



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA**

Programa de Pós-Graduação em Ecologia: Teoria, Aplicação e Valores

Mestrado em Ecologia

**AMANDA AMORIM DA SILVA CARDOSO**

**INTERAÇÕES SOCIAIS PODEM ALTERAR O COMPORTAMENTO  
SEXUAL DE *ANASTREPHA FRATERCULUS* (DIPTERA:  
TEPHRITIDAE)?**

**Salvador, Agosto de 2021**

**AMANDA AMORIM DA SILVA CARDOSO**

**INTERAÇÕES SOCIAIS PODEM ALTERAR O COMPORTAMENTO  
SEXUAL DE *ANASTREPHA FRATERCULUS* (DIPTERA:  
TEPHRITIDAE)?**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ecologia:  
Teoria, Aplicação e Valores, como parte dos  
requisitos exigidos para obtenção  
do título de Mestre em  
Ecologia

Orientadora: Dra. Iara Sordi Joachim Bravo

Co-orientadora: Dra. Vanessa Simões Dias de Castro

**Salvador, Agosto de 2021**

## **Agradecimentos**

Nesses anos de mestrado, ao qual dediquei muito esforço, estudo e empenho, gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam. Primeiramente, agradeço aos meus pais, Janice e Antônio, por terem dedicado tantos anos de suas vidas para me apoiar, me amando e estimulando a continuar sempre mesmo nos momentos mais difíceis. À minha irmã, Adriane, por ser minha melhor amiga, e mesmo longe, está sempre presente em minha vida. À minha avó, Léa, pela doçura de todos os dias. À Luane, pela paciência, pelos momentos de diversão e felicidade que me traz todos os dias. À todos os meus familiares, tios e tias, primos e primas, à minha dinda e meu dindo, por estarem sempre presentes em todos os momentos, rindo e chorando e compartilhando suas vidas comigo. À vocês, minha família, sou eternamente grata por tudo que sou, por tudo que consegui conquistar e pela minha felicidade. Minha gratidão especial à Prof. Dra. Iara Sordi Joachim Bravo, minha orientadora, e sobretudo uma grande amiga, pela pessoa incrível e profissional maravilhosa que é. Obrigada pela dedicação para me ajudar e orientar, sempre depositando sua confiança em mim ao longo de tantos anos e abrindo todas as portas que sempre me deparei. Sem seu apoio, nada disso seria possível. Obrigada especialmente também a minha coorientadora, Dra. Vanessa Simões Dias de Castro, por me ajudar a desenvolver esse projeto, sempre dando boas ideias e me ajudando quando precisei, sempre me apoiando e torcendo por mim. Agradeço profundamente a Dra. Alzira Kelly Passos Roriz, que sempre esteve disponível, não importando a hora do dia, para conversar comigo, me ajudar e esclarecer qualquer dúvida que eu tivesse. Agradeço também à Alexandre pela ajuda a desenvolver as principais ideias desse projeto, sempre trazendo coisas novas. Um obrigada especial às minhas amigas e colegas de laboratório, Lorena, Carina e Bianca, que sempre me ajudaram a cuidar das moscas, sempre se empenharam o máximo possível nesses dois anos e meio para garantir que esse projeto fosse realizado. Sem o esforço e desempenho excelente delas, a realização dessa pesquisa não seria possível. Por fim, agradeço a Deus por todas as bênçãos que tem me proporcionado nesse último ano que foi tão difícil. Muitos perderam seus entes queridos, então agradeço sempre pela saúde dos meus familiares e amigos, que mostram força e fé para continuar.

- Examinador 1 (presidente)

---

Dra. Iara Sordi Joachim Bravo

- Examinador 2

---

Dra. Maria Aparecida Castellani

- Examinador 3

---

Dr. Hilton Ferreira Japyassú

- Suplente

---

Dra. Alzira Kelly Passos Roriz

## **INTERAÇÕES SOCIAIS PODEM ALTERAR O COMPORTAMENTO SEXUAL DE *ANASTREPHA FRATERCULUS* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)?**

**AMANDA AMORIM DA SILVA CARDOSO**

Esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar o comportamento sexual dos machos de mosca-das-frutas da espécie *Anastrepha fraterculus*. Essa é uma das principais pragas agrícolas no sul do Brasil, causando enormes perdas à agricultura. As fêmeas dessa espécie depositam seus ovos em frutos verdes, dos quais as larvas irão se alimentar durante seu desenvolvimento, impossibilitando, assim, a comercialização interestadual e internacional deles. Para o controle dessa praga pode ser utilizada a Técnica do Inseto Estéril (TIE), na qual milhões de insetos dessa espécie são criados em laboratório, esterilizados com radiação ionizante e liberados nas plantações para acasalar com as fêmeas selvagens. Como consequência, as fêmeas depositarão ovos inférteis, diminuindo assim o prejuízo econômico causado por esse inseto. Entretanto, para que essa técnica seja eficiente, os machos estéreis devem competir com os machos selvagens já presentes no campo e um comportamento sexual eficaz é extremamente necessário. Ou seja, esse comportamento sexual deve ser suficientemente eficiente para que os machos estéreis possam atrair as fêmeas selvagens através da emissão de substâncias químicas produzidas pelos machos, denominadas feromônios, e copular com elas após a execução da sequência comportamental de corte. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar o comportamento sexual dos machos de *A. fraterculus* e avaliar se esse comportamento pode ser aprimorado quando eles tem uma experiência sexual com fêmeas ou quando mantêm interações com outros machos. Todos esses experimentos foram realizados quando os indivíduos estavam com dez e onze dias, idade na qual eles atingem completamente o amadurecimento sexual. Primeiro, machos mantidos isolados ou agregados acasalaram com fêmeas virgens para adquirir experiência sexual, formando assim quatro tratamentos de machos: machos copulados agregados, machos virgens agregados, machos copulados isolados e machos virgens isolados. Através de experimentos de competitividade foi possível comparar a habilidade dos diferentes tratamentos de machos de conseguir acasalar com fêmeas novamente. Foram realizadas também filmagens com o objetivo de comparar as sequências comportamentais dos machos submetidos aos diferentes tratamentos. Os resultados das análises sugerem que a experiência sexual com uma fêmea não proporciona vantagem reprodutiva aos machos. Entretanto, os machos que foram mantidos em grupos (agregados) acasalaram mais frequentemente com as fêmeas do que aqueles mantidos isolados, provavelmente por realizarem os comportamentos relacionados a emissão de feromônio sexual com maior frequência. As descobertas desse trabalho contribuem para um melhor entendimento sobre o comportamento sexual de machos de *Anastrepha fraterculus* e sugerem que a manutenção deles em grupos durante o período de amadurecimento sexual, como acontece na TIE, pode proporcionar uma maior vantagem sexual.

## Resumo

O comportamento sexual em muitas espécies de mosca-das-frutas é essencial para que os machos conquistem as fêmeas. Eles podem adquirir informações por meio de interações sociais e modificar seu comportamento no futuro para obter mais acasalamentos. Tem sido demonstrado que experiência sexual prévia e interações entre machos podem modificar o comportamento sexual deles, tornando-os mais aptos a conquistarem fêmeas em cortes subsequentes. A mosca-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae), uma praga agrícola, apresenta comportamento sexual complexo, no qual machos mantêm interações com outros machos durante o comportamento de lek, podendo também acasalar com diversas fêmeas ao longo da vida. O estudo do comportamento de corte de *A. fraterculus* pode contribuir para o aprimoramento da Técnica do Inseto Estéril (TIE). Essa técnica consiste na produção e esterilização de milhões de machos em laboratório, sendo que estes devem ter uma alta qualidade e ser sexualmente competitivos, sendo capazes de acasalar com fêmeas selvagens, promovendo assim a redução gradual da população no campo. O objetivo deste trabalho foi analisar a competitividade e o comportamento de corte de machos mantidos em diferentes contextos sociais, a fim de determinar se um acasalamento prévio ou interações com outros machos podem alterar o comportamento sexual deles, possibilitando que estes sejam mais aptos a acasalar com fêmeas em cortes subsequentes. Os machos foram mantidos agregados ou isolados durante seu período de amadurecimento sexual, e esses dois grupos foram expostos ou privados de contato com fêmeas virgens, formando assim os quatro tratamentos testados: machos copulados agregados, machos copulados isolados, machos virgens agregados e machos virgens isolados. Foram realizados testes de competição sexual e filmagens do comportamento de corte com os quatro tratamentos de machos. Os resultados deste estudo mostram que machos de *A. fraterculus* previamente acasalados não apresentam maior competitividade sexual ou qualquer mudança no comportamento de corte que proporcionasse uma vantagem sexual em relação a machos virgens. Entretanto, foi possível determinar que machos que mantiveram interações sociais com outros durante seu período de amadurecimento sexual, apresentaram maior competitividade sexual do que machos que foram mantidos em isolamento e maior frequência de unidade comportamentais associadas a emissão de feromônios sexuais. Essa descoberta é importante para entender melhor como o comportamento de corte e cópula em *A. fraterculus* varia de acordo com as interações sociais que os machos têm durante seu amadurecimento sexual. Isso pode ser um fator importante, levando em consideração que um pré-requisito para o sucesso da TIE é que os machos estéreis liberados sejam sexualmente competitivos para acasalar com o maior número de fêmeas selvagens possível, induzindo assim a uma falha na reprodução dessa praga agrícola.

**Palavras-chave:** escolha de parceiros, experiência sexual prévia, isolamento social, Técnica do Inseto Estéril

## **Abstract**

Sexual behavior in many fruit fly species is essential for males to conquer females. They can gather information through social interactions and modify their behavior to obtain more matings in the future. It has been suggested that previous sexual experience and social interactions among males can change their sexual behavior, which, in turn, make them more likely to mate in subsequent courtships. The fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) is an agricultural pest that exhibits the complex sexual behavior of lek polygyny. The study of male courtship behavior in this species can contribute to improving the Sterile Insect Technique (SIT), a birth control method for insects. The success of SIT depends on the mass rearing and radiation-induced sterilization of millions of flies capable of competing with wild insects for mates after being released in the field. This study aimed to assess the mating competitiveness and sexual behavior of males kept in different social contexts to determine the extent to which previous mating experience or male-male interactions can improve their sexual performance and copulation success in subsequent courtships. Males were kept aggregated or isolated during their sexual maturation period, and these two groups were exposed or unexposed to virgin females, thus forming the four treatments tested: aggregated copulated males, isolated copulated males, aggregated virgin males, and isolated virgin males. Mating competitiveness tests and courtship behavior analysis were performed using the four groups of male treatments. The results of this study showed that previous sexual experience neither increased sexual competitiveness nor changed the courtship behavior of *A. fraterculus* males compared to virgin males. However, males exposed to social interaction during the sexual maturation were more sexually competitive than males kept in isolation and higher frequency of behavioral units associated with pheromone emission. These findings contribute to our understanding of how the courtship and mating behavior of *A. fraterculus* males can change with social interactions during their sexual maturation. Social interactions during the sexual maturity period may be an important factor to be considered in SIT programs, considering that the success of the technique rely on the ability of sterile males to compete and mate in the field with as many wild females as possible, thus inducing failure in the reproduction of this agricultural pest.

**Keywords:** mate choice, previous sexual experience, social isolation, Sterile Insect Technique

## Sumário

Introdução .....	9
Material e Métodos.....	12
Origem dos insetos e protocolo de criação.....	12
Pré-requisitos para os experimentos.....	12
Protocolos para obtenção dos diferentes tratamentos de machos quanto às condições de acasalamento e exposição a outros machos.....	12
Experimentos de comportamento sexual.....	15
Competitividade sexual.....	15
Filmagens.....	15
Análises Estatísticas.....	16
Resultados.....	17
Discussão.....	34
Referências .....	38
Anexo 1.....	46
Anexo 2.....	46
Anexo 3.....	47

## Introdução

A comunicação através do comportamento é fundamental para que os insetos possam encontrar potenciais parceiros sexuais. Para entender o comportamento sexual é necessário observar os sinais que esses organismos apresentam, além do ambiente, experiências e comportamentos que fornecem diversas informações (Dukas e Mooers, 2003; Krupp et al., 2008; Palmer e Kristan, 2011). Nesse contexto, os machos de mosca-das-frutas se destacam por apresentarem *displays* comportamentais complexos e rituais de acasalamento com sequências de unidades comportamentais e emissão de feromônios (Vaníčková et al., 2015; Bosa et al., 2016; Roriz et al., 2018) com o objetivo de conquistar as fêmeas. Algumas espécies de moscas-das-frutas estão entre as pragas agrícolas que mais causam impacto econômico no mundo e perdas à fruticultura, criando restrições rígidas de quarentena entre diversos países (Aluja e Mangan, 2008).

As fêmeas depositam seus ovos na região do epicarpo da fruta da qual as larvas irão se alimentar durante seu desenvolvimento, causando danos às safras e reduzindo oportunidades de comercialização internacional (Clarke et al., 2011). No Brasil, uma das mais importantes pragas agrícolas é a *Anastrepha fraterculus* (Weidemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). Essa é uma espécie polífaga que infesta diversas plantas hospedeiras de valor comercial (Hernández-Ortiz et al., 2019). A Técnica do Inseto Estéril (TIE), atualmente usada para outras espécies de tefritídeos (Robinson, 2002; Pereira et al., 2013), é um método não poluente de controle de pragas que faz parte de programas de manejo integrado de pragas em grandes áreas, e utiliza insetos estéreis criados massalmente em condições artificiais de laboratório (Dick et al., 2021). O sucesso da TIE depende da competitividade sexual de machos esterilizados com radiação ionizante que após serem liberados no campo precisam competir com os machos selvagens por acasalamentos com as fêmeas e, assim, após sucessivas liberações, a população alvo pode ser suprimida ou erradicada (Enkerlin, 2005; Hendricks et al., 2021). Dessa forma, é essencial estudar o comportamento sexual dos machos de *A. fraterculus*, para tentar aumentar a competitividade e qualidade dos machos estéreis usados na TIE.

