

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E BIOLOGIA EVOLUTIVA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS**

**ESTUDOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DA INTERAÇÃO ENTRE
NEPHILA CLAVIPES (ARANEAE, NEPHILIDAE) E O PARASITOIDE
HYMENOEPIMECIS BICOLOR (HYMENOPTERA, ICHNEUMONIDAE,
PIMPLINAE)**

JOBER FERNANDO SOBCZAK

São Carlos

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E BIOLOGIA EVOLUTIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

ESTUDOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DA INTERAÇÃO ENTRE
***NEPHILA CLAVIPES* (ARANEAE, NEPHILIDAE) E O PARASITOIDE**
***HYMENOEPIMECIS BICOLOR* (HYMENOPTERA, ICHNEUMONIDAE,**
PIMPLINAE)

JOBER FERNANDO SOBCZAK

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica M. Martins Pentead-Dias

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Gonzaga

SÃO CARLOS
2013

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

S677eb

Sobczak, Jober Fernando.

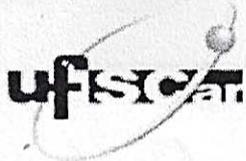
Estudos biológicos e ecológicos da interação entre *Nephila clavipes* (Araneae, nephilidae) e o parasitoide *Hymenoepimecis bicolor* (Hymenoptera, Ichneumonidae, pimplinae) / Jober Fernando Sobczak. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

110 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Parasitismo. 2. Aranha. 3. Comportamento - manipulação. 4. Parasitoide. 5. *Hymenoepimecis*. 6. *Nephila clavipes*. I. Título.

CDD: 574.5249 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Relatório de Defesa de Tese

Candidato: **Jobert Fernando Sobczak**

Aos 30/01/2013, às 08:30, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, a defesa de tese de doutorado sob o título: **MANIPULAÇÃO COMPORTAMENTAL EM NEPHILA CLAVIPES (ARANEAE, NEPHILIDAE) INDUZIDA PELO PARASITOIDE HYMENOEPIMECIS BICOLOR (HYMENOPTERA, ICHNEUMONIDAE, PIMPLINAE)**, apresentada pelo candidato Jobert Fernando Sobczak. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca	Função	Instituição	Conceito
Profa. Dra. Angélica Maria Penteado Martins Dias	Presidente	UFSCar	<u>Aprovado</u>
Prof. Dr. Manoel Martins Dias Filho	Titular	UFSCar	<u>Aprovado</u>
Profa. Dra. Odete Rocha	Titular	UFSCar	<u>Aprovado</u>
Prof. Dr. João Vasconcellos Neto	Titular	UNICAMP	<u>Aprovado</u>
Prof. Dr. Valmir Antonio Costa	Titular	IBC-SP	<u>Aprovado</u>

Resultado Final: A

Parecer da Comissão Julgadora*:

Aprovado com distinção e louvor

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, João Augusto da Silva Affonso, representante do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Profa. Dra. Angélica Maria Penteado Martins Dias

Prof. Dr. Manoel Martins Dias Filho

Profa. Dra. Odete Rocha

Prof. Dr. João Vasconcellos Neto

Prof. Dr. Valmir Antonio Costa

Representante de PPG: João Augusto da Silva Affonso

() Não houve alteração no título da tese (X) Houve. O novo título passa a ser:

Estudos biológicos e ecológicos da interação entre Nephila clavipes (Araneae, Nephilidae) e o parasitoide Hymenepimecis bicolor (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae).

*Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Para gozar dos direitos do título de Doutor em Ecologia e Recursos Naturais, o candidato ainda precisa ter sua tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

AUTENTICAÇÃO

São Carlos, 30/01/2013
Autentico a presente cópia reprográfica,
a qual confere com o original, do que dou fé.

João Augusto da Silva Affonso
Assistente de Administração
PPG-ERN/UFSCar



DEDICATÓRIA

**A minha esposa Jullyana C.M.S.M. Sobczak companheira da longa jornada,
minha família e a todas as aranhas parasitadas e vespas que morreram para que
esta tese fosse possível!**

“Me transformei num tipo de máquina de observar fatos e formular conclusões”

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Angélica M. Penteado Martins Dias, pela confiança em mim depositada durante todos estes anos;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Gonzaga pelo incentivo em todos os trabalhos realizados desde o aperfeiçoamento na UNICAMP em 2006, por ter apresentado o fascinante mundo das interações entre vespas parasitoides e aranhas e pelas dicas de redação, apresentação e projetos que certamente me ajudaram a chegar até aqui e a continuar na pesquisa;

Agradeço também ao Prof. Dr. João Vasconcellos Neto pelas oportunidades de trabalho, pelos ensinamentos durante os sete anos que estive em seu laboratório na UNICAMP e pelo grande companheirismo de todos os momentos, e por acreditar e apoiar o meu trabalho;

Agradeço às professoras Maria Alice da Cruz Hofling e Talita Rocha pela ajuda com os cortes histológicos das larvas e aranhas, que apesar de não estarem contemplados como capítulos nesta tese, certamente serão publicados em breve;

Ao prof. Dr. Mario Palma e Daniel M. Saidemberg pela ajuda na elucidação dos constituintes químicos do veneno que a vespa *H. bicolor* usa para paralisar a aranha *N. clavipes*, outro trabalho que em breve iremos publicar.

Ao parceiro Felipe Christoff Wouters e à profa. Dra. Anita J. Marsaioli, do Instituto de Química da UNICAMP, pelas tentativas em conhecer e se aventurar no complexo mundo químico que envolve as interações entre vespas parasitoides e seus hospedeiros;

À minha esposa Jullyana, C. M. S. Moura Sobczak, pelos estímulos para desvendar os segredos desta interação, pela compreensão e auxílio em todos os momentos destes quase 10 anos em que estamos juntos. Por ajudar nos delineamentos dos experimentos do cap. III desta tese e por fazer parte desta etapa importante da minha vida.

Aos meus amigos de laboratório da Unicamp, Yuri, Hebert, Gustavo, Márcio, Maice, Gabriela, Daniela, Nili, Adriana Salomão, Janaina, Adriana Barnabé, por me ensinarem que não podemos viver apenas de publicações, e que necessitamos de uma vida social!!!

Ao meu amigo da Serra do Japi, Sr. Lauro, pela grande ajuda durante todo o período que fiquei morando na serra para a realização dos experimentos de campo;

À Guarda Municipal e a Prefeitura Municipal de Jundiaí pelo apoio logístico da Base Ecológica da Serra do Japi;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais-PPG-ERN – UFSCar;

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e ao HYMPAR-Sudeste pelo apoio logístico.

RESUMO

Vespas parasitoides podem utilizar uma ampla diversidade de artrópodes como alimento para suas larvas. Entre as espécies cenobiontes, aquelas cujo desenvolvimento do parasitoide não interrompe as atividades normais do hospedeiro, está um grupo de vespas que utiliza exclusivamente aranhas como hospedeiros. No grupo *Polysphincta* (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae), algumas espécies são capazes de alterar o comportamento de seus hospedeiros logo antes de empuparem. Essas modificações comportamentais, que possivelmente são responsáveis por um aumento na probabilidade de sobrevivência do parasitoide, são raras nesse tipo de interação. Nesse trabalho, que foi dividido em quatro capítulos, foi descrita em detalhes a interação entre a aranha *Nephila clavipes* (Araneae, Nephilidae) e a vespa *Hymenoepimecis bicolor* (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae).

No primeiro capítulo nós descrevemos o comportamento de ataque e oviposição de *H. bicolor*, que tem início com a vespa voando em volta da teia de *N. clavipes*. Em seguida, a vespa ataca inserindo o ovipositor na boca, paralisando a aranha no centro da teia. As fêmeas de *H. bicolor* emergem de aranhas maiores enquanto os machos emergem de aranhas menores. Aparentemente a vespa é capaz de avaliar o tamanho do hospedeiro e decidir por fertilizar ou não o ovo que será fixado na aranha.

No segundo capítulo, verificamos a frequência de parasitismo em *N. clavipes* por *H. bicolor* e também verificamos a escolha do tamanho do hospedeiro, que pode estar relacionada diretamente com um *trade-off* entre tamanho e risco de injúria. A ecdise não é capaz de remover a larva do parasitoide, que permanece aderida ao corpo da aranha. Além disso, observamos que seis dias antes da ecdise, portanto no período de pré-ecdise, ocorre uma diminuição do número de raios e espiras, levando a uma diminuição

do tamanho da teia. A teia modificada construída por aranhas no período de pré-ecdisse é muito similar à teia modificada construída por aranhas parasitadas poucos dias antes de serem mortas pela larva do parasitoide.

