,5$ ;  $P = 0,0005$ ;  $U = 2.8538$ ;  $P = 0,0043$ , respectivamente) (Figura 9). Fêmeas inexperientes, assim como as testadas após intervalo de 96 horas, não apresentaram preferência por nenhum dos tratamentos ( $P > 0,05$ ) (Figura 10).

Estes resultados evidenciam que fêmeas de *A. fraterculus*, quando expostas por 72 horas a frutos confeccionados com polpa de amora, mantêm a memória por, pelo menos, 72 horas. Estes dados suportam a

hipótese do novo princípio de Hopkins, o qual enfatiza a importância da experiência prévia na fase adulta dos insetos sobre a escolha do hospedeiro (Jaenike, 1983).

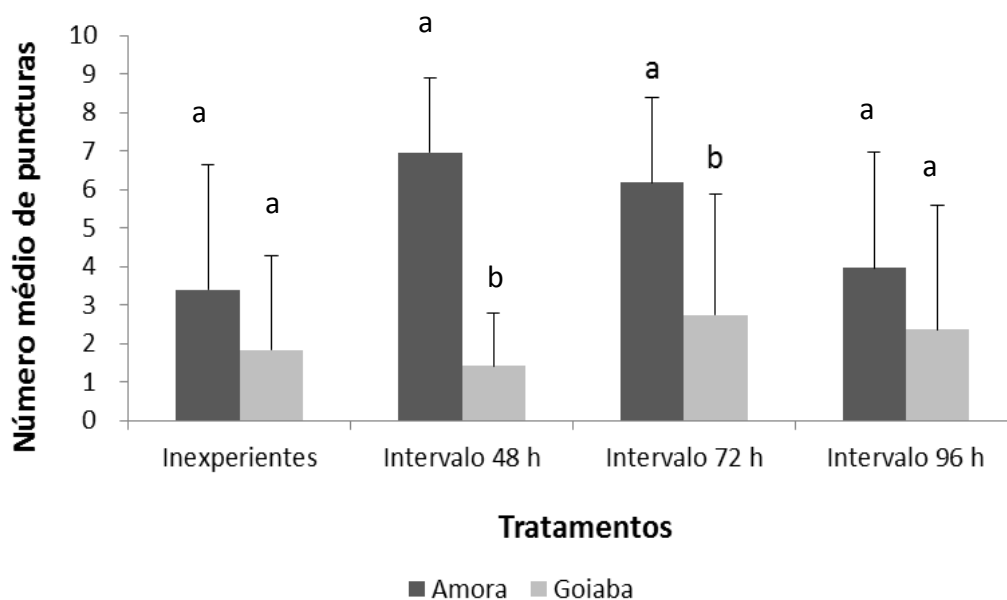


FIGURA 10. Número médio ( $\pm$  EP) de puncturas realizadas por fêmea de *Anastrepha fraterculus* em frutos artificiais com polpa de amora e goiaba, quando não tiveram contato com os frutos (inexperientes) ou quando foram previamente expostas a frutos artificiais contendo polpa de amora por 72 horas e testados após 48, 72 e 96 horas ( $n = 20$ ). Barras seguidas por letras diferentes, nas colunas dentro de um mesmo tratamento, diferem entre si (Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ).

Assim como no presente estudo, Gregório *et al.*(2012) também avaliaram a influência da experiência prévia com substratos artificiais de oviposição sobre o comportamento de *A. fraterculus* e verificaram que a exposição prévia a frutos confeccionados à base de água, ágar e polpa de guabiroba ou pêssigo, incrementa o percentual de fêmeas que exibem os comportamentos de arraste e punctura sobre estes substratos.



Joaquim-Bravo *et al.* (2001b), também avaliaram a influência da experiência no comportamento de oviposição de Tephritidae e constataram que moscas da espécie *C. capitata*, quando inexperientes, preferiram ovipositar em substratos contendo ácido cítrico, em detrimento dos que continham ácido málico. No entanto, segundo os autores, este comportamento foi modificado com a exposição prévia ao ácido málico, sendo que neste caso, as fêmeas não demonstraram preferência por nenhum dos substratos. Já, Leal & Zucoloto (2008), constataram que o contato prévio com substratos artificiais contendo sacarose, aumenta o número médio de ovos depositados por *Anastrepha obliqua* Macquart, 1835(Diptera: Tephritidae), naqueles que contem este componente. Díaz-Fleischer & Aluja (2003), assim como neste estudo, também avaliaram a influência da experiência prévia a substratos artificiais de oviposição confeccionados com ágar. Segundo os autores, fêmeas de *A. ludens* experientes visitaram mais o hospedeiro, ao qual foram previamente expostas, do que as inexperientes.

Barron & Corbet (2000), assim como no presente estudo, também avaliaram a aprendizagem em dípteros adultos e constataram que a exposição de *Drosophila melanogaster*, por 24 horas ao odor de mentol, levou a indução de respostas quimiotáticas positivas dos insetos a este odor. Além disso, os autores mencionam que a magnitude da resposta aumenta com uma maior exposição ao estímulo e sugerem que esta mudança induzida pelo mentol não persiste por mais de uma hora após a remoção do odor.

Os resultados deste trabalho demonstram que fêmeas de *A. fraterculus* são capazes de aprender através de um processo não associativo e de manter sua memória por, pelo menos 72 horas. Esta aprendizagem resultou em uma alteração de escolha dos sítios de oviposição, evidenciando a flexibilidade comportamental da espécie.

De acordo com Bernays (1995), a experiência prévia pode contribuir para uma busca mais eficiente de recursos e levar a uma menor exposição a situações de risco. Uma espécie que apresenta alta flexibilidade comportamental tende a ter maior probabilidade de se ajustar a uma nova condição do meio, como a presença de um novo predador ou a oferta de um novo recurso (Sugayama & Malavasi, 2000). Além disso, um organismo capaz de relembrar uma estratégia que lhe confere algum benefício estará levando vantagem sobre aqueles que não são capazes de fazer o mesmo (Oliveira, 2007). Esta vantagem pode exercer pressão seletiva positiva sobre os indivíduos que apresentam tal característica, permitindo que estes transmitam seus genes para as próximas gerações (Oliveira, 2007).

#### **4.1.3 Efeito da exposição prévia ao óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) sobre a escolha do substrato de oviposição**

##### **4.1.3.1 Condicionamento na fase larval**

Moscas oriundas de larvas inexperientes depositaram significativamente mais ovos no substrato controle (água e ágar), quando comparado ao que continha o óleo essencial ( $U= 273$ ,  $P= 0,009$ ). No entanto fêmeas que tiveram origem de larvas expostas ao odor do óleo de capim-

limão não apresentaram preferência por nenhum dos substratos de oviposição ( $U = 401$ ,  $P = 0,47$ ) (Figura 11).

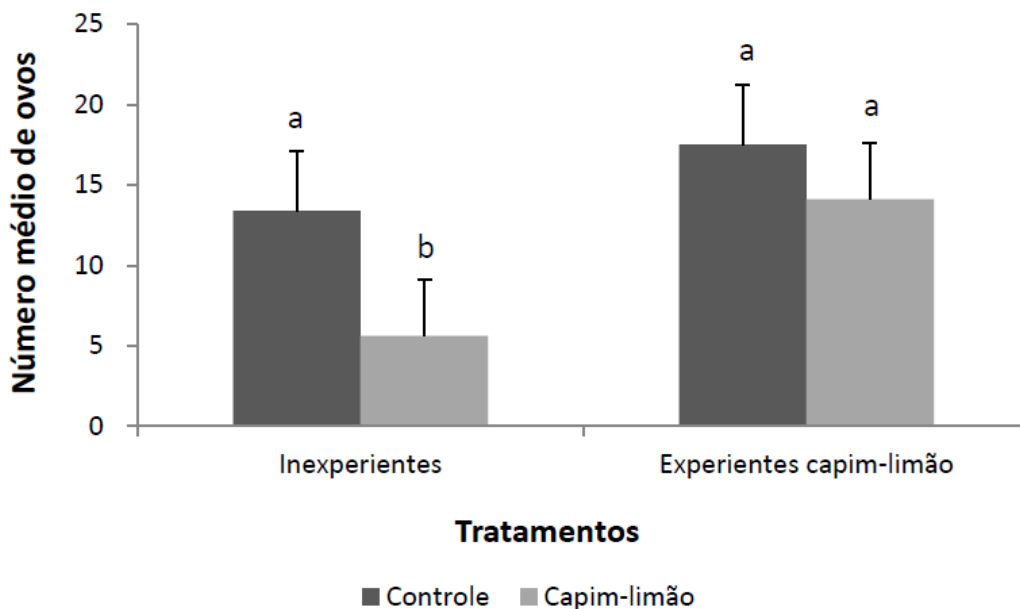


FIGURA 11. Número médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por fêmeas de *Anastrepha fraterculus*, em frutos artificiais contendo óleo essencial de capim-limão ou controle (livre do odor) oriundas de lagartas expostas por todo período de desenvolvimento ao odor do óleo essencial ou inexperientes. Barras seguidas por letras diferentes, nas colunas dentro de um mesmo tratamento, diferem entre si (Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ).