Como outras moscas-das-frutas, *A. fraterculus* apresenta um comportamento sexual complexo (Aluja, 1994). Gomez-Cendra et al. (2011) descreveu o comportamento sexual desta espécie em 17 unidades comportamentais, divididas em três categorias: emissão de feromônios -

*Call 0, Call 1 e Call 2*; posição das asas - *Relax, Transversal, Enation, Hamation, Arrowhead 1, Arrowhead 2, Fanning e Spin*; e movimentos do corpo - *Stationary, Mobile, Oscillation, Fight, Attempt e Contact*. Dias et al. (2016) descreveu pela primeira vez o comportamento de *marking leaf* para os machos dessa espécie. Roriz et al. (2018) fez alterações no etograma de Gomez-Cendra et al. (2011), inserindo novas unidades comportamentais e juntando algumas já descritas, resultando em 26 unidades comportamentais. O comportamento de corte dessa espécie acontece pela manhã e se estende por duas ou três horas a partir do amanhecer. Durante esse horário os machos formam grupos conhecidos como “lek” (Roriz et al., 2019). O comportamento de lek foi definido por Aluja e Birke (1993) como uma agregação de pelo menos três machos emitindo feromônios sexuais ao mesmo tempo e está diretamente associado ao sucesso na corte e acasalamento dos machos (Segura et al., 2007, Gomez-Cendra et al., 2011). A presença do comportamento sexual de emissão de feromônios indica que os machos estão prontos para acasalar (Lu e Teal, 2001; Bachmann et al., 2015; Roriz et al., 2018), agindo como forma de comunicação química, e sua composição varia entre diferentes populações, podendo influenciar na resposta das fêmeas (Břízová et al., 2013).

Informações adquiridas a partir de experiências sexuais anteriores e o ambiente social podem afetar a forma de obter parceiros sexuais e essas interações sociais podem agir como fatores adicionais para proporcionar um maior sucesso em cortes subsequentes (Dukas, 2005; Polejack e Tidon, 2007; Krupp et al., 2008; Saleem et al., 2014). Apesar do comportamento sexual ser geneticamente programado e exibido mesmo em machos virgens (comportamentos inatos), ele pode ser modificado por experiências sociais entre machos ou entre machos e fêmeas (Villella e Hall, 2008; Bretman et al., 2009). Moscas-das-frutas apresentam comportamentos sociais como: agregação, nos quais feromônios agem como potencializadores para a agregação de insetos em busca de alimento ou parceiros sexuais (Lin et al., 2015); sincronização do relógio circadiano (Lone e Sharma, 2011; Eban-Rothschild e Bloch, 2012) e utilização de informações sociais importantes colhidas de coespecíficos, como escolha de substratos para oviposição no caso das fêmeas (Sarin e Dukas, 2009). Além disso, Farine et al. (2012) demonstrou que a dispersão de feromônios pode variar tanto com as experiências sociais do adulto precoce quanto com o adulto maduro. Interações sociais podem também alterar a frequência com que os acasalamentos acontecem, assim como o comportamento sexual dos machos, melhorando a possibilidade de que machos consigam acasalar com mais fêmeas no futuro (Krupp et al., 2008).

Apesar disso, nem todo comportamento sexual depende de interações sociais prévias, considerando que moscas-das-frutas apresentam também comportamentos inatos determinados por genes e esses comportamentos coexistem com comportamentos aprendidos a partir de determinadas interações sociais (Kadow, 2019). A experiência sexual prévia pode também ser um dos fatores que melhoram o sucesso da corte dos machos, resultando em mais acasalamentos. Os machos podem ser expostos a novas informações que são processadas pelo sistema nervoso e enviadas para todo o corpo. Por exemplo, Ellis e Carney (2010) observaram que existem mudanças nos níveis de expressão gênica na cabeça dos machos em resposta a dicas sensoriais recebidas durante a corte que podem aumentar a eficiência de acasalamentos futuros. Também para *D. melanogaster* foi observado que machos sexualmente experientes apresentaram uma vantagem em relação a machos virgens (Dukas, 2005; Saleem et al., 2014), e para *D. mercatorum* os machos aprimoraram seus comportamentos de corte devido a experiências sexuais anteriores (Polejack e Tidon, 2007).

Essas interações e experiências podem alterar o comportamento dos machos, favorecendo-os em acasalamentos futuros e possibilitando a conquista de um número maior de fêmeas através de um comportamento sexual mais aprimorado. Tais estudos podem auxiliar no aprimoramento da Técnica do Inseto Estéril, possibilitando que machos estéreis sejam capazes de competirem melhor com machos selvagens, acasalando com mais fêmeas. Considerando o contexto acima descrito, o objetivo desse trabalho foi analisar, através de experimentos de competitividade e comportamento de corte, se machos de *A. fraterculus* mantidos em diferentes contextos sociais (agregados ou isolados) e que tiveram ou não uma experiência sexual prévia com uma fêmea, poderiam se tornar mais competitivos, aprimorando seu comportamento de corte e possibilitando que se tornasse mais aptos a acasalar com fêmeas em cortes subsequentes.

## **Material e Métodos**

### **Origem dos insetos e protocolo de criação**

Os experimentos foram conduzidos com moscas de *Anastrepha fraterculus* (Weidemann, 1830) pertencentes ao morfotipo Brasileiro-1 (Hernández-Ortiz et al., 2012), originalmente coletadas em Bento Gonçalves (RS) (29°10' 15" S, 51°31' 08" O) a partir de goiabas infestadas (*Psidium guajava*) e mantidas no Laboratório de Ecologia Comportamental de Insetos (LECI) da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Os insetos foram mantidos sob condições padrão seguindo metodologia da FAO/IAEA (Seibersdorf, Áustria) (Vera et al. 2006). As moscas que emergiram dos frutos coletados foram mantidas em gaiolas de plástico com laterais teladas, para facilitar a circulação de ar e fornecidas água e dieta padrão a base de proteína hidrolisada e açúcar (1:3) *ad libidum* (Silva Neto et al, 2012). A partir da geração F50, a população de *A. fraterculus* passou a ser mantida em dieta artificial de cenoura (Finney, 1956; Tanaka et al., 1969) (Anexo 1)

### **Pré-requisitos para os experimentos**

Os machos de *A. fraterculus* foram mantidos em gaiolas de forma a proporcionar os ambientes necessários para os diferentes tipos de interações sociais estudadas: gaiolas com grupos de machos ou gaiolas com machos isolados. Além disso, uma parte dos machos de cada um desses dois grupos acasalou com fêmeas virgens um dia antes da realização dos experimentos descritos nesse trabalho. Assim, todos os experimentos continham machos de quatro tratamentos diferentes. Todos os machos estavam na idade de maturação sexual de 10 e 11 dias (Anexo 2) e os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecologia Comportamental de Insetos (LECI).

### **Protocolos para a obtenção dos diferentes tratamentos de machos quanto às condições de acasalamento e exposição a outros machos**

As pupas de todos os indivíduos utilizados nos experimentos foram individualizadas em sementeiras, contendo vermiculita umidificada, garantindo assim que as moscas não tivessem nenhum contato visual com outras durante a emergência (Figura 1).



Figura 1. Sementeira plástica contendo pupas. A estrutura impossibilitava que as moscas tivessem contato visual durante a emergência ( $27 \times 27 \times 3,5$ , cada célula medindo  $3,8 \times 3,8 \times 3,5$  cm)

Para os experimentos de comportamento sexual, foram usados os quatro tratamentos: machos virgens agregados (mva), machos virgens isolados (mvi), machos copulados agregados (mca) e machos copulados isolados (mci) (Figura 2). Os diferentes protocolos para obter os quatro tratamentos de machos foram posteriormente utilizados nos experimentos de competitividade sexual e comportamento de corte.

#### *Machos virgens agregados (mva)*

Um grupo de 85 machos provenientes das sementeiras, chamado de “machos virgens agregados” (mva) foi mantido em uma gaiola plástica ( $15 \times 19 \times 12$  cm) com água e dieta padrão a base de proteína hidrolisada e açúcar (1:3) *ad libidum*. Os machos virgens agregados tiveram contato entre si durante o período de amadurecimento sexual (9 dias), mas não tiveram contato com fêmeas durante esse tempo.

#### *Machos virgens isolados (mvi)*

Em um segundo grupo, chamado de “machos virgens isolados” (mvi), 85 machos foram individualizados em copos plásticos de 200ml, também contendo água e dieta padrão (1:3) *ad libidum*, nunca tendo contato com outros machos ou fêmeas durante todo o período de amadurecimento sexual.

#### *Machos copulados agregados (mca)*

Vinte e cinco “machos copulados agregados” (mca) foram obtidos a partir de uma parte dos 85 machos virgens agregados (mva), previamente separados. Quando 25 machos do grupo “mva” atingiram 10 dias de idade, eles foram expostos a fêmeas virgens, individualmente em gaiolas plásticas medindo  $9 \times 9 \times 9$  cm. As fêmeas foram removidas das gaiolas após o término do acasalamento. Os machos que acasalaram foram mantidos separados dos machos virgens, formando assim esse terceiro grupo de machos: “mca”.

*Machos copulados isolados (mci)*

Vinte e cinco machos copulados isolados (mci) foram obtidos a partir de uma parte dos 85 machos virgens isolados (mvi), previamente separados. Da mesma forma que no tratamento citado anteriormente, quando os “mvi” atingiram 10 dias de idade, eles foram expostos às fêmeas virgens, individualmente em gaiolas plásticas medindo  $9 \times 9 \times 9$  cm. As fêmeas foram removidas das gaiolas após o término do acasalamento. Os machos que acasalaram foram mantidos separados dos machos virgens e de outros machos copulados, formando o quarto grupo de machos: “mci”.

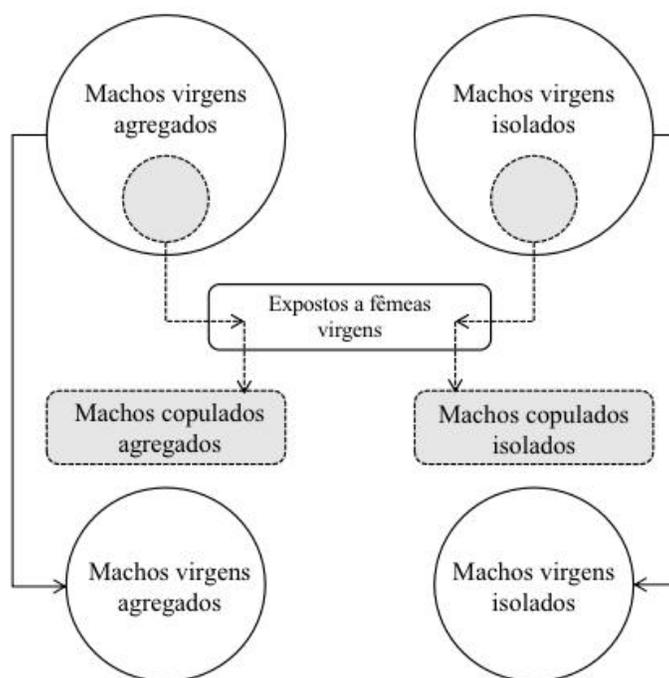


Figura 2. Esquema detalhando protocolo de obtenção dos diferentes tratamentos de machos: machos copulados aglomerados (mca); machos copulados isolados (mci); machos virgens agregados(mva); machos virgens isolados (mvi)

## **Experimentos de comportamento sexual**

### **Competitividade sexual**

Com o objetivo de avaliar as consequências da experiência sexual prévia e do isolamento nos machos, as seis possíveis combinações dos diferentes tratamentos de machos foram avaliadas: 1. mci × mvi, 2. mca x mva, 3. mci x mca, 4. mvi x mva, 5. mci x mva e 6. mvi x mca. Para uma réplica, 30 gaiolas (9 × 9 × 9 cm) foram utilizadas, sendo cinco de cada combinação testada. Cada gaiola continha dois machos, um de cada tratamento, e uma fêmea virgem. No total foram utilizados 60 machos e 30 fêmeas por réplica. Esse experimento foi realizado 24h após os machos dos tratamentos mci e mca terem acasalado com fêmeas virgens pela primeira vez. Foram obtidos dados referentes ao número de machos de cada tratamento que tiveram sucesso de cópula nas diferentes combinações. Sete réplicas foram realizadas, provenientes de distintas coortes de insetos.

### **Comportamento de corte**

Os experimentos de comportamento de corte foram realizados com o objetivo de identificar eventuais diferenças na sequência de corte e na frequência das unidades comportamentais de corte entre os machos dos diferentes grupos, como possível consequência da experiência sexual prévia e/ou do isolamento. Para esses testes, machos dos diferentes tratamentos foram avaliados separadamente, para que não houvesse interferência de outro macho no comportamento daquele que estava sendo testado. Um casal, composto de um macho de um determinado tratamento e uma fêmea virgem, foi acondicionado em uma caixa de vidro (9 × 7 × 9 cm) para a obtenção das filmagens dos comportamentos. Cada gaiola de vidro também foi isolada para que os machos das diferentes gaiolas não tivessem contato visual uns com os outros. A gravação teve início a partir do momento de liberação da fêmea e o tempo máximo de filmagem foi de 30 minutos, caso não houvesse cópula. Se uma cópula fosse observada, a filmagem era interrompida. As câmeras utilizadas foram a Geovision-GV-BX220D-3, posicionadas em frente as gaiolas. O programa Eagle Vision Pro versão 4.1 foi usado para capturar e gravar as imagens e todos os vídeos foram salvos no formato AVI pelo programa Geovision 800. Foram analisados um total de 17 filmagens para machos virgens agregados, 18 para machos virgens isolados, 17 para machos copulados agregados e 15 para machos copulados isolados, totalizando 67 vídeos provenientes de três réplicas. As filmagens apresentavam ou não

cópula no final. Os comportamentos dos machos que aconteceram a partir de estímulos visuais foram sequenciados, segundo a segundo, seguindo o etograma de Roriz et al. (2018), com adaptações.

### **Análises Estatísticas**

A competitividade sexual foi avaliada com Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM), assumindo uma distribuição binomial e função de ligação logit. Tratamento dos machos foi modelado como efeito fixo e réplica como efeito aleatório. Para cada combinação foi realizada uma análise. Os dados obtidos nos experimentos de comportamento de corte (tamanho das sequências comportamentais e frequências de cada unidade comportamental) foram analisados da seguinte forma: GLMM, assumindo uma distribuição de Poisson, e função de ligação log e comparações par a par com teste Tukey. Para sequência comportamental, utilizou-se o software Ethoseq (Japyassu et al., 2006) para construção da representação gráfica no qual cada comportamento é representado apenas uma vez. Foram analisadas as árvores que representaram sucesso de corte (ou seja, machos que acasalaram) com o objetivo de comparar as unidades comportamentais que mais contribuíram para o sucesso da corte dos machos dos diferentes tratamentos. Além disso, foram analisadas também as árvores iniciadas com a unidade comportamental *calling* (CALL). Nesse caso, todas as filmagens foram incluídas nas análises. As análises estatísticas foram realizadas no software R (versão 1.3.1073) usando os pacotes *lme4* (Bates et al., 2015), *car* (Fox e Weisberg, 2019), *multcomp* (Hothorn et al., 2018), usando  $\alpha = 0,05$  para todos os experimentos.