No terceiro capítulo descrevemos a influência da arquitetura das teias modificadas e teias normais na sobrevivência das pupas de *H. bicolor*. Em teias normais a sobrevivência da pupa é grandemente afetada, sendo que na maioria das observações os casulos caíram no solo ou sofreram outros tipos de danos. Em outro experimento, removemos a larva de terceiro ínstar assim que a aranha começou a construir a teia modificada e verificamos que após a remoção da larva a aranha voltou a construir uma teia normal. Com isso buscamos verificar se a vespa injeta substâncias na aranha que a induz a construção de teias modificadas.

No último capítulo descrevemos os estágios imaturos de *H. bicolor* observando as características morfológicas e comportamentais em cada um dos estágios

ABSTRACT

Parasitoid wasps may use a wide variety of arthropods as food for their larvae. Among koinobiont species, whose development of the parasitoid does not disrupt the normal activities of the host, there is a group of wasps that exclusively uses spiders as hosts. In *Polysphincta* group (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae), some species are able to change their hosts behavior before turning into pupa. These behavioral changes that are possibly responsible for an increase in the probability of survival of the parasitoid, are rare in this type of interaction. In this study, which was divided into four chapters, the interaction between the spider *Nephila clavipes* (Araneae, Nephilidae) and *Hymenoepimecis bicolor* wasp (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) are described in detail.

In the first chapter we describe the attack and oviposition behavior of *H. bicolor*, that starts with the wasp flying around the *N. clavipes* web. Then the wasp attacks inserting the ovipositor into the mouth and paralyzing the spider at the center of the web. Females *H. bicolor* emerge from larger spiders while males emerge from smaller spiders. Apparently the wasp is able to estimate the size of the host and decide whether or not to fertilize the egg to be laid down in the spider.

In the second chapter, we found the frequency of parasitism in *N. clavipes* for *H. bicolor* and also verify the choice of the host size, can be directly related to a trade-off between size and risk of injury. The ecdysis is not able to remove the parasitoid larva which remains attached to the spider body. Furthermore, we note that six days before the ecdysis, so in the period of pre-ecdysis, there is a decrease in the number of rays and turns, causing a decrease in the web size. The changed web built by spiders in the pre-ecdysis is very similar to the modified web built by spiders parasitized days before being killed by the parasitoid larva.

The third chapter describes the influence of the architecture of the modified webs and the normal ones on the survival of pupa of *H. bicolor*. In normal webs the pupa survival is greatly affected and in most of the observations cocoons fell in the soil or suffered other kind damage. In another experiment, we removed the third instar larva in the moment that the spider began to build the modified web and we found that after removing the larva the spider start building its standard web. Thus, our goal was to verify if that the larva injects substances that induce the spider to build a web modified.

In the final chapter the immature stages of the *H. bicolor* are described by observing morphological and behavioral characteristics in each stage

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
SUMÁRIO.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS GERAIS.....	8
CAPÍTULO I.....	9
Comportamento de ataque e oviposição de <i>Hymenoepimecis bicolor</i> (Brullé 1846) (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) em <i>Nephila clavipes</i> (Linnaeus 1767) (Araneae, Nephilidae)	9
Resumo	10
Introdução	11
Material e Métodos.....	13
<i>Registro dos ataques e oviposição</i>	13
<i>Relação entre o tamanho corporal do hospedeiro e do parasitoide</i>	14
Resultados	15
<i>Interceptação</i>	15
<i>Imobilização</i>	15
<i>Inspeção</i>	16
<i>Oviposição</i>	16
<i>Partida</i>	16
<i>Escolha de hospedeiro para oviposição</i>	19
Discussão	20
Agradecimentos.....	23
Referências Bibliográficas	24
CAPÍTULO II	29
Frequência de parasitismo e seleção de hospedeiros por <i>Hymenoepimecis bicolor</i> (Brullé 1846) (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae)	29
Resumo.....	30
Introdução.....	31
Material e métodos.....	33
Resultados	34
<i>Frequência de parasitismo</i>	34

<i>Escolha de hospedeiro</i>	35
<i>Ecdise da aranha parasitada</i>	36
<i>Teia modificada para a ecdise de aranhas não parasitadas</i>	37
<i>Duplo parasitismo</i>	39
Discussão.....	41
Agradecimentos	45
Referências Bibliográficas	45
CAPÍTULO III	50
Efeito da modificação na estrutura orbicular de teias de <i>Nephila clavipes</i> (Linnaeus 1767) (Araneae: Nephilidae) na sobrevivência das pupas do parasitoide <i>Hymenoepimecis bicolor</i> (Brullé 1846) (Hymenoptera: Ichneumonidae, Pimplinae)	50
Resumo.....	51
Introdução.....	52
Material e Métodos	54
<i>Área de estudo</i>	54
<i>Sobrevivência das pupas</i>	54
<i>Experimento de remoção da larva</i>	55
Resultados	56
<i>Remoção da larva de terceiro ínstar</i>	60
Discussão.....	63
Agradecimentos	65
Referências bibliográficas	66
Capítulo IV	71
Description of the immature stages of <i>Hymenoepimecis bicolor</i> (Brullé 1846) (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae), parasitoid of <i>Nephila clavipes</i> (Linnaeus 1767) (Araneae, Nephilidae)	71
Abstract	72
Introduction	72
Material and Methods	74
Results	74
Egg (Figs 1 A-E)	75
First instar (Figs 2 A-D)	75
Second instar (Fig. 3A-D).....	76
Third instar (Fig. 4A-K)	77

Elimination of the host spider's body remains	78
Cocoon construction.....	79
upa	81
Discussion	82
Acknowledgements.....	85
References	85
DISCUSSÃO GERAL.....	96
CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

INTRODUÇÃO

A manipulação comportamental por parasitas é um fenômeno que há muito tempo desperta a curiosidade da comunidade científica (Cram 1931, Dobben 1952, Holmes & Bethel 1972, Moore 1984, Barnard & Behnke 1990, Godfray 1994, McLachlin 1999, Poulin 2000, Moore 2002, Thomaz *et al.* 2005). Porém poucos são os estudos sobre a manipulação comportamental ocasionada por insetos parasitoides.

Os trabalhos publicados sobre a manipulação comportamental dos hospedeiros induzida por insetos parasitoides, principalmente por insetos da ordem Hymenoptera, incluem a mudança do hospedeiro de um habitat para outro, o aumento da taxa de consumo de alimentos, o cuidado da prole do parasitoide pelo hospedeiro e/ou a construção de estruturas para suportar e proteger o casulo do parasitoide (Wickler 1976, Godfray 1994, McLachlan 1999, Eberhard 2000a, Grosman *et al.* 2008, Matsumoto 2009, Sobczak *et al.* 2009, Gonzaga *et al.* 2010, Korenko & Pekár 2011). O desenvolvimento, crescimento e a sobrevivência do hospedeiro parasitado apresentam consequências diretas para o desenvolvimento dos estágios imaturos do parasitoide (Fritz 1982). Desta forma o parasitoide pode regular os processos de desenvolvimento do hospedeiro injetando substâncias como venenos e hormônios que são capazes de alterar a fisiologia do hospedeiro, assegurando que seu ciclo de vida não será interrompido (Vinson 1975).

A maioria dos casos de manipulação de hospedeiros já descrita envolve espécies de um importante grupo da ordem Hymenoptera, a subfamília Pimplinae (Hymenoptera, Ichneumonidae). Essa subfamília compreende aproximadamente 1500 espécies distribuídas em 66 gêneros, sendo principalmente ecto ou endoparasitoides de insetos holometábolos (Dubois *et al.* 2002, Gauld & Dubois 2006). Dentre os vários gêneros que a constitui, o grupo de gêneros *Polysphincta* (*sensu* Wahl & Gauld 1998) chama a

atenção pelo seu espetacular modo de vida. O grupo de gêneros *Polysphincta*, formado atualmente por 22 gêneros (Gauld & Dubois 2006, Pallacio *et al.* 2007), apresenta distribuição cosmopolita, sendo todas as espécies reconhecidas como vespas ectoparasitoides cenobiontes de aranhas, ou seja, o hospedeiro, após ter sido parasitado, continua suas atividades normalmente enquanto é lentamente consumido pela larva do parasitoide (Dubois *et al.* 2002, Gauld & Dubois 2006). Os estágios imaturos de algumas espécies deste grupo, cuja biologia está bem conhecida, podem manipular o comportamento de construção da teia de seus hospedeiros possivelmente através da inoculação de compostos químicos, induzindo as aranhas a construírem teias modificadas (Eberhard 2000a,b, Gonzaga & Sobczak 2007, Sobczak *et al.* 2009, Gonzaga *et al.* 2010).