#### 4.1.3.2 Condicionamento na fase adulta

Fêmeas inexperientes depositaram significativamente mais ovos no substrato composto por água e ágar (controle), quando comparado ao confeccionado com óleo essencial ( $U = 111,5$ ,  $P < 0,0001$ ). Respostas semelhantes foram obtidas quando as fêmeas foram previamente expostas ao substrato controle no início da fase adulta, assim como aos 15 dias de idade ( $U = 273$   $P = 0,009$ ;  $U = 161,5$   $P < 0,0001$ , respectivamente). Já, moscas expostas a frutos artificiais contendo óleo de capim-limão por 72 horas, tanto

no primeiro dia de vida adulta, quanto aos 15 dias de idade, não apresentaram preferência por nenhum dos tratamentos ( $P > 0,05$ ) (Figura 12A e B).

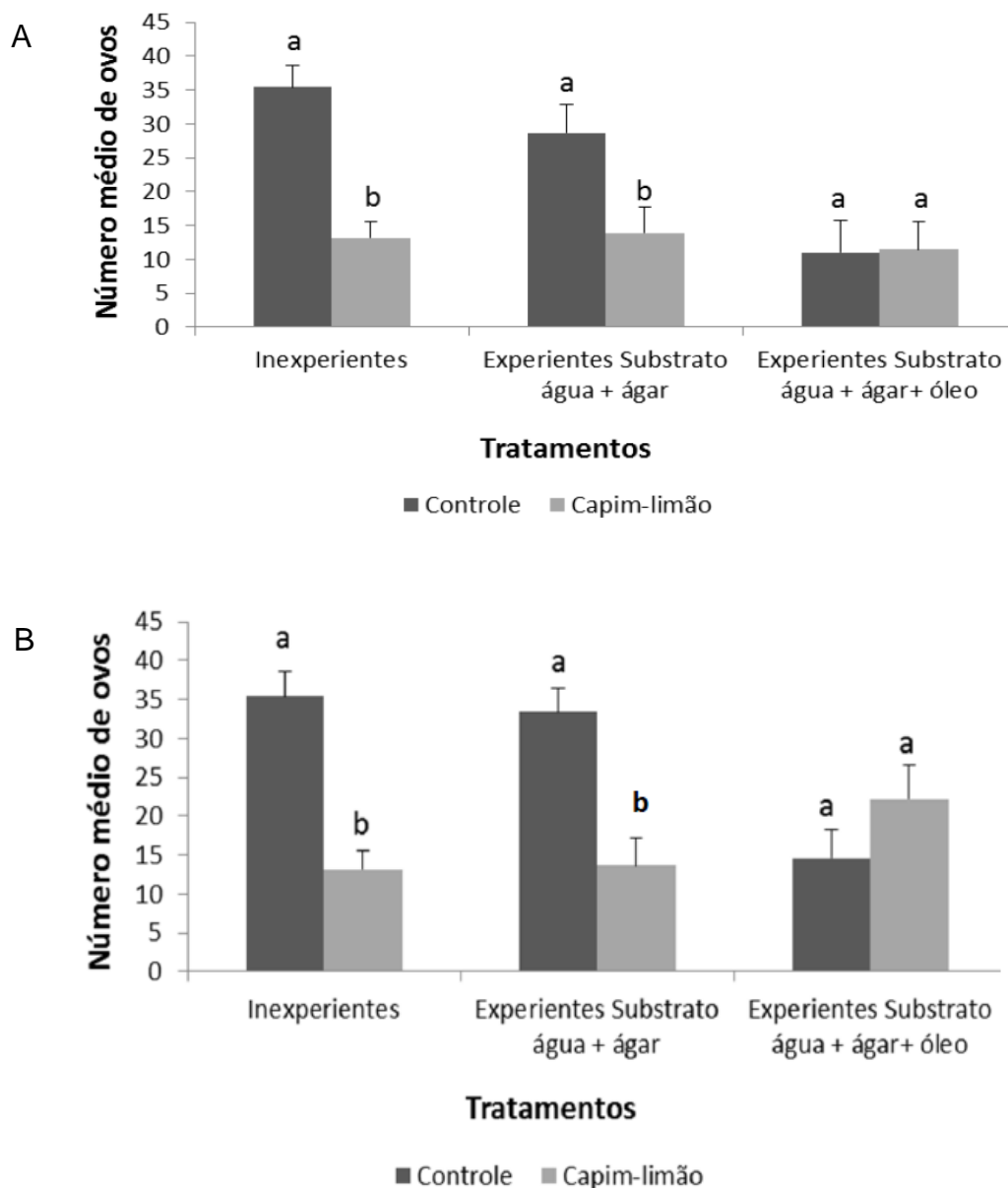


FIGURA 12. Número médio ( $\pm$  EP) de ovos depositados por fêmeas de *Anastrepha fraterculus*, em frutos artificiais contendo óleo essencial de capim-limão ou controle (água e ágar) quando previamente expostas ao odor do óleo essencial por 72 horas. A) no início da fase adulta; B) aos 15 dias de idade; ou inexperientes. Barras seguidas por letras diferentes, nas colunas dentro de um mesmo tratamento, diferem entre si (Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ).

Neste estudo foi avaliado o efeito do condicionamento na preferência de oviposição de *A. fraterculus* em três diferentes situações: insetos condicionados na fase larval; condicionados no início da fase adulta; e aos 15 dias de idade. Em todas estas situações, o condicionamento resultou em alterações na escolha do substrato de oviposição, demonstrando que *A. fraterculus* é capaz de aprender quando exposta ao odor de uma planta não hospedeira, e utilizar esta informação durante o processo de escolha do substrato de oviposição.

Assim como no presente trabalho, Shikano e Ismam (2009) avaliaram a ação da experiência na fase larval sobre a escolha do substrato de oviposição e constataram que em *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), a exposição durante o quinto instar larval, ao látex de *Hoodia gordonii*, planta não hospedeira, refletiu na deterrência reduzida de oviposição a esta substância. No entanto, Joaquim-Bravo *et al.* 2001b, verificaram que a exposição de fêmeas de *C. capitata*, por três dias, a substratos contendo ácido málico não foi suficiente para inverter a preferência de oviposição de fêmeas desta espécie a favor deste ácido mas, assim como constatado neste estudo com o capim-limão, houve uma mudança de comportamento refletindo em uma ausência de preferência em relação a escolha entre tratamentos. De forma controversa, Videla *et al.* (2010) observaram que a exposição prévia tanto de larvas, quanto de adultos de *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae), não modificou a preferência de oviposição por *Vicia faba* L. (Fabaceae) ou *Beta vulgaris* var. *cicla* L. (Chenopodiaceae), tanto em laboratório quanto em experimentos a campo. Resultados similares foram reportados para

lepidopteros como *Heliconius erato* L., 1758 (Lepidoptera:Nymphalidae) (Kerpel & Moreira, 2005) e *Polygonia c-album* L., 1758 (Lepidoptera:Nymphalidae) (Janz *et al.* 2009).

Estudos que avaliam o efeito da experiência com odores de plantas não hospedeiras sobre a escolha do substrato de oviposição são raros. Liu *et al.* (2005), constataram que fêmeas de *Plutella xylostella* L.,1758 (Lepidoptera:Plutellidae) expostas durante ou após a emergência ao extrato de *Chrysanthemum morifolium* Ramat (Asteraceae) , planta não hospedeira da espécie, passam a ser atraídas por este odor e depositam significativamente mais ovos em plantas tratadas com o extrato, em comparação com as não tratadas, enquanto que fêmeas inexperientes são repelidas por este mesmo odor. Resultados semelhantes foram obtidos por Liu & Liu (2006) ao avaliar a ação de Neemix®, formulado derivado de *Azadiracta indica* A. Juss (Meliaceae) uma planta não hospedeira de *P. xylostella*, sobre as respostas de oviposição de fêmeas inexperientes ou expostas ao odor durante ou após a emergência.

Conforme Strambi *et al.* (1999), em insetos holometábolos, os circuitos neuronais dos adultos são formados durante a metamorfose, mas em alguns casos podem sofrer modificações após a emergência. Esta hipótese foi testada por Devaud *et al.* (2001) os quais evidenciaram que em *Drosophila* a experiência no início da fase adulta pode alterar tanto a estrutura quanto a funcionalidade das vias olfativas destes insetos. Estudos realizados com abelhas demonstraram que para estes insetos, a aquisição da memória está intimamente ligada a idade, indicando que os primeiros

dias da vida adulta parecem ser os mais suscetíveis a mudanças comportamentais (Arenas *et al.*, 2012).

Neste trabalho observamos a influência da exposição prévia ao odor de uma planta não hospedeira, capim-limão, sobre larvas e fêmeas de *A. fraterculus*, tanto no início da fase adulta, quanto aos 15 dias após a emergência, e constatamos alterações no comportamento de escolha do substrato de oviposição em todas as situações testadas, indicando que em *A. fraterculus* a memória olfativa pode ser adquirida em diferentes momentos da vida.

## **4.2 *Grapholita molesta***

### **4.2.1 Aprendizagem em lagartas**

Lagartas expostas por 48 horas após a eclosão, ao odor de acetona foram significativamente mais atraídas por este odor quando comparado ao óleo essencial ( $\chi^2 = 6,67, 13 \text{ gl} = 1, P = 0,02$ ). Respostas semelhantes foram observadas tanto para lagartas inexperientes ( $\chi^2 = 14,22, \text{ gl} = 1, P = 0,0004$ ), quanto para as previamente expostas ao capim-limão ( $\chi^2 = 13,067 \text{ gl} = 1, P = 0,0008$ ) (Figura 13), não evidenciando, desta forma alteração no comportamento quimiotático dos insetos.