## Resultados

### Competitividade sexual

Entre as seis possíveis combinações, três apresentaram diferenças no número de machos que conseguiram acasalar com as fêmeas: macho copulado agregado  $\times$  macho copulado isolado (mca  $\times$  mci), macho copulado agregado  $\times$  macho virgem isolado (mca  $\times$  mvi) e macho virgem agregado  $\times$  macho virgem isolado (mva  $\times$  mvi), sendo que machos copulados agregados e machos virgens agregados, copularam mais em cada combinação mostrada na Figura 3A.

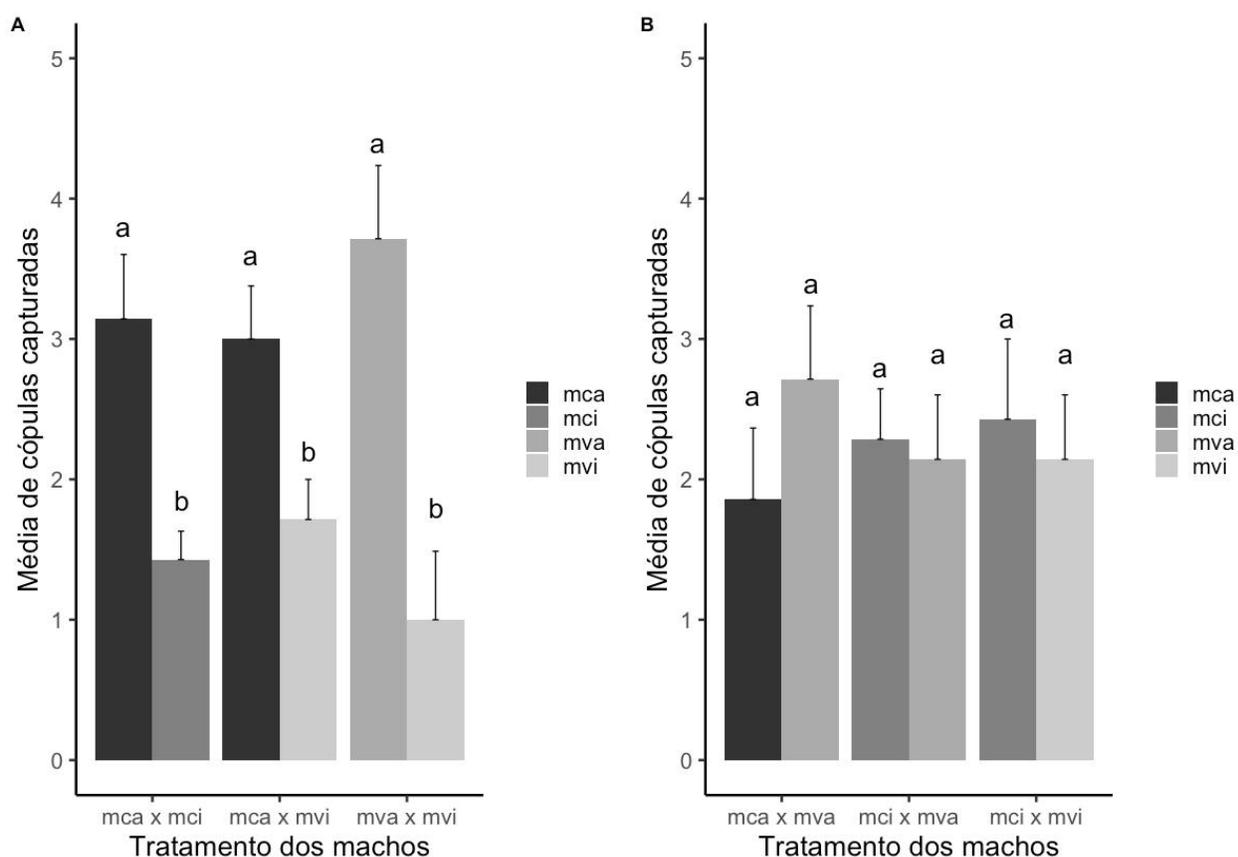


Figura 3. Média de cópulas capturadas para cada combinação testada. (A) mca  $\times$  mci (  $F_{7,70}= 0,014$ ,  $P= 0,004$ ); mca  $\times$  mvi ( $F_{7,70}= 0,132$ ,  $P= 0,03$ ); mva  $\times$  mvi ( $F_{7,70}= 0,002$ ,  $P= <0,0001$ ). (B) mca  $\times$  mva (  $F_{7,70}= 0,399$ ,  $P= 0,153$ ); mci  $\times$  mva (  $F_{7,70}= 0,612$ ,  $P= 0,810$ ); mci  $\times$  mvi (  $F_{7,70}= 0,612$ ,  $P= 0,632$ ). Barras seguidas de letras diferentes dentro de uma combinação são estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ )

A Figura 3A destaca as combinações nas quais houveram diferença estatística. Machos agregados na presença de machos isolados (independentemente de serem copulados ou virgens), apresentaram um sucesso maior na corte do que machos isolados, conseguindo acasalar com as

fêmeas. A Figura 3B mostra as combinações que não apresentaram diferença estatística. Machos agregados ou isolados na presença de outros agregados ou isolados (independentemente de serem copulados ou virgens) apresentaram a mesma competitividade para acasalar com as fêmeas (Figura 3B). Na combinação de machos copulados isolados  $\times$  machos virgens agregados (mci x mva), observou-se o mesmo número médio de cópulas, ou seja, combinação os machos apresentaram a mesma competitividade quando expostos a fêmeas (Figura 3B).

### Comportamento de corte

Os resultados referentes à sequência comportamental de corte evidenciaram diferenças no tamanho das sequências comportamentais entre os diferentes machos ( $F_{3,63} = <0,001$ ,  $P = <0,001$ ). A taxa de acasalamentos nos tratamentos foi: mci: 53,33%; mca: 47,05%; mvi: 26,66%; mva: 56,25%. Machos virgens agregados (mva) apresentaram tamanho da sequência comportamental significativamente menor quando comparado com os outros tratamentos. Machos copulados agregados (mca) e machos virgens isolados (mvi) tiveram aproximadamente o mesmo tamanho das sequências comportamentais (Figura 4).

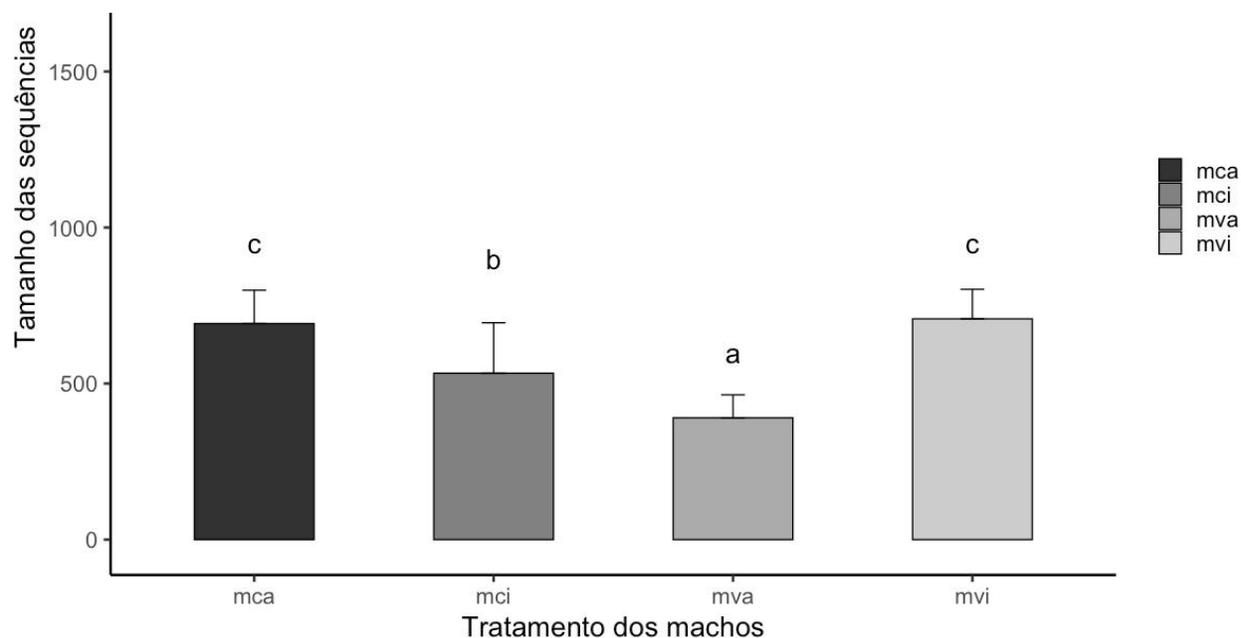


Figura 4. Tamanho das sequências comportamentais de corte de cada tratamento de machos testados. Barras seguidas de letras diferentes indicam diferença estatística ( $H_{3,63} = <0,001$ ,  $P = <0,001$ )

Vinte e oito unidades comportamentais de corte foram observadas durante as análises: 26 unidades comportamentais já descritas anteriormente em Roriz et al. (2018), e 2 unidades comportamentais que foram incluídas durante as análises (Tabela 1)

Tabela 1. Descrição das unidades comportamentais de corte realizadas pelos machos de *Anastrepha fraterculus* de diferentes tratamentos. (\* indicam comportamentos adicionados durante as análises). Adaptado de Roriz et al. (2018).

Estágio da corte	Categorias comportamentais	Unidade Comportamental	Descrição
Início	Emissão de feromônios	<b>CALL:</b> <i>Calling</i>	Emissão de feromônio com uma gota brilhante e translúcida visível pela eversão da membrana anal do macho ou exposição das glândulas pleurais laterais (Gomez-Cendra et al., 2011; com modificações)
Desenvolvimento da corte	Movimento, posicionamento e sinais realizados com as asas	<b>FA-call:</b> <i>Fanning</i>	Macho, andando ou parado, executa vibrações rápidas e fortes nas asas, contínuas ou intermitentes, enquanto emite feromônio (Gomez-Cendra et al., 2011)
		<b>EN:</b> <i>Enantion</i>	Movimentos lentos e simultâneos para frente e para trás das asas. O ângulo entre cada asa e o corpo varia entre 0° e 90° (Robacker e Hart 1985).
		<b>EN-call</b>	<i>Enantion</i> realizado simultaneamente com a emissão de feromônio visível pela eversão da membrana anal do macho e/ou emissão de feromônio com exposição visível das glândulas

			pleurais laterais
		<b>HA: <i>Hamation</i></b>	Machos geralmente parados, realizam movimentos alternados das asas, com o ângulo entre cada asa e o corpo variando entre 0° e 90° (Robacker e Hart 1985; com modificações)
		<b>HA-call</b>	<i>Hamation</i> realizado simultaneamente com a emissão de feromônio visível pela eversão da membrana anal do macho e/ou emissão de feromônio com exposição visível das glândulas pleurais laterais.
		<b>TR: Transversal</b>	Machos geralmente parados, mantêm suas asas transversais (180°) ao eixo do corpo (Gomez-Cendra et al., 2011)
		<b>TR-call</b>	Posição transversal realizado simultaneamente com a emissão de feromônio visível pela eversão da membrana anal do macho e/ou emissão de feromônio com exposição visível das glândulas pleurais laterais.
		<b>AH 1-call:</b> Arrowhead-1	Macho mantém as asas apontando para trás, mantendo-as rígidas e próximas ao corpo enquanto emite feromônio com exposição visível das glândulas pleurais laterais proeminentes (Chamada 2) e move o abdômen. O inseto pode mover sua probóscide (ou não) para cima

			e para baixo (Gomez-Cendra et al., 2011; com modificação).
		<b>AH 2-call:</b> Arrowhead-2	Macho move suas asas rápida e alternadamente, acariciando-as contra as glândulas feromonais laterais; o ângulo máximo entre a asa e o corpo é de 45°; pode ocorrer (ou não) com movimentos para cima e para baixo da probóscide (Gomez-Cendra et al., 2011, com modificação).
	Movimentos do corpo	<b>OC: <i>Oscillation</i></b>	Macho move suas pernas lateralmente, caminhando, criando arcos com o movimento de seu corpo de um lado para o outro. A cada oscilação lateral, o inseto executa movimentos de asa de <i>hamation</i> (HA) ou <i>enantion</i> (EN) (Gomez-Cendra et al., 2011, modificado).
		<b>OC-call</b>	<i>Oscillation</i> realizado simultaneamente com a emissão de feromônio visível pela eversão da membrana anal do macho e/ou emissão de feromônio com exposição visível das glândulas pleurais laterais.
		<b>SP-call: <i>Spin</i></b>	Macho gira 360° em seu próprio eixo com emissão de feromônio visível através da eversão da membrana anal e/ou emissão de feromônio com exposição das glândulas pleurais laterais e

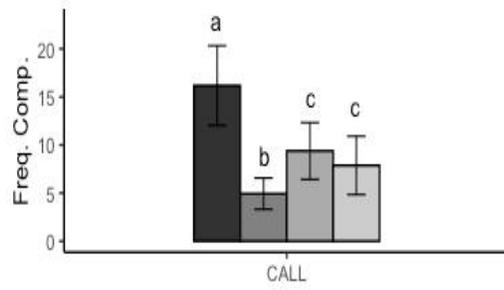
			realizando <i>fanning</i> ( Gomez-Cendra et al., 2011)
		<b>GF-call: <i>Graceful</i></b>	Macho libera feromônio sexual, realizando <i>fanning</i> (FA-call) e, simultaneamente, executando movimentos rápidos e arqueados de seu corpo (Aluja et al., 1999).
		<b>FL: <i>Flying</i></b>	Macho voa, movendo-se para um novo campo de pouso.
		<b>MO: <i>Mobile</i></b>	Macho caminha movendo as pernas de forma síncrona, e geralmente mantém as asas em uma posição quase transversal a 45° (Gomez-Cendra et al., 2011; com modificação).
		<b>ST: <i>Stationary</i></b>	Macho permanece parado com as asas em uma posição relaxada, perto do corpo - ou segurada quase transversalmente - asas com ângulo mediano de 45° em relação ao seu corpo; porção proximal da asa posicionada para baixo, porção distal para cima (Gomez-Cendra et al., 2011; com modificação).
	Movimentos abdominais	<b>AB: <i>Abdominal movements</i></b>	Movimentos para cima e para baixo do abdômen em relação à sua posição normal. As asas geralmente em posição quase transversal a 45°, embora as asas também possam ser mantidas em posição transversal (TR) ou relaxadas.
		<b>AB-call</b>	Movimentos abdominais realizados

			simultaneamente com a emissão de feromônio visível pela eversão da membrana anal do macho e/ou emissão de feromônio com exposição visível das glândulas pleurais laterais.
		<b>ML: <i>Marking leaf</i></b>	Macho toca a folha ou outra superfície com sua membrana anal evertida, marcando o substrato com feromônio (Dias et al., 2016)
	Limpeza	<b>GR: <i>Grooming</i></b>	Macho permanece parado e realiza movimentos de limpeza corporal, acariciando as pernas nas asas, cabeça, tórax, abdômen, probóscide, antenas e ovipositor.
		<b>RU: <i>Rubbing legs</i>*</b>	Macho permanece parado e esfrega pares de pernas umas nas outras, normalmente o primeiro e o último pares.
	Comportamentos agonísticos	<b>FI: <i>Fight</i></b>	Interações agressivas, entre machos, ou entre machos e fêmeas, onde a mosca empurra a outra ou bate na outra com a cabeça (Gomez-Cendra et al., 2011).
		<b>FG: <i>Falling</i>*</b>	Macho cai com pernas para cima, após <i>attempt</i> ou aterrissagem mal-sucedida.
Fim da corte	Interações entre machos e fêmeas	<b>AL: <i>Alignment</i></b>	O macho e a fêmea permanecem parados e se posicionam frente a frente, a curtas distâncias, olhando diretamente um para o outro.
		<b>CO: <i>Contact</i></b>	Macho toca a fêmea com suas pernas anteriores, probóscide ou