O primeiro trabalho relacionado ao parasitismo por vespas do grupo de gêneros *Polysphincta* em aranhas foi publicado por DeGeer (1771). Ele descreve uma teia orbicular com um casulo preso ao centro do que seria uma estrutura modificada (Fig. 1). Na descrição dessa teia é possível observar a ausência de espiras adesivas e um número reduzido de raios que convergem para a posição de fixação do casulo.

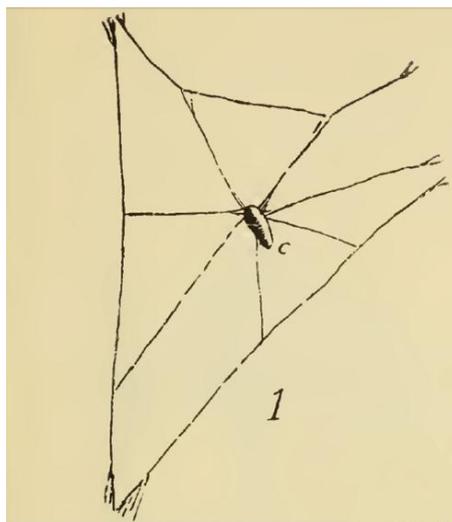


Figura 1. Teia modificada descrita por DeGeer em 1771.

Apesar da grande diversidade do grupo, dos primeiros registros comportamentais serem muito antigos e da existência de complexas interações parasita-hospedeiro, como a manipulação comportamental do hospedeiro pelas larvas (Eberhard 2001), as espécies neotropicais de *Polysphincta* ainda são muito pouco conhecidas. No Brasil, mais especificamente na região da Serra do Japi, já foram registradas muitas aranhas parasitadas por larvas do grupo de gêneros *Polysphincta* (Fig. 2.). Apesar disso, apenas espécies do gênero *Hymenoepimecis* Viereck 1912 tem sido intensivamente estudadas até o momento.



Figura 2. Interações entre aranhas e vespas do grupo *Polysphincta* (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) registradas atualmente no Brasil, mais especificamente na região da Serra do Japi, Jundiá, São Paulo, Brasil.

1- *Araneus omnicolor*/*Hymenoepimecis veranii*; **2-** *A. omnicolor*/*H. neotropica*; **3-** *A. venatrix*/*H. silvanae*; **4-** *A. orgaos*/*H. veranii*; **5-** *Parawisia* sp./*Polysphincta* sp.; **6-** *Achaearanea tingo*/parasitoide não identificado (pd); **7-** *Nephila clavipes*/*H. bicolor*; **8-** *Eustala perfida*/*Acrotaphus* sp.; **9-** *Cryptachaea* sp./pd; **10-** *Dubiaranea*/pd; **11-** hospedeiro e parasitoide desconhecidos; **12-** *Araneus* sp./pd; **13-** *Achaearanea cinnabarina*/*Zatypota* sp. aff. *riverai* (próximo de); **14-** *Mecynogea bigiba*/*H. japi*; **15-** *Argiope argentata*/*Acrotaphus chedelae*; **16-** *Leucauge roseosignata*/*H. sooretama*; **17-** hospedeiro e parasitoide desconhecidos; **18-** *Anelosimus baeza*/*Zatypota solanoi*; **19-** *A. Jabaquara* /*Z. solanoi*.

O gênero *Hymenoepimecis* é constituído atualmente por 14 espécies descritas. Todas as espécies cuja biologia é conhecida atacam aranhas construtoras de teias orbiculares das famílias Araneidae, Tetragnathidae e Nephilidae (Fincke *et al.* 1990, Gauld & Dubois 2006, Gonzaga & Sobczak 2007, Eberhard 2000a, b, 2001, Gonzaga *et al.* 2010, Sobczak *et al.* 2009, Sobczak *et al.* 2012a, b).

Em algumas espécies deste gênero, as larvas de último ínstar são capazes de induzir a aranha a construir teia modificada (Eberhard 2000a, b, 2001, Sobczak *et al.* 2009, Gonzaga *et al.* 2010). A modificação da arquitetura da teia está provavelmente relacionada com a sobrevivência da pupa do parasitoide, uma vez que proporciona um local mais reforçado para a ancoragem do casulo (Gonzaga *et al.* 2010).

Eberhard (2000b, 2001), por exemplo, verificou que larvas de terceiro ínstar de *Hymenoepimecis argyraphaga* Gauld 2000 eram capazes de induzir o seu hospedeiro, a aranha *Leucauge argyra* (Walckenaer 1842), a construir uma teia modificada na noite que a larva mata a aranha. Além disso, forneceu informações detalhadas sobre o comportamento e morfologia dos ínstars larvais de *H. argyraphaga* e detalhes sobre o ataque e oviposição da vespa.

Gonzaga & Sobczak (2007) descreveram as interações entre *Hymenoepimecis veranii* Loffredo & Penteado-Dias 2009 e *Araneus omnicolor* (Keyserling 1893) (Araneidae). Eles descreveram o comportamento de ataque, oviposição e um evento de infanticídio na Serra do Japi, Jundiá, SP. Essa espécie ataca preferencialmente fêmeas pequenas da espécie *A. omnicolor*, contrariando a hipótese de que aranhas maiores seriam selecionadas por apresentarem uma maior disponibilidade de biomassa para as larvas. Um padrão semelhante, de preferência por hospedeiros de tamanho médio, foi observado também por Fincke *et al.* (1990) estudando as interações entre a vespa

Hymenoepimecis robertsae Gauld 1991 e a aranha *Nephila clavipes* (Linnaeus 1767) (Nephilidae), no Panamá.

Outro aspecto interessante da interação entre *H. veranii* e *A. omnicolor* estudado por Gonzaga & Sobczak (2007) é a modificação das teias orbiculares dos hospedeiros que foram encontrados com larvas de terceiro ínstar aderidas em seus corpos. Há uma redução do componente orbicular (número de raios e espiras), o que impede que ocorra a interceptação de insetos após a morte da aranha. As teias de *A. omnicolor* possuem uma estrutura tridimensional de fios ligada à parte orbicular, usada para sustentar um abrigo feito com uma folha seca enrolada. Essa parte permanece inalterada. Após a morte da aranha, a larva utiliza esse abrigo para construir e fixar o seu próprio casulo.

Sobczak *et al.* (2009) descreveram duas novas espécies de vespas do gênero *Hymenoepimecis*. Na espécie *Hymenoepimecis japi*, que parasita fêmeas de *Leucauge roseosignata* Mello-Leitão 1943, quando a larva do parasitoide atinge o terceiro ínstar induz o hospedeiro a construir uma teia inteiramente modificada, com características semelhantes à encontrada por Eberhard (2001) na Costa Rica. A teia modificada deste hospedeiro é formada por apenas três fios reforçados, sendo que ao centro da teia fica preso, por um fio suspenso, o casulo do parasitoide. A teia modificada apresenta poucos raios e nenhuma espira. Na segunda espécie descrita, *Hymenoepimecis sooretama* Sobczak *et al.* 2009 parasitoide de *Manogea porracea* C. L. Koch, 1838, foi observado que não existe uma modificação no padrão da arquitetura da teia. Apesar disso, o casulo do parasitoide ocupa uma posição na teia distinta daquela normalmente ocupada por fêmeas não parasitadas. Neste caso, é possível que o parasitoide induza o deslocamento da fêmea para um local mais protegido, em meio ao complexo de fios irregulares que fica localizado abaixo da rede de captura de presas (Sobczak *et al.* 2009).

Gonzaga *et al.* (2010) verificaram que as larvas de terceiro ínstar de *H. bicolor* (Brulle 1846) e *H. robertsae* também são capazes de induzir a aranha *N. clavipes* a construir uma teia modificada. Neste caso, a aranha, com uma larva de terceiro ínstar aderida ao seu abdômen, deixa de construir a teia orbicular, característica da espécie, e passa a reforçar com fios de seda apenas o centro da teia, formando uma estrutura tridimensional. É nesse local onde, após consumir todo o hospedeiro, a larva constrói o casulo. Essa manipulação no comportamento de construção da teia não ocorre de maneira gradual, sendo observada apenas nos três últimos dias que antecedem a morte da aranha.