Lagartas previamente expostas por 10 a 12 dias ininterruptos ao odor de acetona foram significativamente mais atraídas a este tratamento, quando comparado ao óleo essencial de capim-limão ( $\chi^2 = 25,13 \text{ gl} = 1, P < 0,0001$ ). Resultados similares foram obtidos para lagartas inexperientes ( $\chi^2 = 14,22, \text{ gl} = 1, P = 0,0004$ ) (Figura 14A). No entanto, insetos expostos ao odor do óleo essencial pelo mesmo período, não apresentaram preferência pelos

tratamentos ( $P = 1$ ) (Figura 14A) evidenciando, assim alterações no comportamento dos insetos.

Lagartas expostas por 24 horas, somente no final do último instar larval (em torno de 12 dias de idade), ao odor do óleo essencial de capim-limão responderam mais para este odor, quando comparado a acetona ( $\chi^2 = 11,65$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0,0016$ ) (Figura 14B). Lagartas inexperientes, assim como as expostas a acetona pelo mesmo período, foram mais atraídas por este odor, em relação ao óleo essencial ( $\chi^2 = 14,22$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0,0004$  e  $\chi^2 = 5,23$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0,04$ , respectivamente) (Figura 14B).

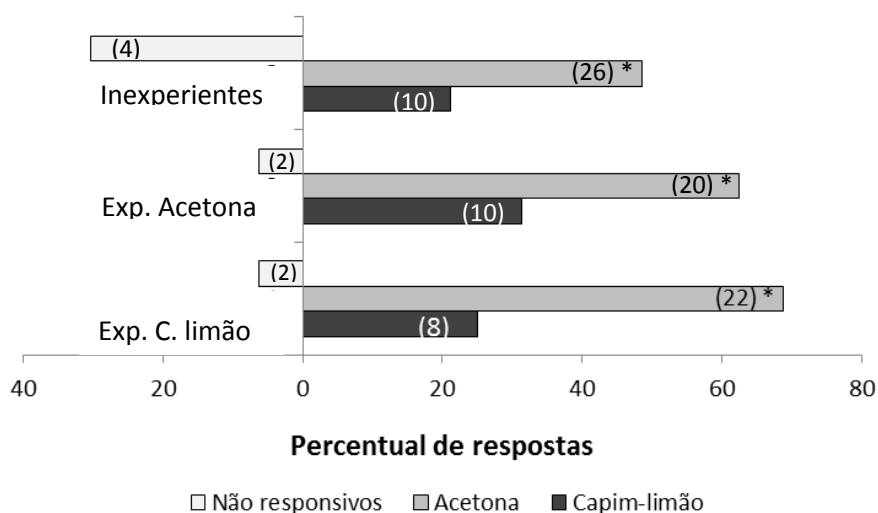


FIGURA 13. Números e percentuais de respostas quimiotáticas de lagartas de 5º instar de *Grapholita molesta* aos odores de óleo essencial de capim-limão e acetona, quando previamente expostas a estes por 48 horas após a eclosão e inexperientes (sem contato prévio com os odores), em olfatômetro Y. \* Diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Algarismos dentro das barras representam o número de insetos não responsivos ou que responderam aos tratamentos.



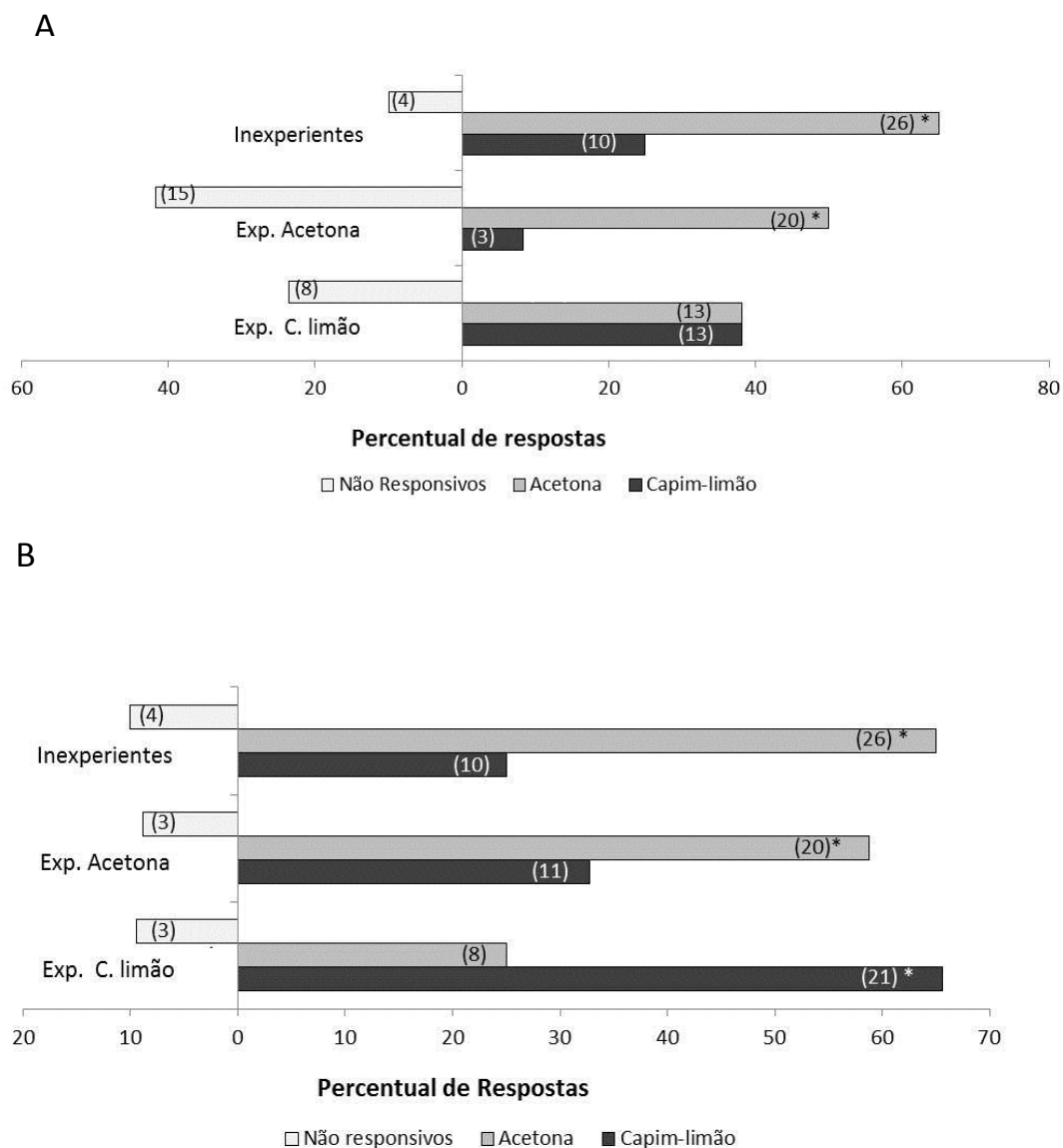


FIGURA 14. Números e percentuais de respostas quimiotáticas de lagartas de 5<sup>o</sup> instar de *Grapholita molesta* aos odores de óleo essencial de capim-limão e acetona, quando previamente expostas a estes por 10 a 12 dias (A) ou por 24 horas (B) e inexperientes (sem contato prévio com os odores), em olfatômetro Y. \* Diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Algarismos dentro das barras representam o número de insetos não responsivos ou que responderam aos tratamentos.

Os resultados deste estudo evidenciam a ocorrência de aprendizagem em lagartas de *G. molesta*, e assemelham-se aos obtidos por Carlisson *et al.* (1999), que comprovaram a influência da experiência na

orientação de *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. Segundo os autores, lagartas de terceiro instar, quando criadas em dieta artificial na presença de geraniol, são significativamente mais atraídas por este odor quando comparadas a inexperientes. Lagartas desta mesma espécie quando condicionadas com odor de hexanol associado a um estímulo positivo, frutose, mantêm a memória olfativa por apenas cinco minutos, no entanto quando o odor é pareado com um estímulo negativo, quinino, a memória é mantida por até 24 horas após o condicionamento (Salloum *et al.*, 2011).

Estudos realizados por Pszczolkowski & Brown (2005) demonstraram que lagartas neonatas de *C. pomonella* podem utilizar uma única experiência de aprendizagem na seleção e infestação do hospedeiro, podendo o processo de escolha do mesmo ser modificado com apenas três horas de condicionamento. Lagartas de quinto instar de *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), quando criadas em dieta contendo látex de *Hoodia gordonii* (Masson) Sweet ex Decne (Asclepiadaceae), apresentam deterrência reduzida de alimentação a este látex, quando comparadas a lagartas inexperientes (Akhtar *et al.*, 2009).

O presente estudo demonstrou que a experiência prévia com odor de óleo essencial de capim-limão altera as respostas quimiotáticas das lagartas de *G. molesta*. Esta alteração de comportamento pode estar relacionada ao fato das lagartas associarem o odor de óleo essencial de capim-limão a uma fonte de alimento. Esta suposição foi também levantada por Carlisson *et al.* (1999), para *S. littoralis*, em estudo avaliando a indução orientacional

desta espécie, através da exposição prévia das lagartas aos odores de geraniol e linalol, ambos, também associados ao alimento.