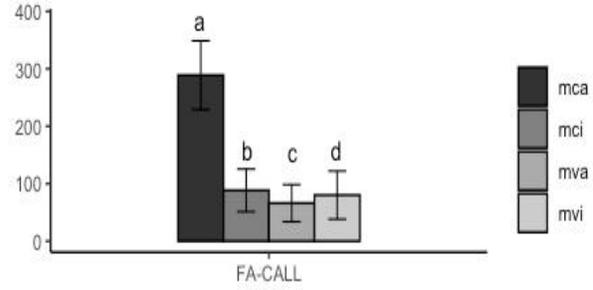
			antenas antes do <i>attempt</i> (Morgante et al., 1983 modificado).
		<b>AT: <i>Attempt</i></b>	Macho salta sobre a fêmea e tenta copular, levantando o ovipositor da fêmea com suas pernas traseiras podendo ou não tocar a cabeça da fêmea com sua probóscide, fazendo movimentos para frente e para trás (Gomez-Cendra et al., 2011; com modificação).
	<b>Cópula</b>	<b>MT: <i>Mating</i></b>	Macho segura a fêmea, posicionando seus três pares de patas no corpo da fêmea, introduz seu órgão copulador na fêmea, enquanto às vezes toca a cabeça da fêmea com sua tromba, fazendo movimentos para frente e para trás.

De forma geral, a maioria das unidades comportamentais apresentou diferenças na frequência com que os machos de diferentes tratamentos exibiram esses comportamentos (Anexo 3). Os comportamentos que não apresentaram diferenças significativas quanto a frequência foram *fight*, *alignment*, *attempt* e *mating* (Figura 5). Machos copulados agregados apresentaram com maior frequência comportamentos associados a emissão de feromônios como CALL, FA-CALL, EN-CALL, HA-CALL, TR-CALL, AH1-CALL, OC-CALL, SP-CALL, GF-CALL e ML. Já machos virgens isolados, apresentaram mais frequentemente comportamentos não associados a emissão de feromônios como EN, HA, TR, OC, MO, ST, AB, GR, RU, FG, FI. Machos virgens isolados (mvi) apresentaram com mais frequência o comportamento *mobile* (MO) do que os machos dos outros tratamentos. Além disso, mvi também apresentaram maior frequência de comportamentos associados a limpeza corporal (*grooming* e *rubbing*) (Figuras 5.21 e 5.22) e comportamento agonístico (*fight*) (Figura 5.25). Machos virgens agregados e machos copulados agregados executaram com menos frequência os comportamentos *mobile* (MO) e *falling* (FG) (Figuras 5.16 e 5.24).