A modificação da estrutura da teia em *N. clavipes* possivelmente é ocasionada pela injeção de compostos químicos pela larva quando esta atinge o terceiro ínstar de seu desenvolvimento. Há algum tempo se conhece que substâncias psicotrópicas podem modificar a forma de teias orbiculares (Witt *et al.* 1968). Eberhard (2000b, 2001) atribuiu a modificação da teia de *L. argyra* a uma possível injeção de substâncias pela larva do parasitoide. Contudo, os mecanismos empregados na modificação do comportamento do hospedeiro pela larva de terceiro ínstar observado em *L. argyra*, *L. roseosignata*, *N. clavipes* e *A. omnicolor* ainda são completamente desconhecidos. Outra questão em aberto, e de extrema importância para determinar se as alterações na teia são realmente direcionadas pelo parasitoide, é a influência dos padrões de teias observados na sobrevivência da pupa. Em *N. clavipes*, além de conferir maior resistência, a teia modificada pode proteger o casulo contra ações de predadores e parasitoides secundários. Informações sobre o comportamento alterado do hospedeiro durante a construção da teia e as características de teias normais de aranhas não parasitadas comparadas com aranhas parasitadas são importantes para determinar como

essa complexa interação parasitoide/hospedeiro ocorre dentro do gênero *Hymenoepimecis*, além de possuir importância na sistemática do grupo.

OBJETIVOS GERAIS

1. Descrever o comportamento de ataque e oviposição da vespa *H. bicolor* parasitando a aranha *N. clavipes*;
2. Descrever a história natural da interação envolvendo a aranha *N. clavipes* parasitada pela vespa *H. bicolor*;
3. Testar se os casulos construídos em teias modificadas são menos susceptíveis a danos por fatores abióticos (vento e chuva) comparados com casulos construídos em teias normais;
4. Caracterizar a morfologia e o comportamento dos estágios imaturos da vespa *H. bicolor*.

CAPÍTULO I

Comportamento de ataque e oviposição de
***Hymenoepimecis bicolor* (Brullé 1846)**
(Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) em
***Nephila clavipes* (Linnaeus 1767) (Araneae,**
Nephilidae)

Resumo

O comportamento de ataque e oviposição das vespas do grupo de gêneros *Polysphincta* envolve várias estratégias diferentes para atacar o hospedeiro, havendo diferenças comportamentais entre os gêneros e dentro do próprio gênero. O comportamento de ataque e oviposição de *Hymenoepimecis bicolor* é descrito e ilustrado com base em ataques filmados em situação de semi-cativeiro. O ataque tem início com a vespa voando em volta da teia de *Nephila clavipes*. Em seguida, a vespa ataca inserindo o ovipositor na boca e paralisando a aranha no centro da teia. A vespa inspeciona o abdômen da aranha com o ovipositor e então expelle um ovo da base do ovipositor, o qual permanece aderido ao hospedeiro por uma substância gelatinosa. Pode ocorrer variação no comportamento de ataque. A vespa pode, por exemplo, iniciar o ataque com a aranha presa ao centro da teia e terminar de paralisar e ovipor com a aranha no solo. Como as fêmeas de *H. bicolor* são maiores que os machos, estas são normalmente encontradas em hospedeiros maiores enquanto os machos emergem de aranhas menores. Aparentemente a vespa é capaz de avaliar o tamanho do hospedeiro e decidir por fertilizar ou não o ovo que será fixado na aranha. Assim como em outros estudos onde o comportamento de ataque das vespas do gênero *Hymenoepimecis* é registrado (ex. *H. argyraphaga*, *H. veranii*), *H. bicolor* paralisa a aranha, inspeciona seu abdômen em busca de ovos ou larvas previamente colocados, ovipoe e em seguida abandona o hospedeiro antes de passar o estado de paralisia.

Palavras-chave: grupo de gêneros *Polysphincta*, razão sexual, comportamento, *Hymenoepimecis*.

Introdução

Vespas do grupo de gêneros *Polysphincta* (Ichneumonidae, Pimplinae) são conhecidas por serem ectoparasitoides cenobiontes de aranhas adultas e sub-adultas de diversas famílias (Gauld & Dubois 2006). Atualmente este grupo de espécies é formado por 22 gêneros com distribuição cosmopolita (Gauld & Dubois 2006, Pallacio *et al.* 2007). Existem informações detalhadas sobre vários aspectos da biologia das vespas do grupo de gêneros *Polysphincta*. Sabe-se, por exemplo, que as larvas de último ínstar de várias espécies de *Hymenoepimecis* são capazes de induzir o hospedeiro a construir uma teia modificada (Fincke *et al.* 1990, Eberhard 2000b, 2001, Gonzaga & Sobczak 2007, Sobczak *et al.* 2009, Gonzaga *et al.* 2010). A teia modificada confere um suporte mais resistente para a construção do casulo, evitando que, durante o estágio de pupa, o parasitoide seja lançado ao solo pela exposição à chuva e vento (Eberhard 2000a,b, Gonzaga *et al.* 2010, ver cap. III desta tese). Contudo, poucos são os estudos que descrevem o comportamento de ataque e oviposição dentro do grupo *Polysphincta*. Os comportamentos de ataque e de oviposição das vespas do grupo de gêneros *Polysphincta* envolve várias estratégias diferentes, havendo diferenças comportamentais entre os gêneros e dentro do próprio gênero. Por exemplo, a vespa do gênero *Zatypota*, *Z. albicoxa* (Walker 1874) pousa na teia da aranha *Achaearanea tepidariorum* (C.L. Koch 1841) e em seguida, a vespa usa suas pernas dianteiras para puxar os fios da teia simulando uma presa e atraindo a atenção da aranha, que ao se aproximar é imediatamente atacada e paralisada pela vespa (Takasuka *et al.* 2009, Takasuka & Matsumoto 2011). Outro comportamento diferente, para o mesmo gênero, foi registrado por Sobczak *et al.* em 2011 (dados não publicados) para a espécie *Z. solanoi* Gauld 1991, parasitando *Anelosimus baeza*, Agnarsson 2006. A vespa pousa na teia da aranha e aguarda alguns minutos a aranha sair do abrigo de folhas e ir capturar

presas que caem na teia. Quando isso ocorre, a vespa ataca a aranha e insere o ovipositor entre as queliceras e o primeiro par de pernas da aranha, imobilizando-a rapidamente. Matsumoto (2009) observou que fêmeas de *Brachyzapus nikkoensis* pousam na teia de *Agelena limbata* e com o movimento das pernas atraem a atenção da aranha que ao ir de encontro com a vespa é atacada e paralisada.

O gênero *Hymenoepimecis* Viereck 1912, incluído no grupo *Polysphincta*, é constituído por 14 espécies descritas e todas atacam aranhas construtoras de teias orbiculares das famílias Araneidae, Tetragnathidae e Nephilidae (Fincke *et al.* 1990, Gauld & Dubois 2006, Gonzaga & Sobczak 2007, Eberhard 2000a, b, 2001, Gonzaga *et al.* 2010, Sobczak *et al.* 2012a, 2012b). O primeiro registro de ataque e oviposição por vespas deste gênero foi feito por Fincke *et al.* (1990), estudando indivíduos de *N. clavipes* parasitados por *H. robertsae* Gauld 1991 no Panamá. Eles observaram que a vespa, no momento do ataque, paralisa a aranha. Em seguida, passa o ovipositor no dorso e na lateral do abdômen e então ovipõe. Eberhard (2000a) detalhou o comportamento de ataque de *H. argyraphaga* Gauld 2000 parasitando *Leucage argyra* (Walckenaer 1842). Ele observou que primeiramente a vespa ataca a aranha na teia, e em seguida injeta o veneno que a paralisa. Após imobilizar o hospedeiro, a vespa passa o ovipositor pelo abdômen da aranha e, em sequência, deposita um ovo em sua porção anterior.

Gonzaga & Sobczak (2007) observaram uma estratégia diferente de ataque em *H. veranii* Loffredo & Penteado-Dias 2009. Esta vespa pousa nos fios de barreira da teia de *Araneus omnicolor* (Keyserling 1893) e aguarda que a aranha saia do abrigo para atacar uma presa na teia. O ataque consiste na vespa introduzir o ovipositor na boca da aranha e injetar o veneno que a paralisa. A vespa, então, inspeciona o abdômen do hospedeiro, usando o ovipositor para remover um ovo que tenha sido previamente

depositado por outra vespa. Após a remoção deposita seu próprio ovo e deixa a teia antes que a aranha se recupere da paralisia (Gonzaga & Sobczak 2007).