#### **4.2.2 Memória olfativa após a metamorfose**

As respostas de machos e fêmeas não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Qui-quadrado ( $P > 0,05$ ). Desta forma, os resultados apresentados a seguir são referentes ao conjunto de dados de ambos os sexos.

Adultos provenientes de lagartas inexperientes, assim como os de lagartas previamente expostas ao odor de acetona até a formação das crisálidas, foram mais atraídos por esta substância, quando comparado ao odor de capim-limão ( $\chi^2 = 7,04$  gl = 1,  $P = 0,01$  e  $\chi^2 = 23,14$ , gl = 1  $P < 0,0001$  respectivamente) (Figura 15A). De forma contrária, insetos oriundos de lagartas expostas ao odor de óleo essencial de capim-limão, durante todo o desenvolvimento larval, responderam significativamente mais para este tratamento quando comparado à acetona ( $\chi^2 = 9,53$ , gl = 1,  $P = 0,006$ ) (Figura 15A). Respostas semelhantes foram obtidas para insetos expostos por apenas 24 horas aos mesmos tratamentos (Figura 14B).

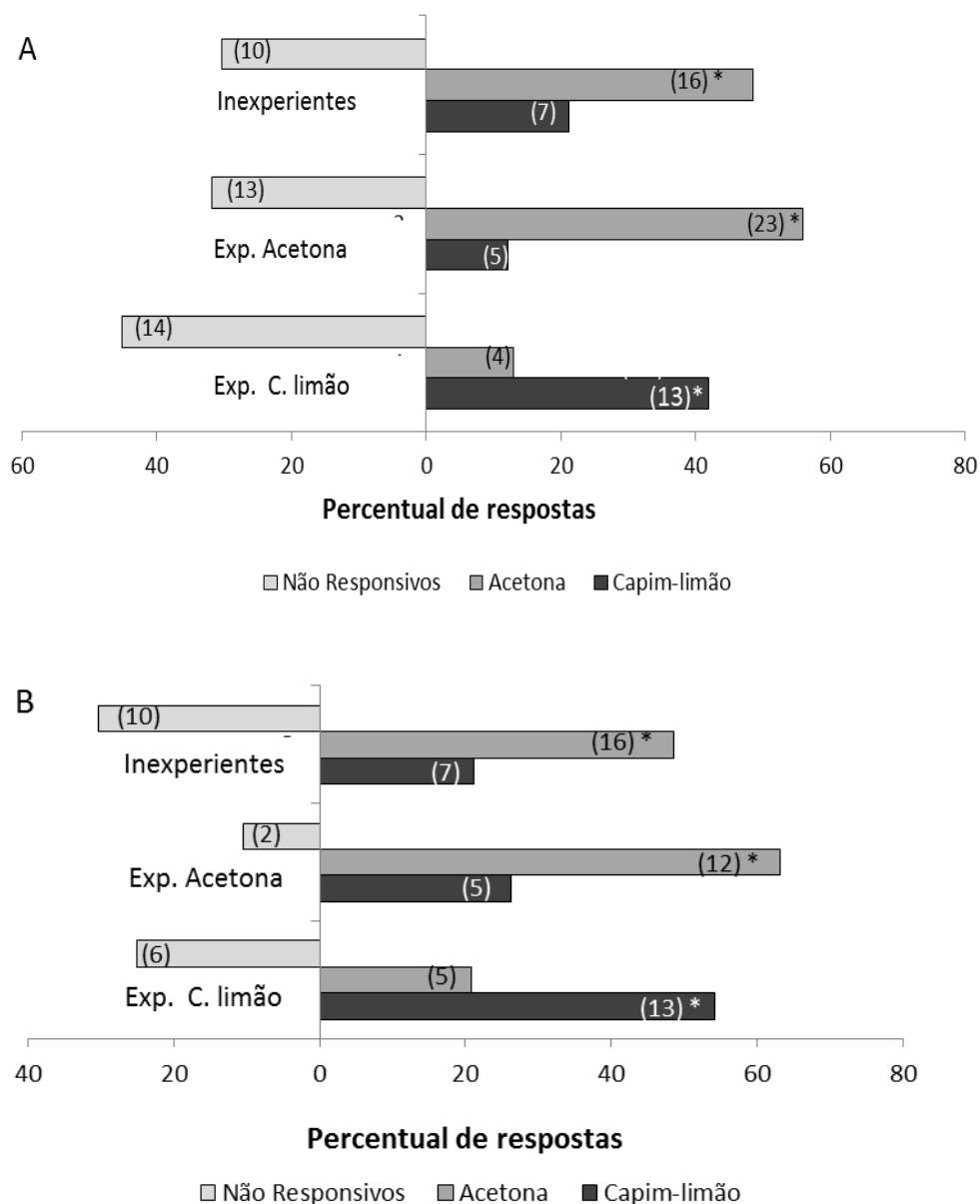


FIGURA 15. Números e percentuais de respostas quimiotáticas de adultos (♂ e ♀ com 48 a 72h de idade) de *Grapholita molesta* aos odores de óleo essencial de capim-limão e acetona, oriundos de lagartas previamente expostas aos mesmos por todo período de desenvolvimento larval (A); por 24 horas, antes dos testes (B) e inexperientes, em olfatômetro Y. \* Diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Algarismos dentro das barras representam o número de insetos não responsivos ou que responderam aos tratamentos.

Os resultados evidenciaram que a experiência prévia com odor de óleo essencial de capim-limão altera o comportamento quimiotático de lagartas de *G. molesta* e que esta memória persiste após a metamorfose.

Nas últimas décadas, outros estudos foram realizados a fim de verificar a influência da exposição prévia de formas imaturas a determinados estímulos, e a influência desta exposição no comportamento do inseto adulto. Fêmeas de *T. ni*, oriundas de lagartas criadas em dieta tratada com látex de *H. gordonii*, durante todo quinto instar larval, apresentam deterrência reduzida de oviposição ao látex da planta, quando comparados a fêmeas inexperientes (Shikano & Isman, 2009). Assim como no presente trabalho, a exposição de larvas de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) a um estímulo químico (mentol) resultou em respostas quimiotáticas positivas a este composto na fase adulta dos insetos (Barron & Corbet, 1999).

Durante o processo de desenvolvimento, os insetos holometábolos passam por uma série de transformações, as quais também resultam em alterações no sistema nervoso (Barron & Corbet, 1999). Lee *et al.* (1999) rastrearam, através da metamorfose, os neurônios do Corpo Cogumelar (CC) “*mushroom body*” do sistema nervoso de *Drosophila*. Segundo os autores o desenvolvimento dos três lóbulos do CC ocorre de maneira sequencial, o lóbulo  $\gamma$  é formado na fase embrionária, o lóbulo  $\alpha'/\beta'$  se desenvolve apenas antes da pupação, na metade do terceiro instar, e a neurogênese do  $\alpha/\beta$  começa no início da formação da pupa. Durante esta fase os neurônios do lóbulo  $\gamma$  sofrem histólise, desaparecendo, enquanto os neurônios  $\alpha'/\beta'$  e  $\alpha/\beta$  mantêm suas projeções intactas após a metamorfose.

Se em *G. molesta* o processo de desenvolvimento for análogo ao de *Drosophila*, tanto as lagartas expostas aos odores durante todo seu desenvolvimento larval, quanto às expostas ao odor por apenas 24 horas antes dos testes, sofreram o processo de condicionamento após a formação do lóbulo  $\alpha'/\beta'$ , o qual se mantém intacto através do processo de metamorfose. Desta forma o fator de maior relevância para a manutenção da memória após a metamorfose, não é o tempo de condicionamento, mas sim o momento em que o inseto é exposto a determinado estímulo. Do ponto de vista biológico a memória olfativa adquirida na fase larval poderia auxiliar a fêmea no encontro e seleção de um hospedeiro adequado, reduzindo gastos energéticos e maximizando as chances de desenvolvimento e sobrevivência da prole.

#### **4.2.3 Memória adquirida na fase adulta**

Insetos adultos, com até 24 horas após a emergência, expostos por 48 horas ao odor do solvente, acetona, foram significativamente mais atraídos a este tratamento, quando comparado ao óleo essencial ( $\chi^2 = 43,56$  gl = 1,  $P < 0,0001$ ). Resultados similares foram obtidos para adultos inexperientes ( $\chi^2 = 7,043$ , gl = 1,  $P = 0,01$ ). Porém, insetos expostos ao odor de capim-limão pelo mesmo período, não apresentaram preferência por qualquer um dos tratamentos ( $\chi^2 = 0,235$  gl = 1,  $P = 0,8$ ) (Figura 16).