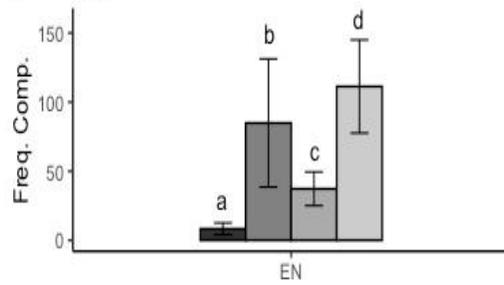
1 CALL



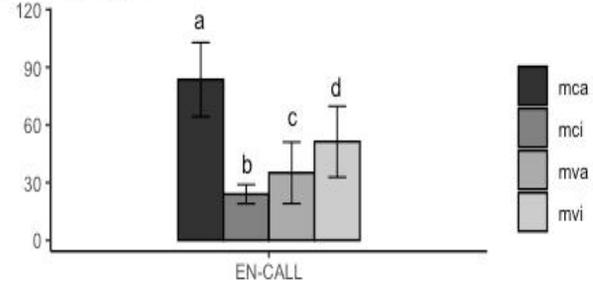
2 FA-CALL



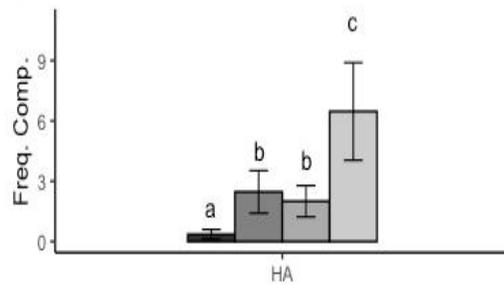
3 EN



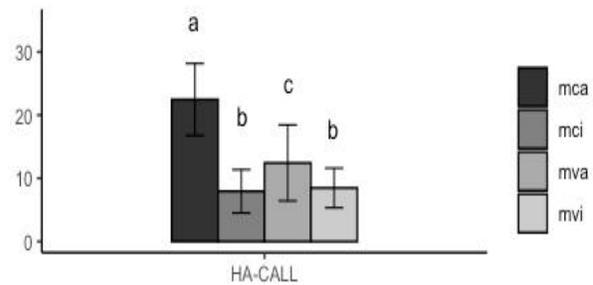
4 EN-CALL



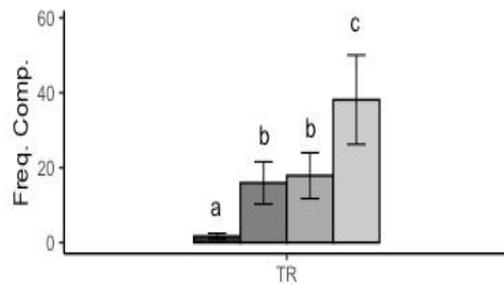
5 HA



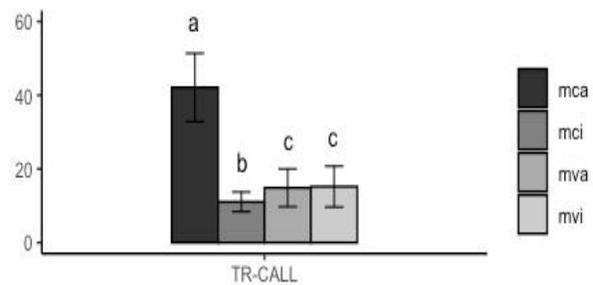
6 HA-CALL



7 TR



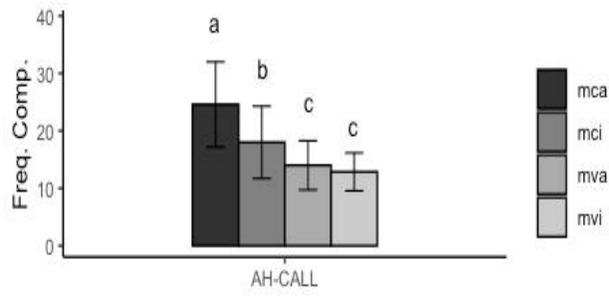
8 TR-CALL



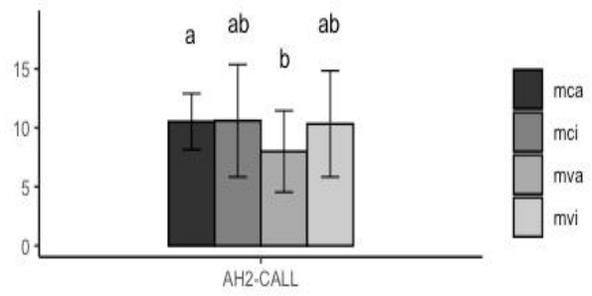
Unidades comportamentais

Unidades comportamentais

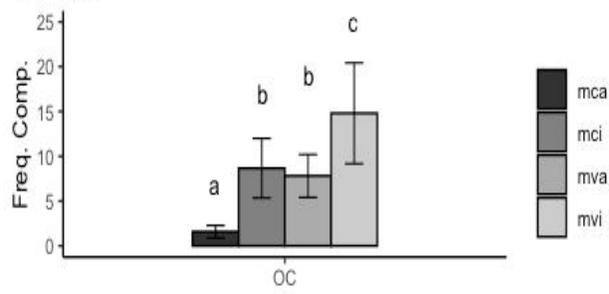
9 AH-CALL



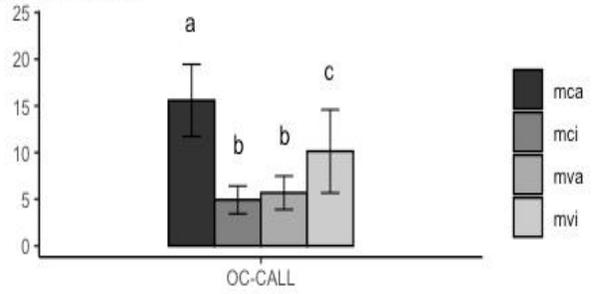
10 AH2-CALL



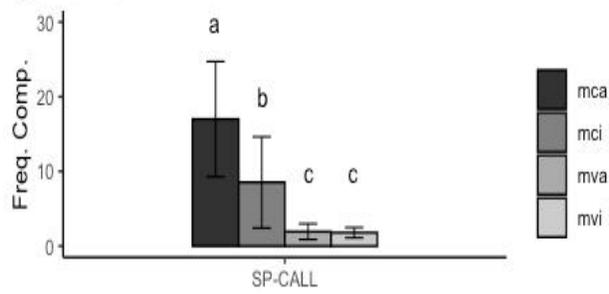
11 OC



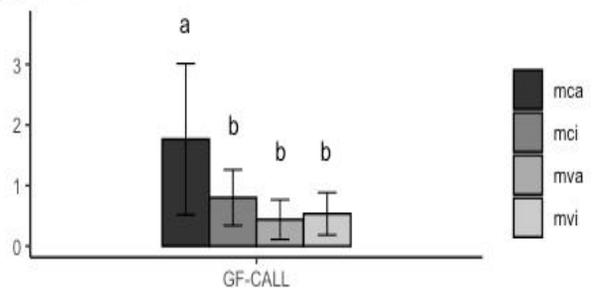
12 OC-CALL



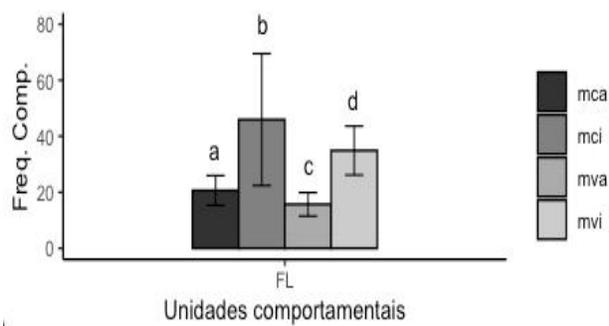
13 SP-CALL



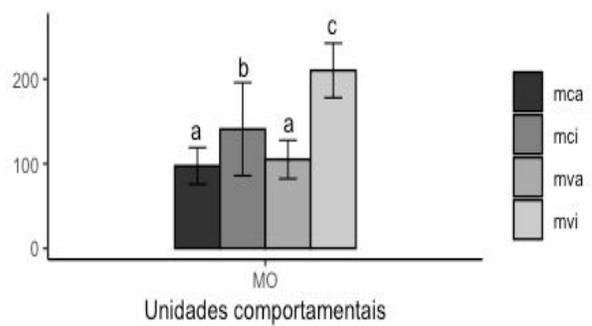
14 GF-CALL



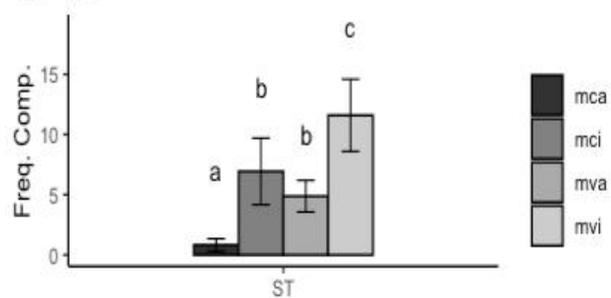
15 FL



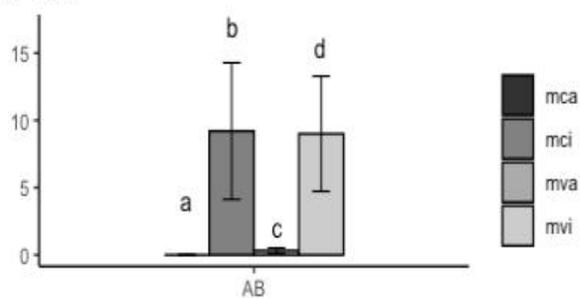
16 MO



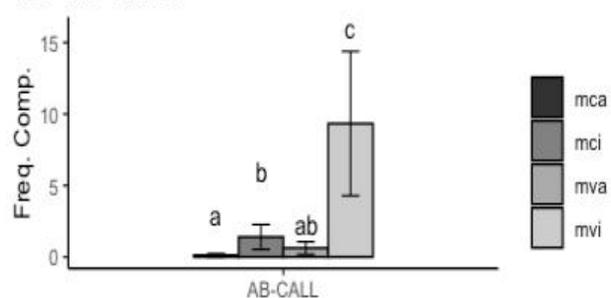
17 ST



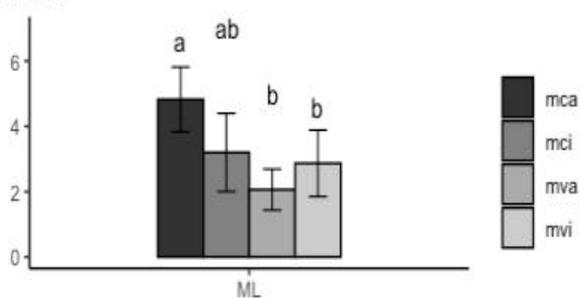
18 AB



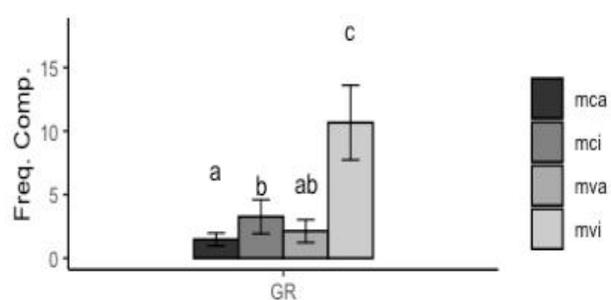
19 AB-CALL



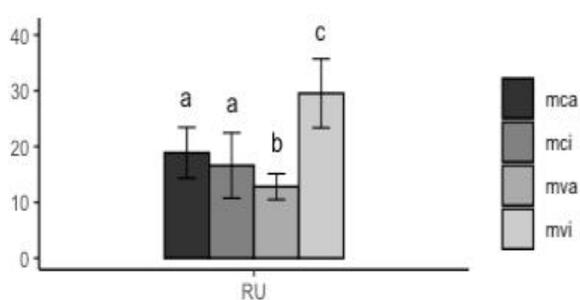
20 ML



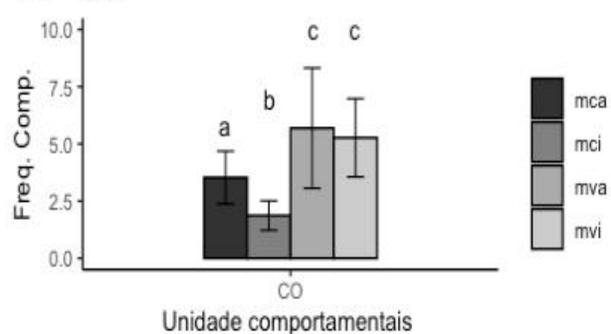
21 GR



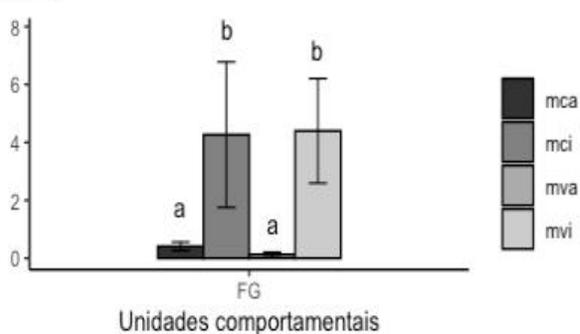
22 RU



23 CO



24 FG



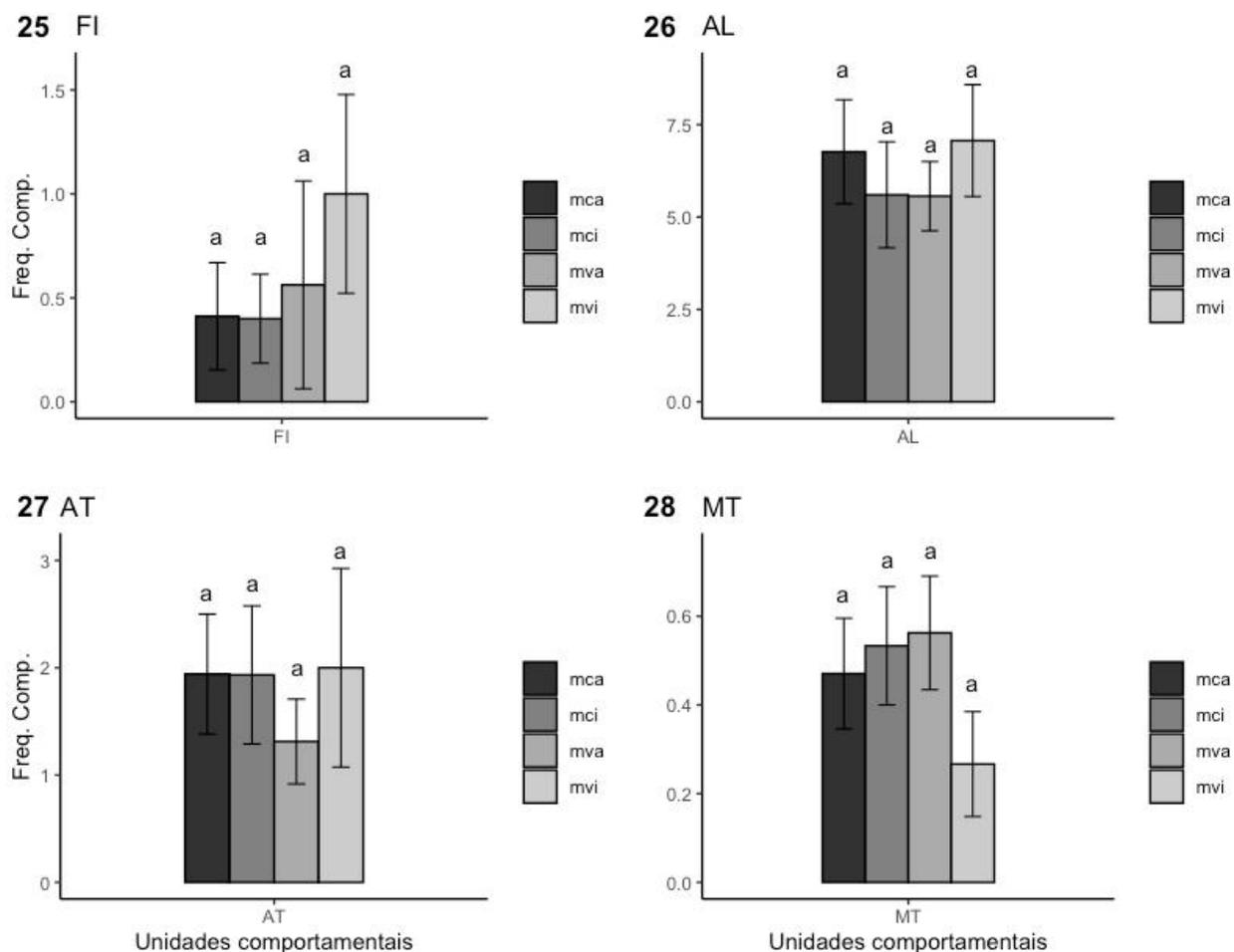
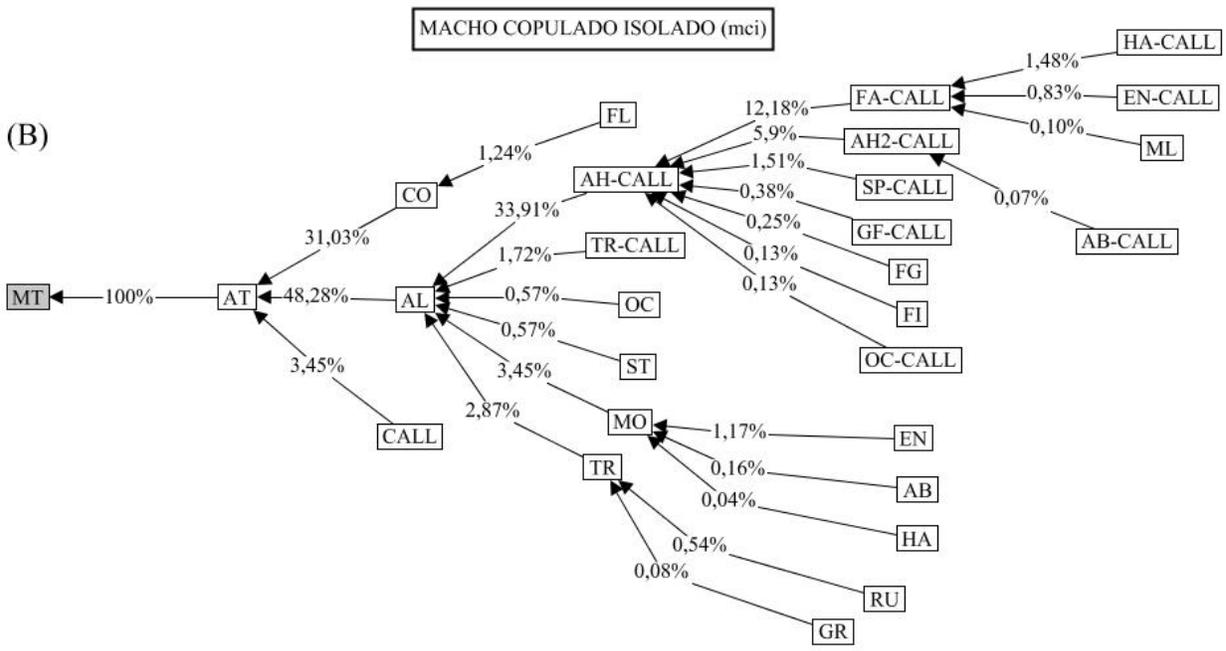
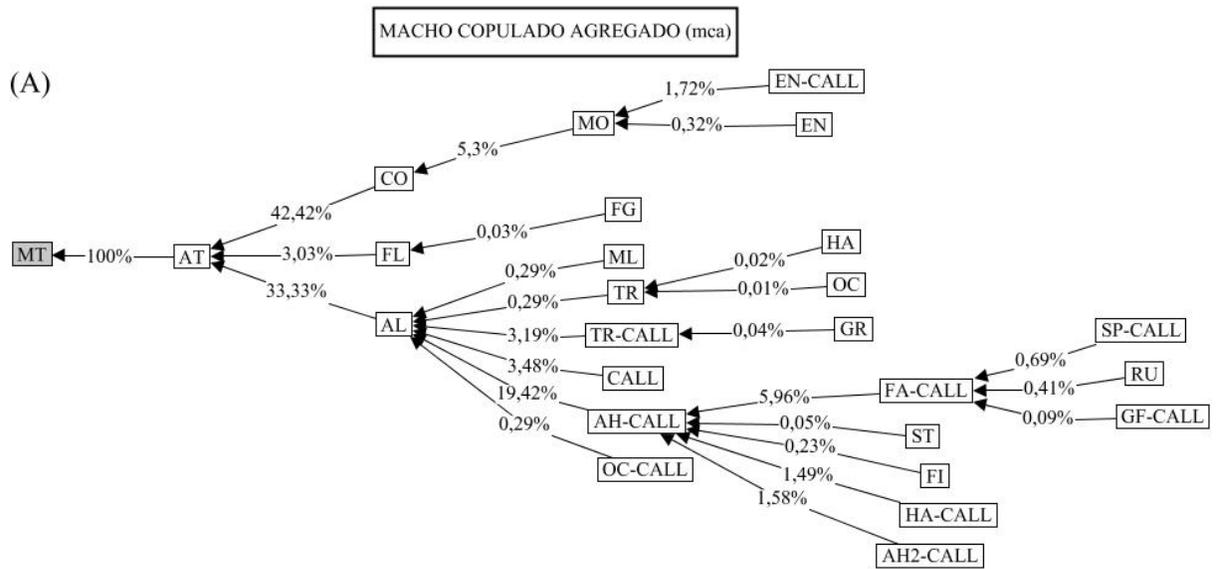


Figura 5. Média das frequências das unidades comportamentais para cada tratamento de macho testado. Barras seguidas de letras diferentes indicam diferença estatística: 1 a 24 =  $P < 0,05$ . As unidades comportamentais de 25 a 28 não resultaram em diferenças estatísticas: **FI**:  $H_{3,63} = 0,048$ ,  $P = 0,063$ ; **AL**:  $H_{3,63} = <0,001$ ,  $P = 0,21$ ; **AT**:  $H_{3,63} = <0,001$ ,  $P = 0,43$ ; **MT**:  $H_{3,63} = 0,038$ ,  $P = 0,639$ .

As unidades comportamentais que mais contribuíram para a ocorrência da cópula nos diferentes tratamentos foram: (A) machos copulados agregados (mca): AT, CO, FL, AL, MO, EN-CALL, AH1-CALL, FA-CALL, CALL; (B) machos copulados isolados (mci): AT, CO, AL, MO, AH1-CALL, FA-CALL, CALL; (C) machos virgens agregados (mva): AT, CO, AL, MO, AH1-CALL, CALL; (D) machos virgens isolados (mvi): AT, CO, FL, AL, MO, AH1-CALL (Figura 6).



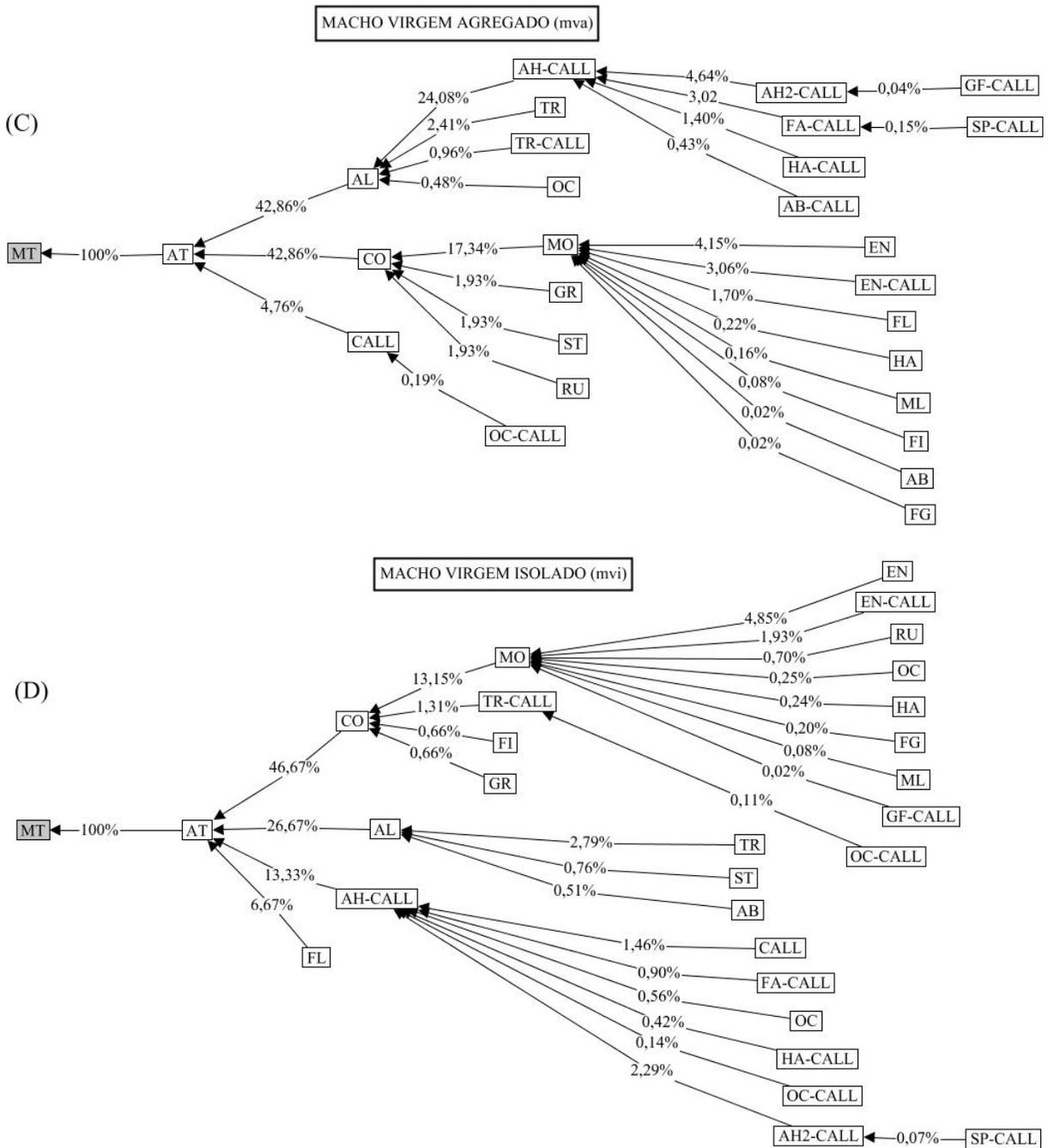


Figura 6. Sequências geradas por árvores comportamentais probabilísticas (TGSs) que resultaram em uma cópula bem sucedida (terminaram em *mating*- MT). As porcentagens são as probabilidades de cada caminho. À medida que o caminho se afasta da ocorrência do *mating* (MT), menores são os percentuais das rotinas comportamentais.