Muitas vespas parasitoides podem controlar o sexo de cada filho, levando em consideração a qualidade ou o tamanho do hospedeiro no momento da oviposição (Quicke 1992). Fincke *et al.* (1990) sugere que as vespas do grupo *Polysphincta* podem ajustar a razão sexual da sua prole no momento da oviposição por colocar ovos fertilizados (geram fêmeas) em aranhas maiores e colocar ovos não fertilizados (geram machos) em aranhas de tamanho menores.

Neste estudo nós documentamos o comportamento de ataque e oviposição de *H. bicolor* em *N. clavipes* e também verificamos a existência da escolha de hospedeiro por parte da vespa no momento da oviposição.

Material e Métodos

Registro dos ataques e oviposição

As observações dos ataques em campo de *H. bicolor* foram feitas nas bordas da floresta e nas estradas próximas à estação de pesquisa e também ao longo da estrada do DAE na Reserva Biológica da Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo, Brasil (23°15'S, 46°57'W). Outros ataques foram filmados em aranhas sub-adultas que faziam parte dos experimentos de privação alimentar (ver Gonzaga *et al.* 2010) e sobrevivência de casulos (Sobczak *et al.* em preparação) de Janeiro a março de 2008 e 2011 respectivamente. As aranhas estavam acondicionadas em gaiolas, confeccionadas com varas de bambu (0,5x0,5x1,6m) e cobertas com uma rede fina, localizadas próximas da

estação de pesquisa. Quando o parasitoide se aproximava das gaiolas, a tela era removida para a entrada da vespa.



Figura 1. Gaiolas construídas com bambu onde foram mantidas as aranhas, na área da Reserva Biológica da Serra do Japi, Jundiaí, SP, Brasil.

Os vídeos registrando o comportamento de ataque e oviposição da vespa *H. bicolor* foram feitos usando uma câmera digital Panasonic HDD. Para a descrição do comportamento de ataque e oviposição, após a obtenção das imagens, cada vídeo foi analisado usando o programa Sony Vegas 4.0.

Relação entre o tamanho corporal do hospedeiro e do parasitoide

Foram coletadas 31 aranhas com ovos ou larvas de *H. bicolor*. Todas as aranhas foram mantidas em recipientes plásticos (30x25x25cm) tampados com tui e mantidos em laboratório onde eram alimentadas diariamente com dez moscas da espécie *D. melanogaster*. Em cada pote foi também colocado um algodão com água para manter a umidade. Logo após a coleta, todos os indivíduos tiveram o comprimento de seus abdômens medido. As vespas que emergiram dos casulos construídos em laboratório

tiveram o comprimento total da asa anterior medido e foram fotografadas usando um estereomicroscópio Leica M205C.

Espécimes testemunho de *H. bicolor* foram depositados na coleção da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brazil (DCBU, A.M. Pentead-Dias, curadora), e aranhas foram depositadas na coleção do Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil (IBSP, A.D. Brescovit, curador).

Resultados

Foram registradas a sequência do comportamento de ataque e oviposição de *H. bicolor* em sete momentos distintos durante os anos de 2008-2011. Todos os ataques observados ocorreram entre as 11:00 e 16:00 horas. A sequência do ataque e oviposição de *H. bicolor* pode ser dividida em cinco fases: interceptação, imobilização, inspeção, oviposição e partida.

Interceptação

O ataque é iniciado com a vespa voando em volta da teia do hospedeiro, a uma distância de aproximadamente 1 metro, com as antenas voltadas para frente e o metassoma reto (Fig.1A). Durante essa fase, a vespa executa pequenos deslocamentos, indo para frente e para trás com o corpo, por aproximadamente cinco minutos. Após este breve período de reconhecimento, a vespa paira no ar, em frente da parte orbicular da teia e da aranha, fazendo voos circulares, para frente e para trás, por mais aproximadamente um minuto. Logo em seguida, a vespa se distancia cerca de 15 cm para trás e dispara em direção a aranha que está no centro da teia.

Imobilização

A vespa ataca a região do cefalotórax da aranha e em menos de um segundo, com auxílio das duas pernas anteriores e duas pernas medianas, prende a parte anterior

do abdômen da aranha na região do pecíolo e, com as duas pernas posteriores, segura no cefalotórax e insere o ovipositor na boca da aranha (Fig. 2B). Após alguns segundos, a vespa volta a mover o seu corpo e agora prende apenas o cefalotórax com as pernas e permanece com o ovipositor dentro da boca da aranha. O tempo que a vespa levou para imobilizar a aranha foi de 5 minutos e 23 segundos. Em dois outros casos a vespa, além de inserir o ovipositor na boca da aranha, também insere o ovipositor na região da base da coxa da perna I (Fig. 2C) e na base das quelíceras (Fig. 2D) por aproximadamente dois minutos. Em um dos ataques, após a vespa remover o ovipositor, ela virou-se, foi até a região anterior do cefalotórax e tocou com sua mandíbula os olhos da aranha (Fig. 2E).

Inspeção

Ainda com a aranha imobilizada, a vespa retira o ovipositor da boca e usa sua extremidade para inspecionar o dorso e as laterais do abdômen do hospedeiro. Este comportamento dura cerca de 30 segundos.

Oviposição

Após inspecionar o abdômen da aranha, a vespa curva o metassoma em um ângulo de 180°, com as bainhas levantadas, e pressiona a base do ovipositor contra o abdômen da aranha. O ovo emerge da base do ovipositor em 1 minuto e 38 segundos, juntamente com uma substância gelatinosa que é a responsável pela fixação do ovo ao abdômen (Fig. 1F, ver cap. IV desta tese).

Partida

Logo em seguida a vespa solta a aranha e voa para a vegetação próxima à teia, onde permanece por alguns minutos executando comportamento de limpeza do ovipositor.

Durante todas as fases as aranhas permanecem paralisadas no centro da teia, presas aos fios com auxílio das suas pernas. O tempo médio total de paralisação de todos os eventos observados foi de 15,5 minutos.