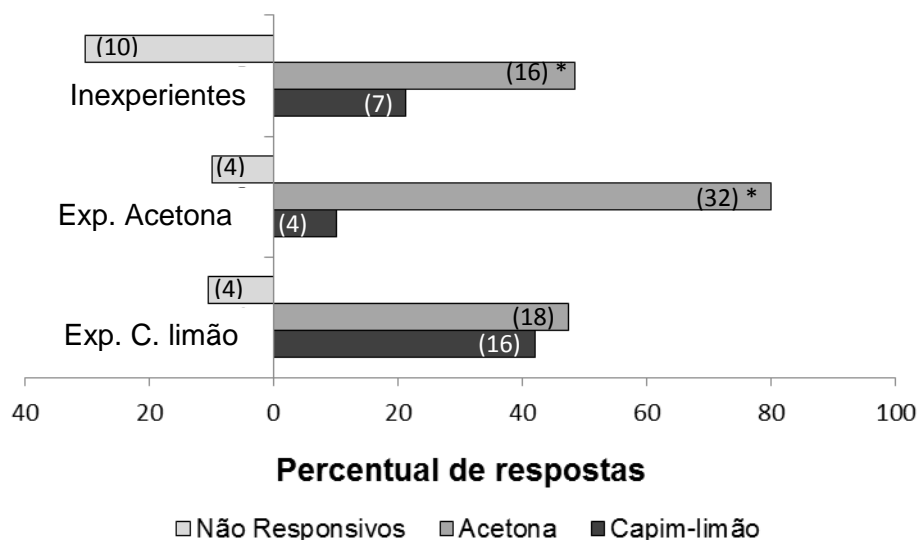


FIGURA 16. Números e percentuais de respostas quimiotáticas de adultos (♂ e ♀ com 48 a 72h de idade) de *Grapholita molesta* aos odores de óleo essencial de capim-limão e acetona, quando previamente expostos a estes por 48 horas após a emergência e inexperientes (sem contato prévio com os odores), em olfatômetro Y. \* Diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Algarismos dentro das barras representam o número de insetos não responsivos ou que responderam aos tratamentos.

São escassos na literatura trabalhos relacionados à memória olfativa adquirida na fase adulta em insetos não sociais. Realizando estudos com *T. ni*, outra espécie de lepidóptero, Landolt e Molina (1996), constataram que apenas um contato com a folhagem da planta hospedeira ou um evento de oviposição é suficiente para incrementar a atratividade das fêmeas pelo hospedeiro, em ensaios em túnel-de-vento.

Fan *et al.* (1997) avaliaram a capacidade de aprendizagem associativa de *Spodoptera littoralis*, e observaram que ambos os sexos desta espécie são capazes de aprender a associar o odor de geraniol (estímulo condicionado) a presença de sacarose (estímulo incondicionado), o que comprovou a capacidade da espécie de associar um estímulo olfativo

a um recurso alimentar. A mesma habilidade de associar dois estímulos, foi confirmada para o mosquito *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae), por Tomberlin *et al.* (2006).

Em insetos holometábolos, os circuitos olfativos do adulto são estabelecidos durante a metamorfose, mas em alguns casos podem ocorrer alterações após a emergência (Strambi *et al.* 1999). Em *Drosophila*, a exposição ao odor de benzaldeído ou acetato de isoamila, do segundo ao quinto dia de vida adulta, modifica as respostas comportamentais para estes odores e provoca alterações na conectividade de glomérulos específicos (Devaud *et al.* 2001). Já Arenas *et al.* (2012), verificaram que experiências olfativas entre o quinto e o oitavo dia após a emergência em abelhas, aumenta significativamente a retenção de memória na fase adulta destes insetos e que, além disso, a exposição a odores no início desta fase, resulta em alterações estruturais e funcionais nos lóbulos antenais destes insetos, sugerindo que o período entre o quinto e oitavo dia de vida adulta seria o momento particularmente mais sensível a experiências olfativas, as quais irão moldar posteriormente o comportamento do adulto.

Neste trabalho observou-se que o óleo essencial de capim-limão não é atrativo, de forma inata, em adultos de *G. molesta*, no entanto mariposas expostas a este odor por 48 horas no início da fase adulta (até 24 horas de idade) passam a apresentar alterações neste comportamento, evidenciando a aquisição de experiência.

Um fator que pode ter influenciado as respostas quimiotáticas das mariposas está vinculado ao processo de formação da memória. Segundo Dubnau & Tully (1998), em *Drosophila* a formação da memória apresenta



cinco fases temporais distintas: aquisição ou aprendizagem; memória de curta duração, a qual decai 30 minutos após o treino; memória de média duração, a qual persiste, por aproximadamente 3 horas; memória de anestesia, que decai no prazo de quatro dias e memória de longa duração que se mantêm por mais de uma semana.

De acordo com este bioensaio, adultos de *Grapholita molesta* adquiriram pelo menos memória de curta duração, levando a uma alteração no comportamento quimiotáxico, mas não causando preferência pelo odor ao qual foram expostas. Com base nos resultados obtidos podemos sugerir que *G. molesta* é capaz de adquirir memória de longa duração durante seu desenvolvimento larval e ao menos de curta duração na fase adulta.

#### **4.2.4 Aprendizagem associativa**

Lagartas inexperientes (expostas apenas ao ar), não apresentaram atração ou aversão ao odor de Acetato de Etila (AE) ( $\chi^2 = 1,14$ , gl = 1, P = 0,42). Da mesma forma, lagartas anteriormente expostas ao ar ambiente seguido de choque elétrico, assim como as experientes com o odor de AE apenas (na ausência de choque), não demonstraram atração ou aversão ao odor de AE ( $\chi^2 = 1,23$ , gl = 1, P = 0,41;  $\chi^2 = 3,38$ , gl = 1, P = 0,115, respectivamente). No entanto, quando o odor de AE foi seguido por choque elétrico, as lagartas passaram a apresentar aversão ao odor de AE ( $\chi^2 = 13,64$ , gl = 1, P = 0,0006). Resposta semelhante foi verificada quando as lagartas foram previamente expostas ao odor de AE seguido por choque elétrico mais odor ( $\chi^2 = 18,29$ , gl = 1, P < 0 0001) (Figura 17).

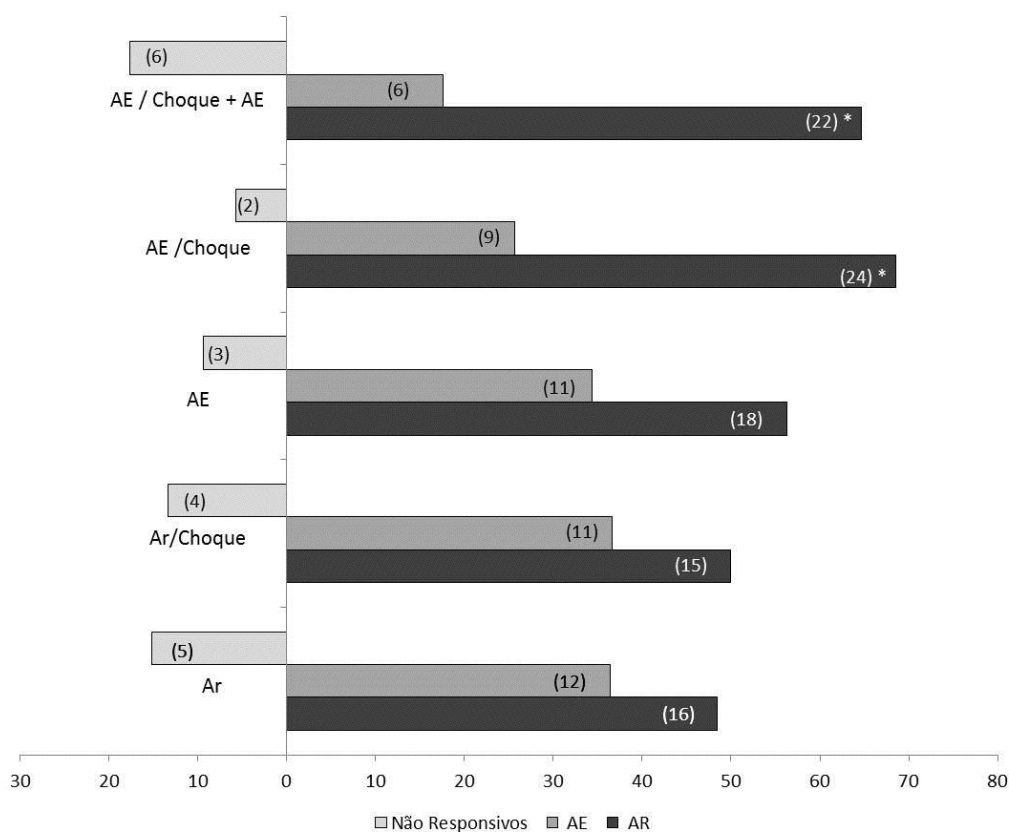


FIGURA 17. Números e percentuais de respostas quimiotáticas de lagartas de *Grapholita molesta* ao odor de Acetato de Etila (AE) e Ar Ambiente (AR), previamente expostas a cinco tratamentos: apenas ao ar ambiente (N = 33), ar seguido de choque (N = 30), apenas odor de AE (N = 32), odor de AE seguido de choque (N = 35), odor de AE seguido de choque + odor de AE (N = 34)  
 \* Diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Algarismos dentro das barras representam o número de insetos não responsivos ou que responderam aos tratamentos.

Adultos oriundos de lagartas expostas apenas ao ar ambiente, assim como das expostas ao ar seguido de choque e apenas ao odor, não apresentaram discriminação entre o ar ambiente e o odor de AE ( $P > 0,05$ ). Em contraste, adultos que tiveram origem de lagartas expostas tanto ao odor seguido de choque, quanto das experientes com odor seguido de choque mais odor, apresentaram rejeição ao odor de AE ( $\chi^2 = 7,04$ , gl = 1,  $P = 0,01$ ;  $\chi^2 = 8,33$ , gl = 1,  $P = 0,009$ , respectivamente), demonstrando comportamento semelhante ao observado nas lagartas (Figura 18).