Todas as unidades comportamentais estavam presentes em todos os tratamentos. O *attempt* (AT) esteve presente sempre antes do *mating* (MT) para todos os tratamentos. *Contact* (CO) e *alignment* (AL), foram unidades comportamentais que precederam o *attempt* (AT) em

todos os tratamentos. *Flying* (FL) precedeu *Attempt* apenas em mca e mvi; *Calling* (CALL) precedeu *attempt* apenas em mci e mva e *Arrowhead 1* (AH1-CALL), precedeu *attempt* apenas no tratamento mvi (Figura 7).

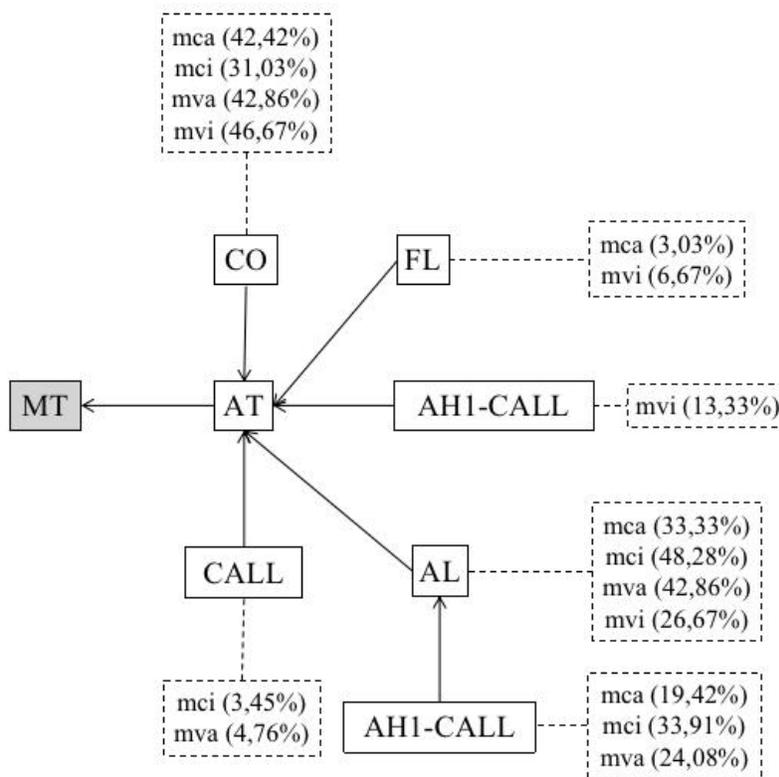
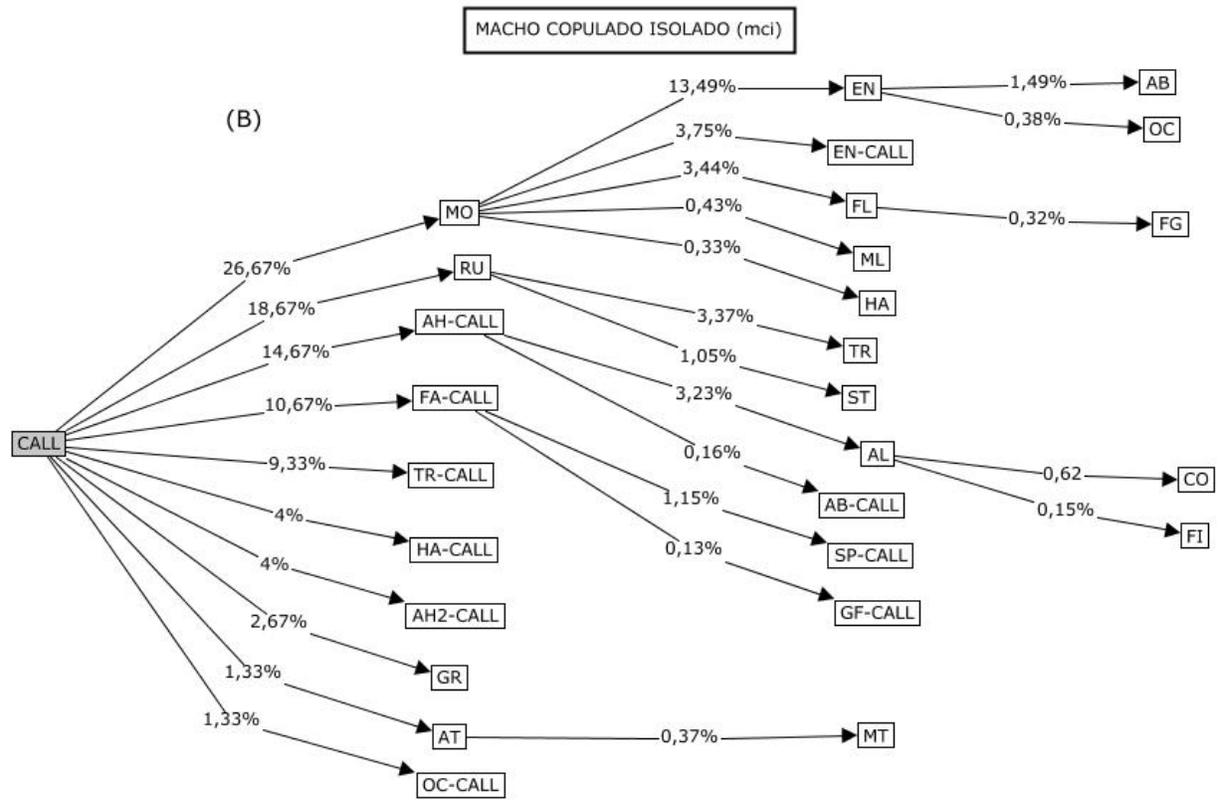
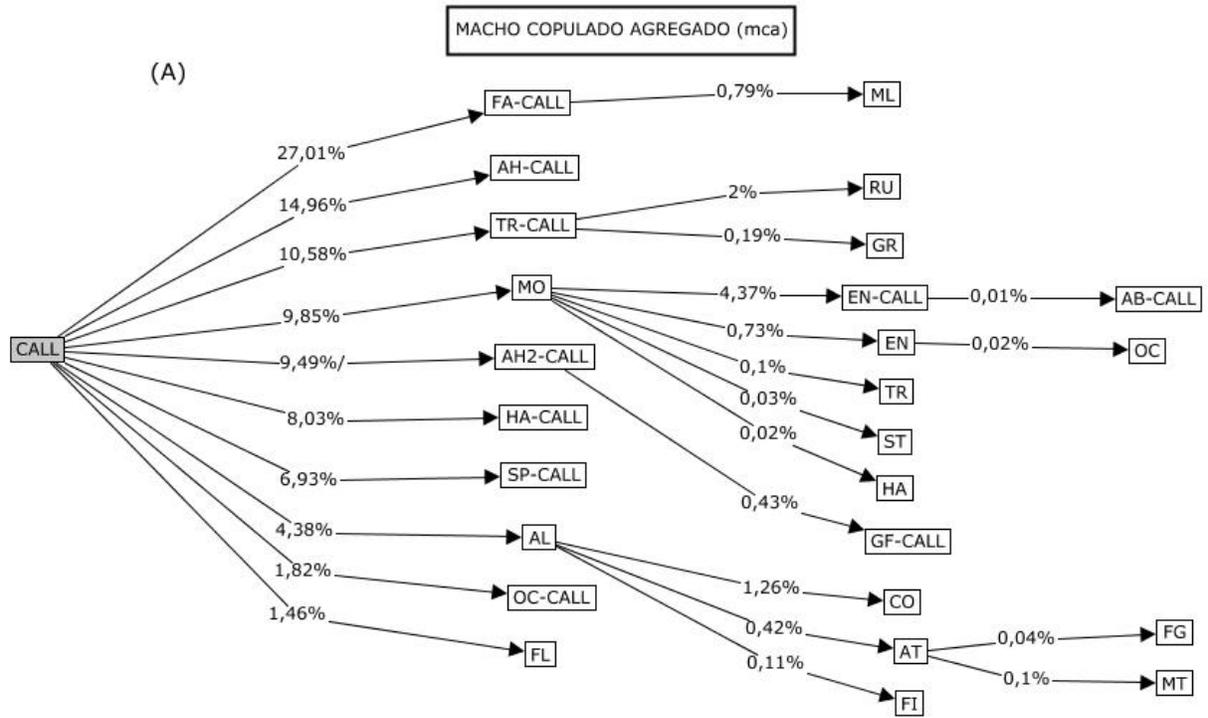


Figura 7. Árvore probabilística criada pelo Ethoseq mostrando as cinco unidades comportamentais mais frequentes que precedem a rotina AT > MT para todos os tratamentos testados.

A Figura 8 representa as árvores com os caminhos prováveis para os diferentes tratamentos, começando a partir do *calling* (CALL). As unidades comportamentais mais associadas ao CALL em todos os tratamentos foram: FA-CALL, AH1-CALL, TR-CALL, MO, AH2-CALL, HA-CALL, OC-CALL.



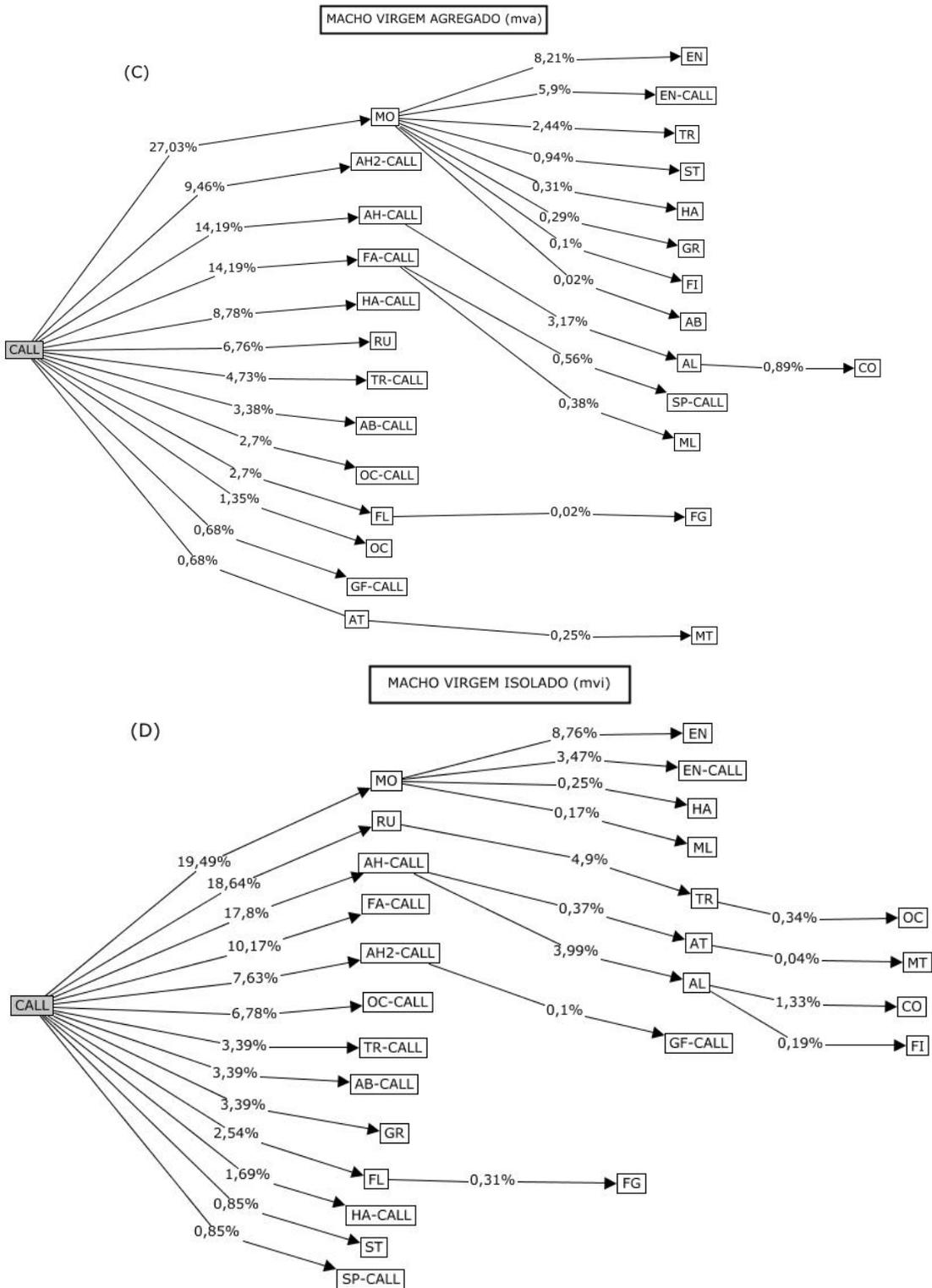


Figura 8. Sequências geradas por árvores comportamentais probabilísticas (TGSs) que começaram em *calling* (CALL). As porcentagens são as probabilidades de cada caminho. À medida que o caminho se afasta do *calling* menores são os percentuais das rotinas comportamentais.

## Discussão

Nesse trabalho, foram realizados bioensaios com o objetivo de testar a competitividade e o comportamento de corte de machos da mosca-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Weidemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). Para isso foram testados quatro diferentes tratamentos de machos, de acordo com interações sociais (machos em grupos ou isolados durante o período de amadurecimento sexual) ou experiência sexual (virgens ou previamente acasalados).