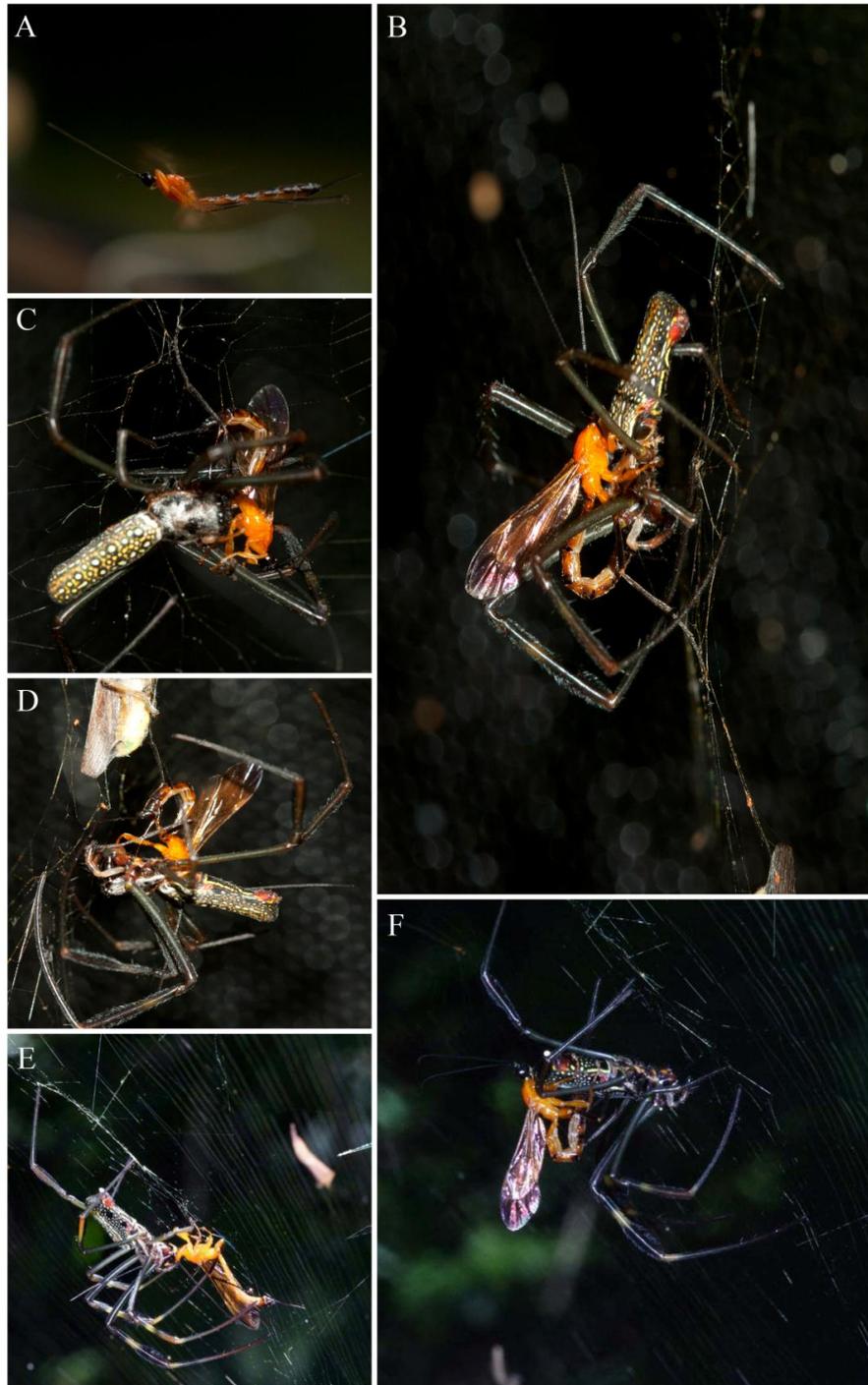


Figura 2. A) *Hymenoepimecis bicolor* voando antes do ataque; B) Ataque da vespa com o ovipositor na boca da aranha; C) Ovipositor inserido na base da coxa da perna I; D) Ovipositor inserido na base das quelíceras; E) Vespa tocando os olhos da aranha; F) Oviposição com o metassoma curvado.

Em outro ataque, no momento em que a vespa insere o ovipositor na boca da aranha, ambas, aranha e vespa, caem ao solo. Com a aranha imobilizada no solo, a vespa remove o ovipositor e inspeciona a superfície do abdômen com o ovipositor por 29 segundos e em seguida ovipõe. A aranha paralisada e ainda no solo foi atacada por uma formiga da espécie *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775), que vasculhava a vegetação (Fig. 3A). A formiga usa a mandíbula para morder as pernas e, introduz várias vezes o ferrão na região do cefalotórax e abdômen da aranha. Além de matar a aranha, a formiga por várias vezes mordeu o ovo da vespa recém-colocado no abdômen, o que consideramos como um evento de predação do ovo.

Foi registrado também um ataque mal sucedido onde a vespa atacou a aranha pela parte detrás da teia, ficando aprisionada nas espiras da teia. Com os movimentos da vespa presa à teia, a aranha imediatamente foi até as espiras onde a vespa estava tentando se soltar e, com as duas pernas anteriores tocou a vespa e em seguida mordeu com as mandíbulas o mesossoma da vespa. Por várias vezes a vespa tentou inserir o ovipositor no corpo da aranha, mas sem sucesso e acabou sendo inteiramente consumida pela aranha (Fig. 3B).

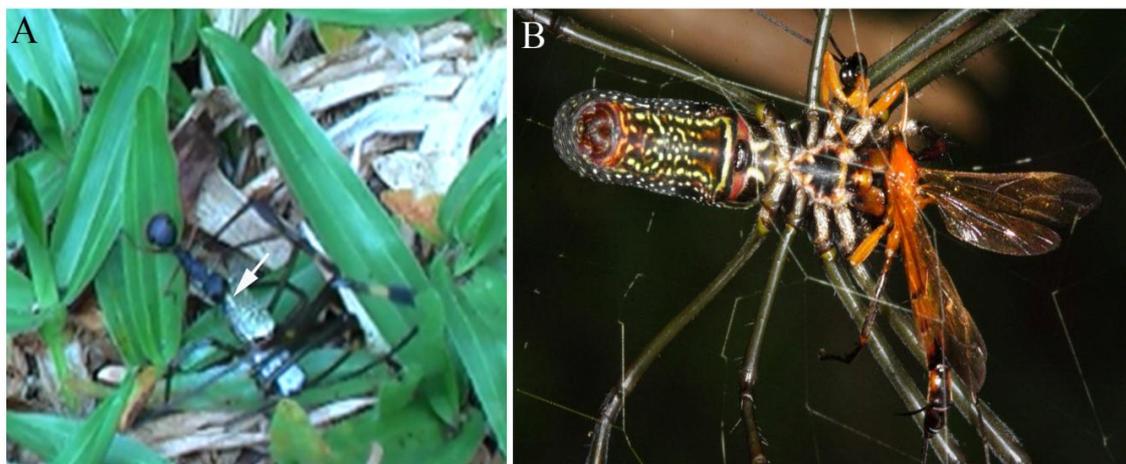


Figura 3. A) *Camponotus rufipes* atacando *Nephila clavipes* no solo, observar a formiga com o ovo de *Hymenoepimecis bicolor* (seta) preso entre suas mandíbulas; B) *N. clavipes* consumindo uma fêmea de *H. bicolor*.

Escolha de hospedeiro para oviposição

Para ambos os sexos, o tamanho do corpo do aranha demonstrou uma relação positiva com o tamanho do corpo da vespa que emergiu (Fig 4).

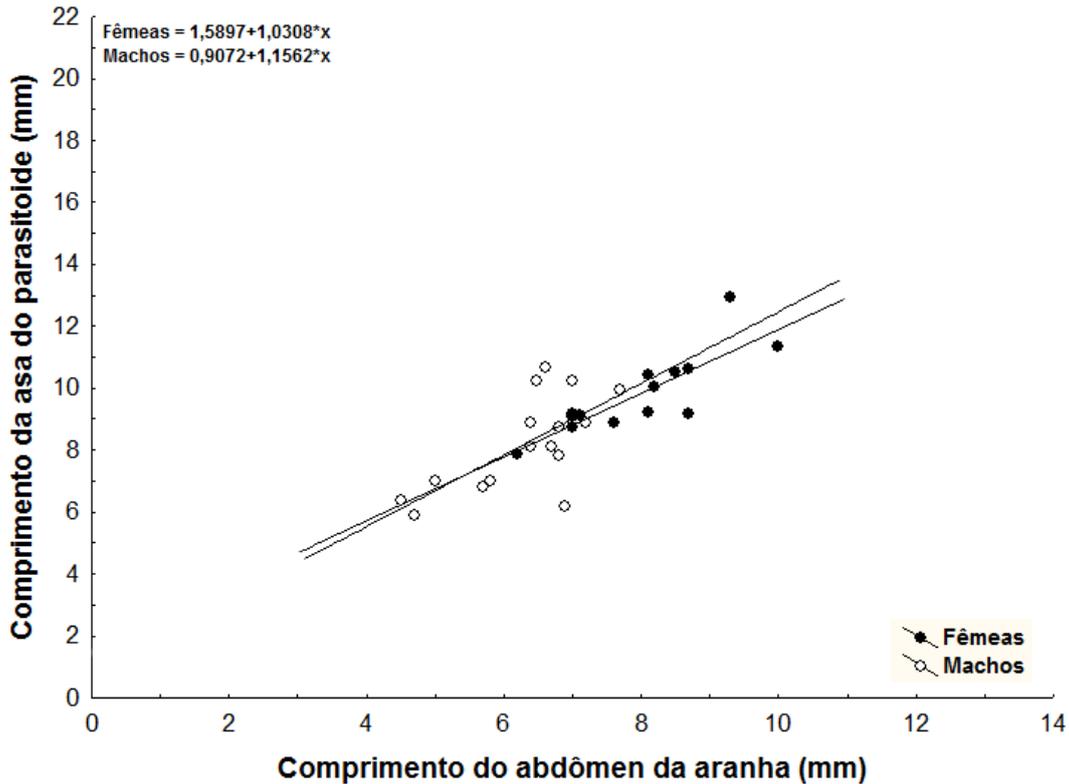


Figura.4. Relação entre o comprimento do abdômen de *Nephila clavipes* e o comprimento da asa anterior de fêmeas ($r^2= 0,6941$, $n=14$, $p=0,0002$) e machos ($r^2=0,4608$, $n=16$, $p=0,0038$) de *H. bicolor*.

A média do tamanho do corpo do hospedeiro ao qual a vespa fêmea emergiu (7,96mm, $n=14$) ($p= 0,00006$) foi maior se comparada com o tamanho do hospedeiro do qual os machos emergiram (6,29 mm, $n=16$) (Fig.5). O comprimento médio da asa anterior de fêmeas foi (9,8mm, $n=14$) ($p=0,0047$) foi maior do que a média das asas anteriores dos machos (8,18mm, $n=16$) (Fig.5).