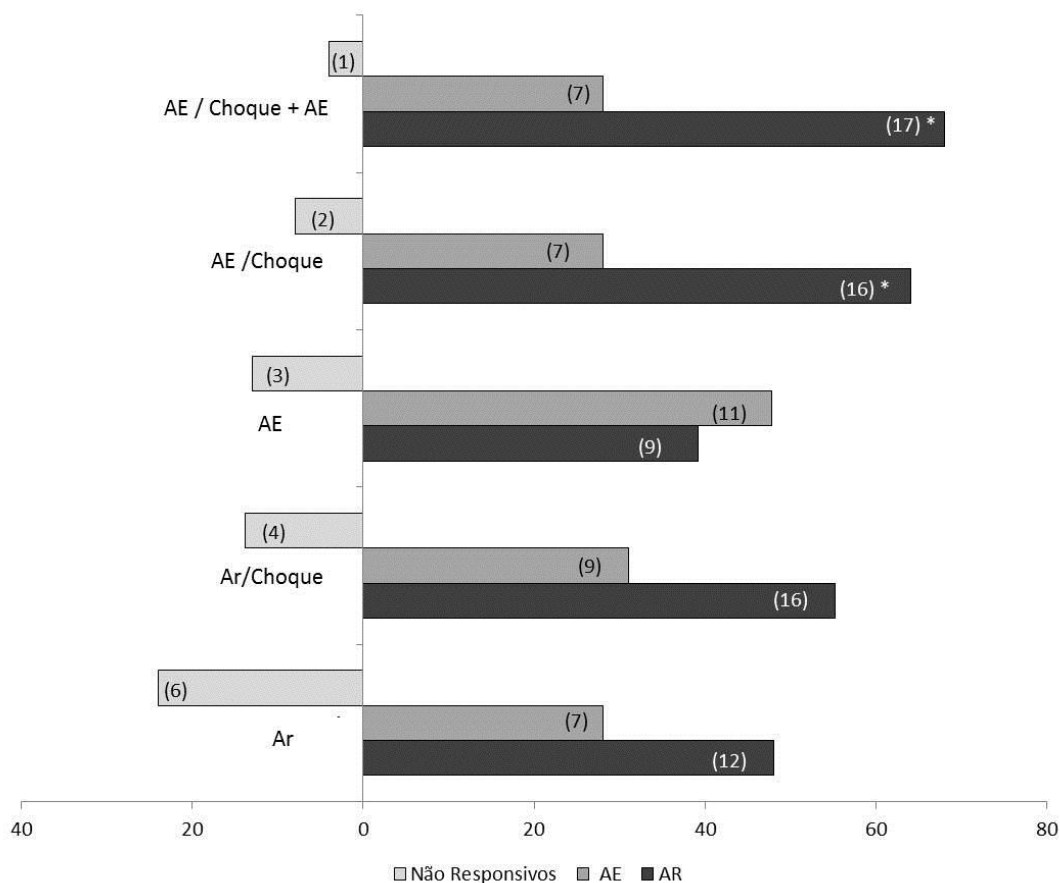


FIGURA 18. Números e percentuais de respostas quimiotáticas de adultos (♂ e ♀ com 72h de idade) de *Grapholita molesta* ao odor de Acetato de Etila (AE) e ar ambiente, oriundos de lagartas previamente expostas a cinco tratamentos: apenas ao ar ambiente (N = 25), ar seguido de choque (N = 29), apenas odor de AE (N = 23), odor de AE seguido de choque (N = 25), odor de AE seguido de choque + odor de AE (N = 25).  
 \* Diferença significativa através da análise do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Algarismos dentro das barras representam o número de insetos não responsivos ou que responderam aos tratamentos.

Os resultados deste estudo evidenciaram que lagartas de *G. molesta* são capazes de associar, após 24 horas, um estímulo olfativo (odor de AE) a um estímulo aversivo (choque elétrico), após quatro eventos de condicionamento de 20 segundos, com intervalos de 30 minutos entre eles, e que esta memória se mantém no mínimo por 72 horas após a metamorfose. Resultados semelhantes foram observados por Blackiston *et al.*, (2008), os quais constataram que lagartas de *M. sexta*, quando

condicionadas com odor de acetato de etila, associado a um choque elétrico, após 8 sessões de exposição de 20 segundos, com intervalos de uma hora, são capazes de lembrar esta associação 14 dias após o estímulo, e que o comportamento aversivo ao odor de AE adquirido durante a fase larval persiste após a metamorfose. O mesmo fato foi constatado por Tully *et al.* (1994) para *Drosophila* sp., utilizando um processo de condicionamento semelhante de associação entre odor de AE e choque elétrico, cuja alteração comportamental foi mantida por oito dias após a emergência.

A capacidade de associar estímulos olfativos e aversivos (choque) está vinculada ao corpo cogumelar (CC) “*mushroom body*” (Belle & Heisenberg, 1994), o qual desempenha a função de armazenamento de informações quimiosensoriais (Keene & Waddell, 2007). O vínculo entre aprendizagem associativa e esta estrutura já foi comprovada para *Drosophila melanogaster* através da exclusão química das células que a compõem, levando a remoção do CC, o que tornou os insetos incapazes de associar estímulos, através do processo de condicionamento clássico (Belle & Heisenberg, 1994).

No cérebro de *Drosophila*, durante o condicionamento, odores ativam grupos específicos de células de Kenyon, presentes no CC, aumentando a concentração intracelular de  $Ca^{++}$  (Wang *et al.* 2008), enquanto que o choque induz um sinal de reforço dopaminérgico que também é conduzido até as células de Kenyon (Aso *et al.* 2010). Esta ação sinérgica ocasiona uma plasticidade sináptica, levando o indivíduo condicionado a evitar o odor com o qual foi treinado (Yarali *et al.* 2012). No presente estudo, embora não tenham sido realizados ensaios neurofisiológicos, sugerimos que um

processo similar ao ocorrido em *Drosophila*, possa ter ocasionado as respostas comportamentais de *G. molesta*, uma vez que odor de AE e o choque elétrico, apenas quando associados, foram capazes de alterar o comportamento quimiotático dos insetos tanto na fase larval, quanto na adulta. Este resultado indica que as respostas obtidas correspondem a um processo de aprendizagem associativa, uma vez que a exposição apenas ao choque (ar ambiente seguido de choque) ou apenas ao odor não desencadearam qualquer mudança no comportamento dos insetos.

Do ponto de vista biológico, preservar a memória pode trazer vantagens para qualquer espécie, uma vez que o indivíduo capaz de relembrar de uma determinada ação que pode aumentar suas chances de sobrevivência, levará vantagens sobre os que não apresentam tal habilidade (Oliveira, 2007). Desta forma, prever eventos futuros com base em experiências anteriores pode ser uma chave para a sobrevivência do indivíduo.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e nas condições sob as quais foram realizados os ensaios, foi possível concluir que:

- *Anastrepha fraterculus* deposita mais ovos em frutos artificiais de amora, quando comparados aos de goiaba, mamão, manga e pêsego;
- a experiência prévia, por 48 e 72 horas, com frutos artificiais de amora, resulta na preferência de oviposição de *A. fraterculus*, por este substrato;
- a exposição prévia, por 48 e 72 horas, a frutos artificiais de goiaba não altera o comportamento inato de oviposição de *A. fraterculus*;
- a memória adquirida através da experiência prévia com frutos artificiais de amora, se mantém por 72 horas em fêmeas de *A. fraterculus*;
- a experiência com odor de óleo essencial de capim-limão na fase larval modifica as respostas inatas de oviposição de *A. fraterculus*;
- a exposição prévia de fêmeas de *A. fraterculus*, com até 24 horas de idade ou aos 15 dias de vida, a substratos artificiais de oviposição

contendo óleo essencial de capim-limão, modifica as respostas comportamentais inatas de escolha do substrato;

- a experiência por 48 horas, após a eclosão, com odor do óleo essencial de capim-limão, não influencia o comportamento quimiotático das lagartas de *G. molesta* no último instar larval;
- a exposição ininterrupta ao odor do óleo essencial de capim-limão por 10 a 12, dias influencia o comportamento quimiotático das lagartas, mas não acarreta em preferência por este odor;
- a experiência por 24 horas ao capim-limão, no final do desenvolvimento larval, modifica significativamente as respostas quimiotáticas inatas das lagartas de *G. molesta*, para este odor;
- a memória adquirida por *G. molesta*, tanto durante todo o desenvolvimento larval quanto em 24 horas no final deste período, se mantém por 72 horas após a emergência;
- adultos de *G. molesta* são capazes de aprender através de um processo não associativo e manter esta memória por 30 minutos;
- lagartas de *G. molesta* aprendem de forma associativa e mantem a memória adquirida após a metamorfose por 72 horas;

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-MENEZES, E. L.; FERRARA, F. A. A.; MENEZES, E. B. Moscas-das-frutas. In: CASSINO P. C. R.; RODRIGUES W. C. (Coord.). **Citricultura Fluminense: principais pragas e seus inimigos naturais**. Seropédica: Ed. Universidade Rural, 2004. p. 67-84.

AKHTAR, Y.; SHIKANO, I.; ISMAN, M. B. Topical application of a plant extract to different life stages of *Trichoplusia ni* fails to influence feeding or oviposition behaviour. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 132, n. 3, p. 275–282, 2009.