Nos experimentos conduzidos para testar a competitividade dos machos de diferentes tratamentos, foi observado que machos mantidos agregados durante o período de amadurecimento sexual, obtiveram mais cópulas em relação a machos que foram mantidos isolados durante o mesmo período (Figura 3A,  $mca \times mci$ ;  $mva \times mvi$ ;  $mca \times mvi$ ). O maior sucesso dos machos que foram mantidos agregados pode ter sido causado por benefícios ligados a possibilidade da interação entre eles, como por exemplo, durante o comportamento de lek, podendo tornar os machos mais competitivos na presença de fêmeas (Segura et al., 2007). Além disso, machos mantidos agregados podem manter interações competitivas, especialmente considerando o acasalamento, proporcionando até mesmo uma melhora cognitiva relacionada a memória olfativa e visual (Rouse et al., 2020). Outro fator importante é que a interação entre os machos agregados pode afetar diretamente a composição de sua microbiota, alterando sinalizações químicas e até mesmo tendo efeitos no sistema nervoso dos machos (Archie e Tung, 2015) e conseqüentemente seu comportamento sexual. Insetos mantidos em grupos mostraram também um desenvolvimento mais rápido, e um maior investimento na reprodução, o que pode afetar diretamente o sucesso na corte (Uzsák e Schal, 2013; Schausberger et al., 2017). Em contrapartida, insetos mantidos em isolamento apresentaram um sucesso de corte menor. Observou-se uma maior frequência de comportamento agressivo nos machos virgens isolados, apesar de não ter havido uma diferença estatística quando comparado com os outros tratamentos de machos (Figura 5.25). Entretanto, o isolamento social pode causar um aumento de comportamentos agressivos que afetam diretamente o sucesso da corte (Kuriwada, 2016).

Observou-se que machos que tiveram uma experiência sexual prévia com fêmeas (isolados ou agregados) não apresentaram um número significativamente maior de cópulas subsequentes quando pareados com machos que não tiveram essa mesma experiência (inexperientes) (Figura 3B,  $mca \times mva$ ;  $mci \times mvi$ ). A experiência prévia de cópula do macho

mantido isolado na combinação *mci* × *mva* parece ter proporcionado alguma vantagem competitiva em relação aos machos que foram mantidos agregados com outros durante o período de amadurecimento sexual. Resultados similares foram encontrados em Ekanayake et al. (2017), Shelly (2018) e Iglesias-Carrasco et al. (2019). Isso é surpreendente considerando que diversos estudos têm demonstrado que machos sexualmente experientes conseguem copular com mais fêmeas quando competem diretamente com machos inexperientes (Milonas et al., 2011; Saleem et al., 2014), em casos similares aos testes realizados nesse trabalho. Entretanto, aprender a partir de uma experiência sexual com uma fêmea e usar essa aprendizagem em acasalamentos futuros, pode ter custos para os machos como diminuição do sucesso reprodutivo, afetando o número da prole, e maior gasto metabólico (Johnston, 1982; Burns et al., 2011). Habilidade de aprendizagem foi também associada a um declínio da competitividade larval em *Drosophila melanogaster* (Mery e Kawecki, 2003). Nesse caso, é possível que seja mais vantajoso para os machos manterem comportamentos inatos ao invés de comportamentos aprendidos com novas experiências, para assim reduzir os custos envolvidos no processo de aprendizagem. Além disso, aprendizagem pode ser benéfica quando sinais e qualidade dos parceiros sexuais variam entre locais e ao longo do tempo (Dukas, 1998, Stephens 1991), o que pode não ter sido proporcionado pelas condições apresentadas em laboratório.

O tamanho das sequências comportamentais dos diferentes tratamentos de machos foi contabilizado a partir do número de unidades comportamentais no final de uma filmagem de no máximo 30 minutos, ou até ocorrer a cópula. A baixa taxa de sucesso de corte dos machos virgens isolados (26,66%) acarretou filmagens mais longas e conseqüentemente, esses machos apresentaram uma sequência comportamental maior quando comparados com os outros tratamentos de machos (Figura 4). Porém, uma sequência comportamental maior não significa necessariamente que haverá sucesso na corte. Os *mvi* apresentaram uma maior frequência de unidades comportamentais que não estão associadas a emissão de feromônios sexuais (EN, HA, TR, OC, MO, ST, AB, GR, RU, FG, FI). A composição desses feromônios varia entre diferentes populações de *A. fraterculus* (Břízová et al., 2013), e o isolamento a qual o tratamento *mvi* foi submetido pode também ter modificado a sensibilidade de determinados neurônios aos seus ligantes de feromônios (Sethi et al., 2019) levando assim a uma diminuição na vantagem competitiva de corte dos *mvi*. Em relação aos comportamentos *mobile* (Figura 5.16) e *falling* (Figura 5.24) que apresentaram baixa frequência nos machos virgens agregados (*mva*) e machos

copulados agregados (mca), observou-se que estes realizam comportamentos mais ativos na corte. Machos isolados (virgens ou copulados), apresentaram maior frequência de comportamento de *falling*, o que pode ter ocorrido devido ao ambiente em que foram mantidos durante o período de amadurecimento sexual ter afetado sua capacidade de pouso. Machos virgens isolados também apresentaram uma maior frequência da unidade comportamental *mobile* (Figura 5.16), o que ocorre também para *Drosophila melanogaster* (Liu et al., 2018), e maior frequência de comportamentos agonísticos (*fight*) (Wang et al., 2008; Dankert et al., 2009). Esses trabalhos destacam a importância da experiência social e feromônios em regular os comportamentos sexuais em moscas-das-frutas.

As unidades comportamentais que mais contribuíram para o sucesso das cortes em todos os tratamentos foram AT, CO, AL, AH1-CALL (Figura 6). Isso corrobora com os resultados encontrados em Roriz et al. (2019), já que o morfotipo estudado é o mesmo. Foi observado que essas rotinas se mantiveram mais frequentes no final da corte. Além disso, os machos isolados foram capazes de realizar todas as unidades comportamentais mesmo sendo mantidos em completo isolamento desde o momento da emergência e isso pode estar relacionado ao gene *fru*, que está presente em tefritídeos e tem diversas funções como controle do comportamento de corte dos machos, pela conexão de neurônios com componentes relacionados a fertilidades, pelo reconhecimento do sexo de outros indivíduos e pela realização da cópula (Ito et al., 1996; Lee et al., 2001; Billeter et al., 2006; Datta et al., 2008).

A unidade comportamental *calling* (CALL), foi escolhida para iniciar as sequências comportamentais dos machos dos quatro tratamentos, pois se trata da unidade mais básica de emissão de feromônios, que indica que os machos estão prontos para acasalar com as fêmeas. Esse comportamento está presente em todos os tratamentos e filmagens (com ou sem cópula no final). Nas árvores probabilísticas iniciadas com *calling* (CALL), foi possível observar que existem comportamentos diretamente associados a emissão de feromônios que estão presente em todos os tratamentos, como por exemplo FA-CALL, AH1-CALL, TR-CALL, AH2-CALL, HA-CALL e OC-CALL, mas que variaram em relação a frequência com que ocorreram em cada tratamentos testados. Assim, foi possível observar que os prováveis caminhos partindo do *calling* não sofreram alterações devido ao tipo de tratamento testado. Sugere-se aqui que a baixa taxa de

acasalamento dos machos isolados seja devido a alterações sofridas nos feromônios devido ao isolamento forçado.

A experiência sexual prévia não causou mudanças na sequência comportamental dos machos de forma a proporcionar uma vantagem em cópulas futuras e fica sugerido aqui que nesse caso a aprendizagem seria um fator de alto custo aos machos considerando as condições não variáveis de laboratório. Em contrapartida, os machos que permaneceram agregados durante o período de amadurecimento sexual, apresentaram uma vantagem em relação àqueles que foram mantidos isolados, e isso pode ter acontecido devido a interações e sinalizações químicas trocadas entre os machos. Esses resultados são promissores e podem auxiliar na implantação da Técnica do Inseto Estéril para *Anastrepha fraterculus* no Brasil, considerando que essa técnica depende da criação de milhões de machos estéreis em laboratório. É possível entender melhor o comportamento sexual desses machos e que eles podem usar informações obtidas a partir de interações sociais com outros machos para melhorar sua performance sexual com o objetivo de conseguir acasalar com mais fêmeas em cortes subsequentes. Fica aqui sugerido que mais estudos sejam realizados comparando diversas densidades de machos e como isso pode alterar a sua performance sexual, tanto em experimentos de filmagem e competitividade quanto em experimentos realizados em gaiolas de campo. A partir do conhecimento obtido nesses bioensaios, sugere-se também partir para estudos mais aprofundados do comportamento sexual de machos esterilizados em laboratório, já que são esses que serão posteriormente liberados em campo para competirem com os selvagens.

## Referências

- Aluja M, Piñero J, Jácome I, Díaz-Fleischer F, Sivinski J., 1999. Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini). In: Aluja M, Norrbom A (eds) Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior. CRC Press, Boca Raton, pp 375–406
- Aluja, M., 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. Annual review of entomology, 39(1), 155-178.
- Aluja, M., & Birke, A., 1993. Habitat use by adults of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in a mixed mango and tropical plum orchard. Annals of the Entomological Society of America, 86(6), 799-812.
- Aluja, M. and Mangan, R.L., 2008. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. Annual Review of Entomology, 53, 473–502
- Archie, E. A., & Tung, J., 2015. Social behavior and the microbiome. Current opinion in behavioral sciences, 6, 28-34.
- Bachmann, G. E., Segura, D. F., Devescovi, F., Juárez, M. L., Ruiz, M. J., Vera, M. T., ... & Fernández, P. C., 2015. Male sexual behavior and pheromone emission is enhanced by exposure to guava fruit volatiles in *Anastrepha fraterculus*. PLoS One, 10(4), e0124250.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R. H. B., Singmann, H., ... & Bolker, M. B., 2015. Package 'lme4'. Convergence, 12(1), 2.
- Billeter, J. C., Villella, A., Allendorfer, J. B., Dornan, A. J., Richardson, M., Gailey, D. A., & Goodwin, S. F., 2006. Isoform-specific control of male neuronal differentiation and behavior in *Drosophila* by the fruitless gene. Current Biology, 16(11), 1063-1076.
- Bosa, C. F., Cruz - López, L., Zepeda - Cisneros, C. S., Valle - Mora, J., Guillén - Navarro, K., & Liedo, P. (2016). Sexual behavior and male volatile compounds in wild and mass - reared strains of the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) held under different colony management regimes. Insect Science, 23(1), 105-116.

- Bretman, A., Fricke, C., & Chapman, T., 2009. Plastic responses of male *Drosophila melanogaster* to the level of sperm competition increase male reproductive fitness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276 (1662), 1705-1711.
- Břízová, R., Mendonça, A. L., Vanícková, L., Mendonça, A. L., Da Silva, C. E., Tomčala, A., ... & Do Nascimento, R. R., 2013. Pheromone analyses of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. *Florida Entomologist*, 96(3), 1107-1115.
- Clarke, A. R., Powell, K. S., Weldon, C. W., & Taylor, P. W., 2011. The ecology of *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae): what do we know to assist pest management?. *Annals of Applied Biology*, 158(1), 26-54.
- Dankert, H., Wang, L., Hoopfer, E. D., Anderson, D. J., & Perona, P., 2009. Automated monitoring and analysis of social behavior in *Drosophila*. *Nature methods*, 6(4), 297-303.
- Datta, S. R., Vasconcelos, M. L., Ruta, V., Luo, S., Wong, A., Demir, E., ... & Axel, R., 2008. The *Drosophila* pheromone cVA activates a sexually dimorphic neural circuit. *Nature*, 452(7186), 473-477.
- Dias, V. S., Silva, J. G., Lima, K. M., Petitinga, C. S., Hernandez-Ortiz, V., Laumann, R. A., ... & Joachim-Bravo, I. S., 2016. An integrative multidisciplinary approach to understanding cryptic divergence in Brazilian species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 117(4), 725-746.
- Dyck, V. A., Hendrichs, J., & Robinson, A. S., 2021. Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management (p. 114). Taylor & Francis.
- Dukas, R., 1998. Evolutionary ecology of learning. In: R. Dukas (Ed.), *Cognitive Ecology*, pp. 129-174. Chicago: University of Chicago Press.
- Dukas, R., 2005. Experience improves courtship in male fruit flies. *Animal Behaviour*, 69(5), 1203-1209.
- Dukas, R., 2005a. Learning affects mate choice in female fruit flies. *Behavioral Ecology*, 16(4), 800-804.

Eban-Rothschild, A., & Bloch, G., 2012. Social influences on circadian rhythms and sleep in insects. *Advances in genetics*, 77, 1-32.

Ekanayake, E. W. M. T. D., Clarke, A. R., & Schutze, M. K., 2017. Effect of body size, age, and premating experience on male mating success in *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Journal of economic entomology*, 110(5), 2278-2281.

Ellis, L. L., & Carney, G. E., 2010. Mating alters gene expression patterns in *Drosophila melanogaster* male heads. *BMC genomics*, 11(1), 1-14.

Enkerlin, W. R. (2021). Impact of fruit fly control programmes using the sterile insect technique. In *Sterile insect technique* (pp. 979-1006). CRC Press.

Finney, G. L., 1956. A fortified carrot medium for mass-culture of the oriental fruit fly and certain other Tephritids. *Journal of Economic Entomology*, 49(1), 134-134.

Fox, J., Weisberg, S., Adler, D., Bates, D., Baud-Bovy, G., Ellison, S., ... & Heiberger, R., 2012. Package 'car'. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Gomez-Cendra P., Calcagno G., Belluscio L., Vilardi S.J.C., 2011. Male courtship behavior of the south American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, from an Argentinean laboratory strain. *J Insect Sci* 11:1–18

Hendrichs, J., Vreysen, M. J. B., Enkerlin, W. R., & Cayol, J. P., 2021. Strategic options in using sterile insects for area-wide integrated pest management. In *Sterile Insect Technique* (pp. 841-884). CRC Press.

Hernández-Ortiz, V., Barradas-Juanz, N., & Díaz-Castelazo, C. (2019). A review of the natural host plants of the *Anastrepha fraterculus* complex in the Americas. *Area-wide management of fruit fly pests*, 89-122.

Hernández-Ortiz, V., Bartolucci, A. F., Morales-Valles, P., Frías, D., & Selivon, D., 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(2), 305-318.

Hothorn, T., F. Bretz, and P. Westfall., 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom. J.* 50: 346–363.

Ito, H., Fujitani, K., Usui, K. A. Z. U. E., Shimizu-Nishikawa, K., Tanaka, S., & Yamamoto, D., 1996. Sexual orientation in *Drosophila* is altered by the satori mutation in the sex-determination gene fruitless that encodes a zinc finger protein with a BTB domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9687-9692.