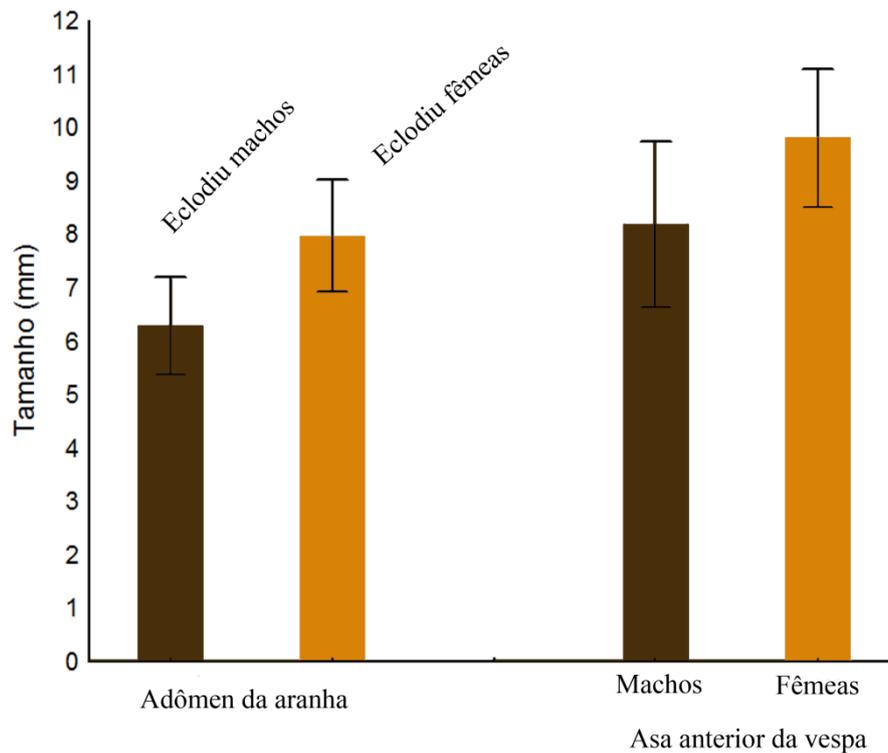


Figura 5. À esquerda, comprimento do abdômen da aranha hospedeira e o sexo das vespas que eclodiram; à direita, tamanho das vespas segundo o sexo.

Discussão

O comportamento de ataque de *H. bicolor* é bastante característico. A vespa lança-se rapidamente para cima do hospedeiro e, mesmo sendo um ataque direto a um hospedeiro que constrói teia com uma barreira de fios, ou forma agregações com várias teias, a maioria dos ataques é bem sucedida. A fase de paralisação do hospedeiro parece ser de grande importância para o sucesso da oviposição.

O comportamento de passar o ovipositor contra o abdômen da aranha possui a função de localizar e remover ovos ou larvas que haviam anteriormente sido depositado por outra vespa (Eberhard 2000a), caracterizado como evento de infanticídio (Gonzaga & Sobczak 2007, Takasuka & Matsumoto 2011). Este comportamento ocorre em todas as interações onde o ataque foi registrado, exemplo: *H. veranii* atacando *A. omnicolor*

(Gonzaga & Sobczak (2007). Neste caso, a vespa removeu com o ovipositor, outro ovo antes de ovipor o seu. A mesma sequência de movimentos foi observada por Matsumoto & Konishi (2007), durante 25 minutos, no ataque de *Reclinervellus tuberculatus* (Ichneumonidae) em *Cyclosa octotuberculata* (Araneidae) no Japão, e por Fincke *et al.* (1990) em *H. robertsae* ovipondo em *N. clavipes* e Eberhard (2000) em *H. argyraphaga* parasitando *L. argyra*. A função de tocar as quelíceras e os olhos da aranha com a mandíbula não está claro, sendo que este comportamento foi registrado em apenas um dos sete ataques documentados.

Hymenoepimecis bicolor expelle o ovo da base do seu abdômen, assim como outras espécies dentro do grupo *Polysphincta*, a exemplo: *H. argyraphaga* (Eberhard 2000a), *H. veranii* (Gonzaga & Sobczak 2007) *R. tuberculatus* (Matsumoto & Konishi 2007); segundo Matsumoto 2004 em Takasuka *et al.* 2009, isso pode também ocorrer em *Schizopyga circulator* e *Z. albicoxa* (Takasuka *et al.* 2009). O ovipositor funciona como um ferrão para inocular veneno e imobilizar o hospedeiro e não mais para ovipor. Apesar de ser um hábito conhecido em vespas Apocrita, este comportamento está presente em várias espécies de Ichneumonidae (Dubois 2002) e provavelmente seja comum a todo grupo de gêneros *Polysphincta*.

Fincke *et al.* (1990) não observaram diretamente o ataque de *H. robertsae* e nem a oviposição em *N. clavipes*. Contudo, eles observaram algumas fêmeas de *N. clavipes* na vegetação enquanto a vespa estava parada no centro da teia. Quando as aranhas percebem a presença da vespa voando próximas das suas teias, elas pulam para a serrapilheira, sendo em alguns casos seguidas pelas vespas.

Porém, na maioria das nossas observações, os ataques ocorreram com as aranhas no centro da teia, sugerindo que esta sequência não é obrigatória em *H. bicolor*.

Algumas vespas caçadoras (Pompilidae, Sphecidae) exploram com sucesso este comportamento de saltar da teia para fugir de predadores em aranhas construtoras de teias orbiculares. Rayor (1997), por exemplo, registrou que a vespa caçadora *Poecilopompilus mixtus* Cameron 1902 (Pompilidae) induz a aranha *Metepeira incrassata* Cambridge 1903, a saltar da sua teia durante o ataque, seguindo a aranha para executar o ataque final no solo. Blackledge & Pickett (2000) também observaram um comportamento similar na vespa *Sceliphron caementarium* Drury 1770 atacando *Argiope aurantia* Lucas 1833 e *A. trifasciata* (Forsskal 1775) (Araneidae). A vespa pousa na teia e faz pequenos solavancos para que as aranhas caiam ao solo. Após este ataque inicial, a vespa procura a aranha na vegetação e executa a captura. Uma explicação alternativa para este comportamento de seguir a aranha é que isso seria apenas uma consequência de tentativas iniciais malsucedidas.

A predação do hospedeiro registrada neste trabalho indica que possivelmente a tática de perseguir e parasitar a aranha no solo pode deixar a aranha exposta ao ataque de predadores que vasculham a vegetação, como as formigas do gênero *Camponotus*.

Vespas parasitoides podem, no momento da oviposição, determinar o sexo da sua prole de acordo com o tamanho do hospedeiro, ou seja, podem controlar o sexo da sua prole de acordo com o tamanho do hospedeiro (Sandlan 1979, Asken & Shaw 1986, Godfray 1994, Ueno 1999). Como exemplo as fêmeas de *Pimpla nipponica* Uchida 1928, que parasita a lagarta *Galleria mellonella* (Linnaeus 1758), (Lepidoptera, Pyralidae) eclodem de hospedeiros maiores (Ueno 1999).

Fincke *et al.* (1990) observou que machos de *H. robertsae* possuíam o corpo menor do que as fêmeas, e também observou que o tamanho da vespa foi correlacionado com o tamanho dos hospedeiros. Em outro estudo envolvendo *Z. albicoxa* e *A.*

tepidariorum, Takasuka *et al.* (2009) observaram que fêmeas são encontradas em grandes hospedeiros e machos em pequenos hospedeiros. Além disso, observaram que fêmeas apresentam maior tamanho corporal.

Nós observamos que existe uma relação positiva entre o tamanho da aranha *N. clavipes* e o sexo da prole da vespa *H. bicolor*. Aranhas com tamanho corporal maior dão origem a fêmeas, e aranhas menores dão origem aos machos da vespa. Além disso, observamos que as vespas fêmeas são maiores que as vespas machos. No momento da oviposição, a vespa *H. bicolor* é capaz de alguma forma, avaliar o tamanho do hospedeiro e, assim como em outras interações de vespas do grupo *Polysphincta*, ela é capaz de decidir sobre o sexo da prole, ajustando o seu sucesso reprodutivo.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Bolsa de pesquisa para A.M. Pentead-Dias e Bolsa de doutorado para J.F.Sobczak), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Hymenoptera Parasitoides da Região Sudeste Brasileira, pelo suporte financeiro, à Prefeitura Municipal de Jundiaí por permitir as estadias de J.F. Sobczak na Base de Estudos de Ecologia e Educação Ambiental da Serra do Japi.

Referências Bibliográficas

Askew RR, Shaw MR 1986. Parasitoid communities: their size, structure and development. In: Waage J, Greathead D (eds) *Insect Parasitoid*, pp 225-264. Academic Press, London.