ALCOCK, J. **Animal Behavior: an evolutionary approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 564 p.

ALFONSO, A. M.; MARÍN, M. S. *Grapholita molesta* em condiciones de laboratório: evaluación de la relación de sexos. **Revista de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**, Córdoba, v. 36, n. 2, p. 23-29, 2004.

ARENAS, A. et al. Early olfactory experience induces structural changes in the primary olfactory center of an insect brain. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 35, p. 682 - 690, 2012.

ARIOLI, C. J. et al. Técnica de criação de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera:Tortricidae) em laboratório utilizando dieta artificial para a produção de insetos visando estudos de comportamento e controle. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Uva e Vinho**, Bento Gonçalves, v. 13, p. 1-13, 2007.

ASO Y, et al. Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. **Current Biology**, London, v. 20, p. 1445–1451, 2010.

ATKINS, M. D. **Introduction to insect behavior**. New York: Macmillan Publishing, 1980. 237p.

BARRON, A. B; CORBET, S. A. Preimaginal conditioning in *Drosophila* revisited. **Animal Behaviour**, London, v. 58, p.621 - 628, 1999.



BARRON, A. B.; CORBET, S. A. Behavioural induction in *Drosophila*: timing and specificity. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 94, p.159-171, 2000.

BELLE, J. S.; HEISENBERG, M. Associative Odor Learning in *Drosophila* Abolished by Chemical Ablation of Mushroom Bodies. **Science**, v. 263, n. 4, p. 692–695, 1994.

BERNAYS, E. A. Effect of experience on feeding. In: CHAPMAN, R. F.; BOER, G. **Regulatory Mechanisms in Insect Feeding**. New York: Chapman & Hale, 1995. p. 279-306.

BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. **Host plant selection by phytophagous insects**. New York: Chapman & Hall, 1994. 312 p.

BLACKISTON D. J.; CASEY E. S.; WEISS M. R. Retention of memory through metamorphosis: can a moth remember what it learned as a caterpillar? **PLoS ONE**3, v. 3, n. 3, p.1-7 , 2008.

BOECKH, J. Neurophysiological aspects of insect olfaction. In: LEWIS, T. (Ed.). **Insect communication**. London: Academic Press, 1984. p. 83-194.

BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A. Perception of Plant volatile blends by herbivorous insects - Finding the right mix. **Phytochemistry**, New York, v. 72, n. 13, p.1605–1611, 2011.

BRUCE, T. J. A.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Insect host location: a volatile situation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.10, n. 6, p. 269–274, 2005.

CARLISSON, M. A. et al. Experience-dependent modification of orientational response to olfactory cues in larvae of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, n.11, p. 2445-2454, 1999.

CARVALHO, R. S. **Metodologia para monitoramento populacional de moscas-das-frutas em pomares comerciais**. Cruz das Almas: Embrapa,, 2005. 17 p.

CHOW, J. K.; AKHTAR, Y.; ISMAN, M. B. The effects of larval experience with a complex plant latex on subsequent feeding and oviposition by the cabbage looper moth: *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemoecology**, Basel, v. 15, n. 3, p. 129-133, 2005.

CORBET, S. A. Insect chemosensory responses: a chemical legacy hypothesis. **Ecological Entomology**, London, v.10, n. 2, p. 143-153, 1985.

CORRÊA, A. G.; SANT'ANA, J. Fundamentos da comunicação química de insetos. In: FERREIRA, J. T. B. et al. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: Holos, 2001. p. 9-22.

DAVIS, R. L. Mushroom bodies and *Drosophila* learning. **Neuron**, Cambridge, v.11, n. 1, p. 1-14, 1993.

DAVIS, R. L. Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. **Annual Review Neuroscience**, Palo Alto, v. 28, p. 275-302, 2005.

DESOUHANT, E., et al. What matters in the associative learning of visual cues in foraging parasitoid wasps: colour or brightness? **Animal Cognition**, Berlin, v.13, n. 3, p. 535-543, 2010.

DEVAUD, J. M.; ACEBES, A.; FERRÚS, A. Odor exposure causes central adaptation and morphological changes in selected olfactory glomeruli in *Drosophila*. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 21, n. 16, p. 6274–6282, 2001.

DÍAZ-FLEISCHER, F.; ALUJA, M. Influence of conspecific presence, experience, and host quality on oviposition behavior and clutch size determination in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 16, n. 4, p. 537-554, 2003.

DUBNAU, J.; TULLY, T. Gene discovery in *Drosophila*: new insights for learning and memory. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 21, p. 407–444, 1998.

DUDAI, Y. **Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond**. Oxford: Oxford Univ. Press, 2002. 331p.

DUKAS, R.; DUAN, J. J. Potential fitness consequences of associative learning in a parasitoid wasp. **Behavioral Ecology**, Cary, v. 11, n. 5, p. 536-543, 2000.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Cultivo do pessegueiro. **Sistemas de Produção**, Pelotas, n. 4, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/Cultivo doPessegueiro/index.htm>>. Acesso em: 22 mar. 2013.

EVERSHED, R. P. Insect Olfaction and Molecular Structure. In: MANDAVA, N. B. (Ed.). **CRC Handbook of Natural Pesticides**. Pheromones, Part A, Springer-Verlag, Basel, p.1-33, 1986.

FABRE, J-H.; MATTOS, A. T. de.; MIAL, B. **The Wonders of Instinct**. New York: The Century Co. 1918, 322 p.

FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. **Fruticultura: Fundamentos e práticas**. Pelotas: UFPel, 1996. 311 p.

FACKNATH, S.; WRIGHT, D. J. Is host selection in leafminer adults influenced by pre-imaginal or early adult experience? **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, n. 8, p. 505-512, 2007.

FAN, R. J.; ANDERSON, P.; HANSSON, B. S. Behavioural Analysis Of Olfactory Conditioning In The Moth *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 200, n. 23, p. 2969-2976, 1997.

FAN, R. J.; HANSSON, B. S. Olfactory discrimination conditioning in the moth *Spodoptera littoralis*. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 72, p. 159-165, 2001.

FAUCHEUX, M. J. Morphology and distribution of sensilla on the cephalic appendages, tarsi and ovipositor of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella* Den. & Fschiff. (Lepidoptera: Pyralidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 291-307, 1991.

GERBER, B.; STOCKER, R. F. The Drosophila larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning: a review. **Chemical Senses**, Oxford, v. 32, p. 65-89, 2007.

GÖKÇE, A. et al. Behavioural and electrophysiological responses of grape berry moth (Lep.: Tortricidae) to selected plants extracts. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 130, n. 9-10, p. 509-514, 2005.

GONZALEZ, R. H. Fenologia de la grapholita o polilia oriental del durazno. **Aconex**, Melbourne, v. 12, p. 5-12, 1989.

GREGÓRIO P. L. F. et al. The influence of prior experience with artificial fruits on the ovipositioning behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 102, n. 2, p. 138-141, 2012.

GREGÓRIO P. L. F.; SANT'ANA, J.; RADAELLI, L. R. Percepção química e visual de *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) em laboratório. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 100, n. 2, p. 128-132, 2010.

GRELLMANN, E. O. et al. Ciclo evolutivo de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera – Olethreutidae) em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, p. 21-26, 1991.

HEINZ, C. A.; FEENY, P. Effects of contact chemistry and host plant experience in the oviposition behaviour of the eastern black swallowtail butterfly. **Animal Behavior**, London, v.69, n. 1, p.107-115, 2005.

HILDEBRAND, J. G.; SHEPHERD, G. M. Mechanisms of olfactory discrimination: Converging evidence for common principles across phyla **Annual Review Neuroscience**, Palo Alto, v. 20, p. 595-631, 1997.

HOPKINS, A. D. A discussion of H.G. Hewitt's paper on Insect behaviour'. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 10, p. 92-93,

1917.JAENIKE, J. Induction of host preference in *Drosophila melanogaster*. **Oecologia**, Berlin, v. 58, p. 320-325, 1983.

JALDO, H. E.; RAMAJO, M. C. G; ILLINK, E. W. Mass rearing of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): a preliminary strategy. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 84, n. 4, p. 716-718, 2001.

JANZ, N.;SÖDERLIND, L.; NYLIN, S. No effect of larval experience on adult host preferences in *Polygonia c-album* (Lepidoptera: Nymphalidae): on the persistence of Hopkins' host selection principle. **Ecological Entomology**, London, v. 34, n.1, p. 50 - 57, 2009.

JOACHIM-BRAVO, I. S. et al. Oviposition preference hierarchy in *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae): influence of female age and experience. **Iheringia. Série Zoológica**, Porto Alegre, v. 91, p. 93-100, 2001a.

JOACHIM-BRAVO, I. S.; GUIMARÃES, A. N.; MAGALHÃES, T. C. Influência de substâncias atrativas no comportamento alimentar e na preferência de oviposição de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Sitentibus. Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 1, n. 1, p. 60-65, 2001b.

JOACHIM-BRAVO, I. S.; SILVA-NETO, A. M. Aceitação e preferência de frutos para oviposição em duas populações de *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Iheringia. Série Zoológica**, Porto Alegre, v. 94, n. 2, p.171-176, 2004.

JONES, R. E. Host location and oviposition on plants. In: BAILY, W. J.; RIDSDILL-SMITH, J. **Reproductive Behaviour of Insects**. New York: Chapman & Hall, 1991. p. 108–138.