Japvasú, H. F., Alberts, C. C., Izar, P., & Sato, T., 2006. EthoSeq: a tool for phylogenetic analysis and data mining in behavioral sequences. *Behavior research methods*, 38(4), 549-556.

Johnston, T. D., 1982. Selective costs and benefits in the evolution of learning. *Advances in the Study of Behavior*, 12, 65-106

Kadow, I. C. G., 2019. State-dependent plasticity of innate behavior in fruit flies. *Current opinion in neurobiology*, 54, 60-65.

Krupp, J. J., Kent, C., Billeter, J. C., Azanchi, R., So, A. K. C., Schonfeld, J. A., ... & Levine, J. D., 2008. Social experience modifies pheromone expression and mating behavior in male *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 18(18), 1373-1383.

Kuriwada, T., 2016. Social isolation increases male aggression toward females in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Population ecology*, 58(1), 147-153.

Lance, D. R., & McInnis, D. O., 2005. Biological basis of the sterile insect technique. *Sterile Insect Technique*, 69-94.

Lee, G., Villella, A., Taylor, B. J., & Hall, J. C., 2001. New reproductive anomalies in fruitless - mutant *Drosophila* males: Extreme lengthening of mating durations and infertility correlated with defective serotonergic innervation of reproductive organs. *Journal of neurobiology*, 47(2), 121-149.

Lin, C. C., Prokop-Prigge, K. A., Preti, G., & Potter, C. J., 2015. Food odors trigger *Drosophila* males to deposit a pheromone that guides aggregation and female oviposition decisions. *Elife*, 4, e08688.

Liu, G., Nath, T., Linneweber, G. A., Claeys, A., Guo, Z., Li, J., ... & Hassan, B. A., 2018. A simple computer vision pipeline reveals the effects of isolation on social interaction dynamics in *Drosophila*. PLoS computational biology, 14(8), e1006410.

Lone, S. R., & Sharma, V. K., 2011. Social synchronization of circadian locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Journal of Experimental Biology, 214(22), 3742-3750.

Lu, F., & Teal, P. E. A., 2001. Sex pheromone components in oral secretions and crop of male Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Loew). Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, 48(3), 144-154.

Mery, F., & Kawecki, T. J., 2003. A fitness cost of learning ability in *Drosophila melanogaster*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(1532), 2465-2469.

Mery, F., & Kawecki, T. J., 2003. A fitness cost of learning ability in *Drosophila melanogaster*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(1532), 2465-2469.

Milonas, P. G., Farrell, S. L., & Andow, D. A., 2011. Experienced males have higher mating success than virgin males despite fitness costs to females. Behavioral Ecology and Sociobiology, 65(6), 1249-1256.

Palmer, C. R., & Kristan Jr, W. B., 2011. Contextual modulation of behavioral choice. Current opinion in neurobiology, 21(4), 520-526.

Pereira, R., Yuval, B., Liedo, P., Teal, P. E. A., Shelly, T. E., McInnis, D. O., & Hendrichs, J., 2013. Improving sterile male performance in support of programmes integrating the sterile insect technique against fruit flies. Journal of Applied Entomology, 137, 178-190.

Polejack, A., & Tidon, R., 2007. Learning of courtship components in *Drosophila mercatorum* (Paterson & Wheller)(Diptera, Drosophilidae). Revista Brasileira de Entomologia, 51(1), 82-86.

- Robacker, D.C., Hart, W., 1985. Courtship and territoriality of laboratory-reared Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae) in cages containing host and nonhost trees. *Ann Entomol Soc Am* 78:488–494
- Robinson, A. S., 2002. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitidis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica*, 116(1), 5-13.
- Roriz, A. K. P., Japyassú, H. F., & Joachim-Bravo, I. S., 2018. Courtship in two morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex and their implications for understanding mate recognition. *Journal of insect behavior*, 31(5), 535-551.
- Roriz, A. K. P., Japyassú, H. F., Cáceres, C., Vera, M. T., & Joachim-Bravo, I. S., 2019. Pheromone emission patterns and courtship sequences across distinct populations within *Anastrepha fraterculus* (Diptera-Tephritidae) cryptic species complex. *Bulletin of entomological research*, 109(3), 408-417.
- Rouse, J., McDowall, L., Mitchell, Z., Duncan, E. J., & Bretman, A., 2020. Social competition stimulates cognitive performance in a sex-specific manner. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1935), 20201424.
- Saleem, S., Ruggles, P. H., Abbott, W. K., & Carney, G. E., 2014. Sexual experience enhances *Drosophila melanogaster* male mating behavior and success. *PloS one*, 9(5), e96639.
- Sarin, S., & Dukas, R., 2009. Social learning about egg-laying substrates in fruitflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1677), 4323-4328.
- Schausberger, P., Gratzer, M., & Strodl, M. A., 2017. Early social isolation impairs development, mate choice and grouping behaviour of predatory mites. *Animal behaviour*, 127, 15-21.
- Segura, D., Petit-Marty, N., Sciurano, R., Vera, T., Calcagno, G., Allinghi, A., ... & Vilardi, J., 2007. Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 90(1), 154-162.
- Segura, D., Petit-Marty, N., Sciurano, R., Vera, T., Calcagno, G., Allinghi, A., ... & Vilardi, J., 2007. Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 90(1), 154-162.

- Sethi, S., Lin, H. H., Shepherd, A. K., Volkan, P. C., Su, C. Y., & Wang, J. W., 2019. Social context enhances hormonal modulation of pheromone detection in *Drosophila*. *Current Biology*, 29(22), 3887-3898.
- Shelly, T. E., 2018. Does Male Sexual Experience Influence Female Mate Choice and Reproduction in the Melon Fly (Diptera: Tephritidae)?. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 50, 35-41.
- Silva Neto, A. M. D., Santos, T. R. D. O., Dias, V. S., Joachim-Bravo, I. S., Benevides, L. D. J., Benevides, C. M. D. J., ... & Walder, J. M. M., 2012. Mass-rearing of Mediterranean fruit fly using low-cost yeast products produced in Brazil. *Scientia Agricola*, 69(6), 364-369.
- Sivinski, J. M., Epsky, N., & Heath, R. R., 1994. Pheromone deposition on leaf territories by male Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Loew)(Diptera: Tephritidae). *Journal of insect behavior*, 7(1), 43-51.
- Stephens, D. W., 1991. Change, regularity, and value in the evolution of animal learning. *Behavioral Ecology*, 2(1), 77-89.
- Tanaka, N., Steiner, L. F., Ohinata, K., & Okamoto, R., 1969. Low-cost larval rearing medium for mass production of oriental and Mediterranean fruit flies. *Journal of Economic Entomology*, 62(4), 967-968.
- Uzsák, A., & Schal, C., 2013. Sensory cues involved in social facilitation of reproduction in *Blattella germanica* females. *PLoS One*, 8(2), e55678.
- Vaničková, L., Hernández-Ortiz, V., Bravo, I. S. J., Dias, V., Roriz, A. K. P., Laumann, R. A., ... & do Nascimento, R. R., 2015. Current knowledge of the species complex *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) in Brazil. *Zookeys*, (540), 211.
- Vera, M.T., Cáceres, C., Wornoayporn, V., Islam, A., Robinson, A.S., De La Veja, M.H., Hendrichs, J., Cayol, J.P., 2006. Mating incompatibility among populations of the south American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Ann Entomol Soc Am* 99:387–397
- Villella, A., & Hall, J. C., 2008. Neurogenetics of courtship and mating in *Drosophila*. *Advances in genetics*, 62, 67-184.

Wang, L., Dankert, H., Perona, P., & Anderson, D. J., 2008. A common genetic target for environmental and heritable influences on aggressiveness in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5657-5663.

## **Anexo 1**

### **Protocolos de criação das moscas em laboratório**

Goiabas adquiridas no mercado local (Apipão) foram usadas como recurso de oviposição para fêmeas sexualmente maduras e alimento larval até a geração F50. O protocolo de adaptação das moscas às condições artificiais consistiu no uso de um dispositivo para coleta de ovos e alimentação dos imaturos com dieta artificial de cenoura. Os ovos depositados por fêmeas sexualmente maduras foram coletados do dispositivo de silicone contendo água, posicionado em cima das gaiolas de criações dos adultos. Posteriormente, os ovos foram transferidos para uma placa de Petri (150x25mm) contendo dieta larval artificial composta de pó de cenoura (86,5g), cenoura cozida (282g), lêvedo (67,7g), gérmen de trigo (22,5g), açúcar (45,1g), benzoato de sódio (3g), nipagin (0,97g), água (1100ml) e HCL (3ml) (Finney, 1956; Tanaka et al., 1969). As placas de Petri contendo dieta foram cobertas com voil, para evitar contaminação por outras populações de *A. fraterculus* e garantir o controle da umidade.

## **Anexo 2**

### **Experimento preliminar de pico de atividade sexual**

Um teste preliminar foi realizado com o objetivo de determinar quais idades os machos têm maior propensão para acasalamentos. Esse teste foi necessário para que os experimentos de competitividade sexual e filmagens pudessem ser realizados com as moscas nas idades corretas. Machos e fêmeas recém emergidos foram separados em gaiolas plásticas (31 × 21 × 19 cm) contendo água e dieta *ad libidum*. Seis dias após a emergência dos adultos, 15 machos e 15 fêmeas foram coletados com o auxílio de um tubo de ensaio e transferidos para uma gaiola de acrílico (34 × 23 × 22 cm). Os insetos foram observados das 06:00h às 09:00h. O número de casais formados foi registrado em experimentos independentes com moscas de 6 aos 16 dias de idade. Foram realizadas 5 réplicas, utilizando um total de 165 machos e 165 fêmeas por réplica. A análise estatística utilizada foi o Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM) com distribuição binomial e função de ligação logit.

### **Resultados do experimento preliminar**

Moscas nas idades de 10 e 11 dias, apresentaram o maior pico de atividade sexual, quando comparados com os outros dias testados (Figura 8). Dessa forma, para os experimentos de competitividade sexual e filmagens foram usados moscas nessas idades.

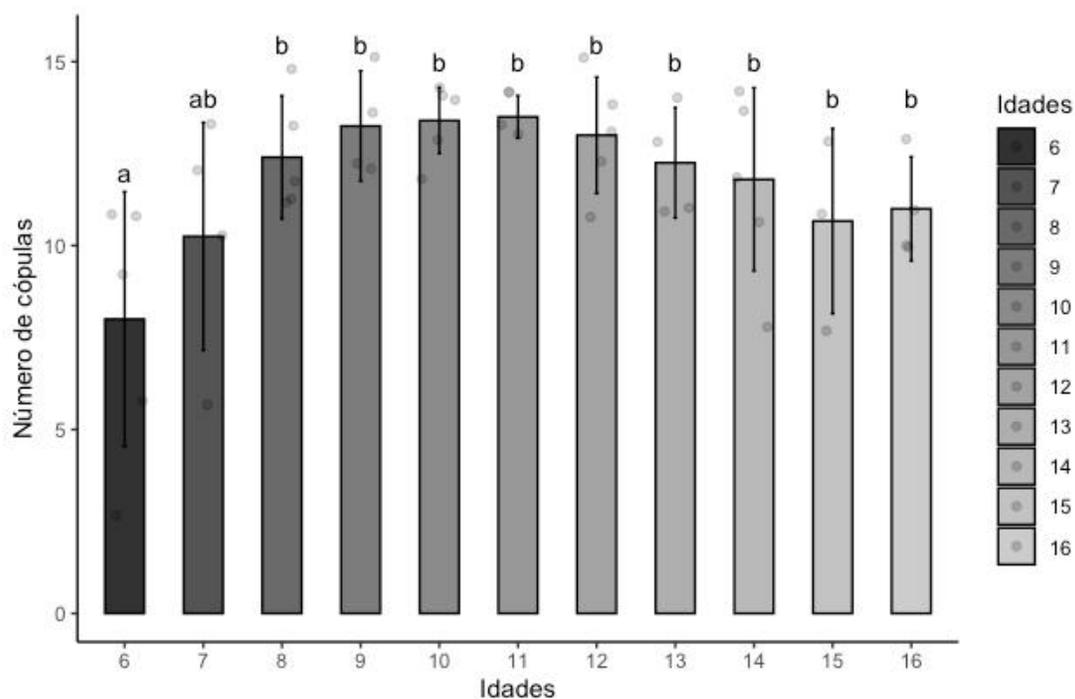


Figura 7. Média do número de casais obtidos nos diferentes dias (6 a 16 dias). Barras seguidas de letras diferentes indicam diferença estatística ( $H_{5,825} = 0,672$ ,  $P < 0,001$ ). Moscas nas idades de 10 e 11 dias apresentaram aproximadamente o mesmo número de acasalamentos

### Anexo 3

Foi realizada uma análise estatística para cada unidade comportamental (Tabela 2). A maioria das unidades apresentaram diferença estatística entre si, exceto *fight* (FI), *alignment* (AL), *attempt* (AT) e *mating* (MT)

Tabela 2. Resultados do Modelo Linear Generalizado Misto realizado para cada unidade comportamental

Unidade comportamental	Análise Estatística <sup>1</sup>	Unidade comportamental	Análise Estatística <sup>1</sup>
1. CALL	$H_{3,63} < 0,001$ , $P < 0,001$	2. FA-CALL	$H_{3,63} < 0,001$ , $P < 0,001$

3. EN	$H_{3,63}=0,034$ , $P=<0,001$	4. EN-CALL	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$
5. HA	$H_{3,63}=0,023$ , $P=<0,001$	6. HA-CALL	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$
7. TR	$H_{3,63}=0,948$ , $P=<0,001$	8. TR-CALL	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$
9. AH1-CALL	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$	10. AH2-CALL	$H_{3,63}<0,001$ , $P=0,031$
11. OC	$H_{3,63}=0,667$ , $P=<0,001$	12. OC-CALL	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$
13. SP-CALL	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$	14. GF-CALL	$H_{3,63}<0,848$ , $P=<0,001$
15. FL	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$	16. MO	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$
17. ST	$H_{3,63}<0,276$ , $P=<0,001$	18. AB	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$
19. AB-CALL	$H_{3,63}<0,019$ , $P=<0,001$	20. ML	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$
21. GR	$H_{3,63}<0,581$ , $P=<0,001$	22. RU	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$
23. CO	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,001$	24. FG	$H_{3,63}<0,044$ , $P=<0,001$
25. FI	$H_{3,63}=0,048$ , $P=0,063$	26. AL	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,21$
27. AT	$H_{3,63}<0,001$ , $P=<0,43$	28. MT	$H_{3,63}<0,038$ , $P=<0,639$