KAISLING, K. E. Sensory Transduction in Insect Olfactory Receptors. Mosbacher Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie. In: **Biochemistry of Sensory Functions**. JAENICKE, L. (Ed.).Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag,1974. p. 243-273.

KEENE, A. C.; WADDELL, S. *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 8, n. 5, p. 341–354, 2007.

KERPEL, S. M.; MOREIRA, G. R. P. Absence of learning and local specialization on host plant selection by *Heliconius erato*. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 18, n. 3, p.433–452, 2005.

KRIEGER, J.; BREER, H. Olfactory reception in invertebrates. **Science**, Washington, v. 286, n. 5440, p. 720–723, 1999.

KROUTOV, V.; MAYER, M. S.; EMMEL, T. C. Olfactory conditioning of the butterfly *Agraulis vanillae* (L.) (Lepidoptera, Nymphalidae) to floral but not host-plant odors. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 12, n. 6, p.833-843, 1999.

LANDOLT, P. J.; MOLINA, O. Host-Finding by Cabbage Looper Moths (Lepidoptera: Noctuidae): Learning of Host Odor upon Contact with Host Foliage. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 9, n. 6, p. 899-908, 1996.

LEAL, T. A. B. S.; ZUCOLOTO, F. S. Selection of artificial hosts for oviposition by wild *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera, Tephritidae): influence of adult food and effect of experience. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 467-471, 2008.

LEE, T.; LEE, A.; LUO, L. Q. Development of the Drosophila mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. **Development**, Cambridge, v. 126, n. 18, p. 4065-4076, 1999.

LIU, S. S. et al. Experience-induced preference for oviposition repellents derived from a non-host plant by a specialist herbivore. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 722-729, 2005.

LIU T. X.; LIU, S. S. Experience-altered oviposition responses to a neem - based product, Neemix<sup>®</sup>, by the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 38-45, 2006.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 93-98.

MATTHEWS, R. W.; MATTHEWS, J. R. **Insect behavior**. New York: John Wiley & Sons, 2010. 514 p.

MC CABE, S. I.; FARINA, W. M. Olfactory learning in the stingless bee *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 196, n. 7, p. 481-490, 2010.

MC CABE S. I. et al Odor discrimination in classical conditioning of proboscis extension in two stingless bee species in comparison to Africanized honeybees. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 193, n. 11, p. 1089–1099, 2007.

MELLO, L. M. R. **Produção de mercado brasileiro de maçã**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 2004. 4 p. Comunicado Técnico, n. 50.

MILLER, J. R.; STRICKLER, K. L. Finding and accepting host plants. In: BELL, W. J.; CARDE, R. **Chemical Ecology of Insects**. London: Chapman and Hall, 1984, p. 127-155.

MONTEIRO, L. B.; HICKEL, E. Introdução à fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L. B. **Fruteiras de caroço**: uma visão ecológica. Curitiba: UFPR, 2004. 309 p.

NAVA, D. E.; BOTTON, M. **Bioecologia e Controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em Pessegueiro**. Pelotas: Embrapa-CPACT, 2010. 29 p.

NELSON, M. C. Classical conditioning in the blowfly (*Phormia regina*): associative e excitatory factors. **Journal of Comparative & Physiological Psychology**, Arlington, v. 77, n. 3, p. 353-368, 1971.

NEUSER, K. et al. Appetitive olfactory learning in *Drosophila* larvae: effects of repetition, reward strength, age, gender, assay type and memory span. **Animal Behaviour**, London, v. 69, p. 891–898, 2005.

OTTONI, E. B. EthoLog 2.2 - a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, Austin, v. 32, n. 3, p. 446-449, 2000.

OLIVEIRA, A. A. de. **Memória, Cognição e Comportamento**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2007. 310 p.

PAPAJ, D. R.; LEWIS, A. C. **Insect Learning**. New York: Chapman and Hall, 1993. 398 p.

PARMESAN, C.; SINGER, M. C.; HARRIS, I. Absence of adaptive learning from the oviposition foraging behavior of a checker-spot butterfly. **Animal Behavior**, London, v. 50, p.161-175,1995.

PAVLOV, I. P. **Lectures on conditioned reflexes**. New York: International Publishers, 1927, 430 p.

PROKOPY, R. J.; REYNOLDS, A. H.; VAN DER ENT, L. J. Can *Rhagoletis pomonella* flies (Diptera: Tephritidae) learn to associate presence of food on foliage with foliage color? **European Journal of Entomology**, Branisovska, v. 95, n. 3, p. 335-341, 1998.

PSZCZOLKOWSKI, M. A.; BROWN, J. Single experience learning of host fruit selection by lepidopteran larvae. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 86, n. 1- 2, p. 168-175, 2005.

RAY, S. Survival of olfactory memory through metamorphosis in the fly *Musca domestica*. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 259, n. 1, p. 37-40, 1999.

RENWICK, J. A. A. Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. **Experientia**, Basel, v. 45, p. 223-228, 1989.

ROBACKER, D. C.; FRAZER, I. Do mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) prefer grapefruit to yellow chapote, a native host? **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, n. 3, p. 481-487, 2002.

SALLES, L. A. B. **Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana**. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1991. 16 p.

SALLES, L. A. B. Metodologia de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) em dieta artificial em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 479-487, 1992.

SALLES, L. A. B. Principais pragas e seu controle. In: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. do C. B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília: Embrapa-CPACT, 1998. 351 p.

SALLES, L. A. B. **Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana**. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1995. 58 p.

SALLES, L. A. B. Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus*. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 81-86.

SALLES, L. A. Mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). In: VILELLA, E.F. et al. (ed.) **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2000a. p. 42-45.

SALLOUM A.; COLSON V.; MARION-POLL F. Appetitive and Aversive Learning in *Spodoptera littoralis* Larvae. **Chemical Senses**, Oxford, v. 36, n. 8, p.725-731, 2011.

SCHERER, S.; STOCKER, R. F.; GERBER, B. Olfactory learning in individually assayed *Drosophila* larvae. **Learning and Memory**, Cold Spring Harbor, v.10, 217–225, 2003.

SCHIPANSKI, A. et al. Behavioral analyses of sugar processing in choice, feeding, and learning in larval *Drosophila*. **Chemical Senses**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 563–573, 2008.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect–Plant Biology**. Oxford: University Press, 2005. 421 p.

SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P. Morfologia dos ovos de *Anastrepha*. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 49-54.

SHIKANO, I.; ISMAN, M. B. A sensitive period for larval gustatory learning influences subsequent oviposition choice by the cabbage looper moth. **Animal Behaviour**, London, v. 77, n. 1, p. 247–251, 2009.

SINGER, M. C. The definition and measurement of oviposition preference in plant-feeding insects. In: MILLER, J. R.; MILLER, T. A. (Ed.) **Insect-plant interactions**. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 66-94.

SKINNER, B. F. **The behavior of organisms**. Appleton, New York, 1938. 457p.

SQUIRRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memory: from mind to molecules**. Gordonsville: W H Freeman & Co, 1999. 254 p.

STENSMYR, M. C. 2004. **The fruit fly nose – Function and Evolution**, 2004., 50 f dissertation (Doctoral) -. Department of Crop Science SLU, Annarp, Sweden, 2004..

STORECK, A. et al. The role of plant chemical cues in determining host preference in the generalist aphid parasitoid *Aphidius colemani*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 41-46, 2000.

STRAMBI, C.; CAYRE, M.; STRAMBI, A. Neural plasticity in the adult insect brain and its hormonal control. **International Review of Cytology – A Survey of Cell Biology**, New York, v. 190, p. 137-173, 1999.

SUGAYAMA, R. L.; MALAVASI, A. Ecologia comportamental. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 103-108.

TÉRAN, H. R. Comportamiento alimentario y su correlacion a la reproduccion em hembras de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Revista Agronómica del Noroeste Argentino**, Tucuman, v. 14, p. 17-34, 1977.

TOMBERLIN, J. K. et al. Associative learning of odor with food- or blood-meal by *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), **Naturwissenschaften**, Freiburg, v. 93, n. 11, p. 551-556, 2006.

TULLY, T.; CAMBIAZO, V.; KRUSE, L. Memory through metamorphosis in normal and mutant *Drosophila*. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 14, n. 1, p. 68–74, 1994.

VAN EMDEN, H. F. Hopkins' 'host selection principle', another nail in its coffin. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 325–328, 1996.

VIDELA, M.; VALLADARES, G.; SALVO, A. Differential effects of experience on feeding and ovipositing preferences of a polyphagous leafminer. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 137, n. 2, p.184-192, 2010.



VOGT, R. G.; RIDDIFORD, L. M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. **Nature**, London, v. 293, , p. 161-163, 1981.

WANG, Y. et al. Imaging of an early memory trace in the *Drosophila* mushroom body. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 28, n. 17, p. 4368–4376, 2008.

WATANABE, H. et al. Classical olfactory conditioning in cockroach *Periplaneta americana*. **Zoological Science**, Bunkyo-ku, v. 20, n. 12, p. 1447-1454, 2003.

WEST, S. A.; CUNNINGHAM, J. P. A general model for host plant selection in phytophagous insects. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 214, n. 3, p. 499 – 513, 2002.

YARALI, A. et al. Event Timing in Associative Learning: From Biochemical Reaction Dynamics to Behavioural Observations. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1-17 e32885. doi:10.1371/journal.pone.0032885.