Blackledge TA & Pickett KM. 2000. Predatory interactions between mud-dauber wasps (Hymenoptera: Sphecidae) and *Argiope* (Araneae: Araneidae) in captivity. *Journal of Arachnology* 28: 211-216.

Eberhard WG. 2000a. The natural history and behavior of *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera: Ichneumonidae) a parasitoid of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae). *Journal of Hymenoptera Research* 9: 220-240.

Eberhard WG. 2000b. Spider manipulation by a wasp larva. *Nature* 406:255-256.

Eberhard WG. 2001. Under the influence: webs and building behavior of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae) when parasitized by *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Journal of Arachnology* 29: 354-366.

Fincke OM, Higgins L & Rojas E. 1990. Parasitism of *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae) by an ichneumonid (Hymenoptera, Polysphinctini) in Panama. *Journal of Arachnology* 18: 321–329.

Gauld ID & Dubois J. 2006. Phylogeny of the *Polysphincta* group of genera (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae): a taxonomic revision of spider ectoparasitoids. *Systematic Entomological* 31: 529–564.

Godfray HCJ. 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Gonzaga MO & Sobczak JF. 2007. Parasitoid-induced mortality of *Araneus omnicolor* (Araneae, Araneidae) by *Hymenoepimecis* sp. (Hymenoptera, Ichneumonidae) in southeastern Brazil. *Naturwissenschaften* 94: 223-227.

Gonzaga MO, Sobczak JF, Pentead-Dias AM & Eberhard WG. 2010. Modification of *Nephila clavipes* (Araneae: Nephilidae) webs induced by the parasitoids *Hymenoepimecis bicolor* and *H. robertsae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Ethology Ecology and Evolution* 22: 151-165.

Korengo S & Pekar S. 2011. A parasitoid wasp induces overwintering behavior in its spider host. *Plos one* 6: 24628.

- Matsumoto R. 2009. "Veils" against predators: modified web structure of a host spider induced by an ichneumonid parasitoid, *Brachyzapus nikkoensis* (Uchida) (Hymenoptera). *Journal of Insect Behaviour* 22: 39-48.
- Matsumoto R & Konishi K. 2007. Life histories of two ichneumonid parasitoids of *Cyclosa octotuberculata* (Araneae): *Reclinervellus tuberculatus* (Uchida) and its new sympatric congener (Hymenoptera: Pimplinae). *Entomological Science* 10: 267 – 278.
- Nielsen E. 1923. Contributions to the life history of the Pimplinae spider parasites (*Polysphincta*, *Zaglyptus*, *Tromatobia*). *Entomologiske Meddelelser* 14: 137-205.
- Palacio E, Saaksjarvi IE & Vahtera V. 2007. *Lamnatibia*, a new genus of the *Polysphincta* group of genera from Colombia (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae). *Zootaxa* 1431: 55–63.
- Rayor LS. 1997. Attack strategies of predatory wasps (Hymenoptera: Pompilidae: Sphecidae) on colonial orb web-building spiders (Araneidae: *Metepeira incrassata*). *Journal of the Kansas Entomological Society*. 69:67-75.

Sandlkan K. 1979. Sex ratio regulation in *Coccygomimus turionellae* Linnaeus (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its ecological implications. *Ecological Entomology* 4: 365-378.

Sobczak JF, Loffredo APS, Pentead-Dias AM & Gonzaga MO. 2009. Two new species of *Hymenoepimecis* (Hymenoptera: Ichneumonidae, Pimplinae) with notes on their spider hosts and behaviour manipulation. *Journal of Natural History* 43: 2691–2699.

Sobczak JF, Loffredo APS, Pentead-Dias AM. 2012a. Parasitism on *Araneus venatrix* (Koch, 1838) (Araneae: Araneidae) by *Hymenoepimecis silvanae* Loffredo & Pentead-Dias, 2009 (Ichneumonidae, Pimplinae) with description of male of the wasp. *Brazilian Journal of Biology* 72: 221-223.

Sobczak JF, Loffredo APS, Pentead-Dias AM. 2012. *Hymenoepimecis neotropica* (Brues & Richardson) (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) parasitoid of *Araneus omnicolor* (Keyserling) (Araneae, Araneidae) first host record and new occurrence to Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 56: 390-392

Takasuka K & Matsumoto R. 2011. Infanticide by a solitary koinobiont ichneumonid ectoparasitoid of spiders. *Naturwissenschaften* 98: 529-536.

Takasuka K, Matsumoto R & Ohbayashi N. 2009. Oviposition behavior of *Zatypota albicoxa* (Hymenoptera, Ichneumonidae), an parasitoid of *Achaearanea tepidariorum* (Araneae, Theridiidae). *Entomological Science*, 12: 232-237.

Ueno T. 1999. Host-size dependent sex ratio in a parasitoid wasp. *Researches on Population Ecology* 41, 47-57.

Weng JL & Barrantes G. 2007. Natural history and larval behavior of the parasitoid *Zatypota petronae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Hymenoptera Research* 16: 326-335.

CAPÍTULO II

**Frequência de parasitismo e seleção de
hospedeiros por *Hymenoepimecis bicolor* (Brullé
1846) (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae)**

Resumo

Vespas do grupo de gêneros *Polysphincta* são conhecidas por utilizarem, e em alguns casos manipularem, o comportamento de aranhas construtoras de teias. O gênero *Hymenoepimecis*, é um dos 22 gêneros do grupo *Polysphincta* cujas larvas de terceiro ínstar induzem seus hospedeiros a construir uma teia modificada que servirá de suporte para a ancoragem do seu casulo. Neste estudo descrevemos a frequência de parasitismo de *H. bicolor* sobre *N. clavipes* e constatamos a escolha do tamanho do hospedeiro. Também observamos que a larva do parasitoide não é removida pela ecdise da aranha, que permanece aderida ao corpo da aranha e que aranhas no período de pré-ecdise constroem teias modificadas muito semelhantes à teias modificadas construídas por aranha parasitadas. As 56 aranhas parasitadas apresentaram abdômen com comprimento entre 4,5 e 9,9mm e foram coletadas no período de maior pico da população. A escolha deste tamanho de hospedeiro, pode estar relacionada diretamente com um *trad-off* entre tamanho do hospedeiro e risco de injúria. Observamos que seis dias antes da ecdise, ocorre diminuição do número de raios e espiras, acarretando uma diminuição do tamanho da teia. A teia modificada construída por aranhas no período de pré-ecdise são muito similares à teia modificada construída por aranhas parasitadas dias antes de serem mortas pela larva do parasitoide. A teia de ecdise apresenta estabilimentos em forma de zigue-zague. Verificamos também que os casos de duplo parasitismo ocorrem mais no início e no final da estação chuvosa, sendo que em um destes casos documentados, a larva de maior tamanho matou a larva menor e a eliminou juntamente com os despojos do hospedeiro.

Palavras chave: duplo parasitismo, ecdise, *Nephila*, *Polysphincta*, teias.

Introdução

O grupo de gêneros *Polysphincta* (=Polisphinctini Townes 1969) formado atualmente por 22 gêneros (Gauld & Dubois 2006, Pallacio *et al.* 2007), apresenta distribuição cosmopolita, sendo reconhecidos como vespas ectoparasitoides cenobiontes de aranhas construtoras de teias de várias famílias (Dubois *et al.* 2002, Gauld & Dubois 2006). O gênero *Hymenoepimecis* Viereck 1912, incluído no grupo *Polysphincta*, apresenta distribuição restrita à região neotropical (Gauld 2000) e utilizam como hospedeiras, aranhas que constroem teias orbiculares das famílias Nephilidae (Fincke *et al.* 1990, Gonzaga *et al.* 2010), Tetragnathidae (Eberhard 2000a, b, 2001, Sobczak *et al.* 2009) e Araneidae (Gonzaga & Sobczak 2007, Sobczak *et al.* 2012, Sobczak *et al.* 2012a,b).

O primeiro estudo descrevendo parte da história natural do gênero *Hymenoepimecis* foi realizado por Fincke *et al.* (1990) estudando populações de *N. clavipes* parasitadas por *Hymenoepimecis robertsae* Gauld 1991, no Panamá. Eles registraram uma alta taxa de parasitismo em aranhas de tamanho intermediário, chegando a 30% de todas as aranhas observadas. Também descreveram o comportamento de oviposição, tempo de desenvolvimento da vespa e registraram casos de duplo parasitismo.

Outros estudos sobre a história natural do gênero *Hymenoepimecis* foram publicados em sequência. Eberhard (2000a, b, 2001) verificou que larvas de terceiro ínstar de *Hymenoepimecis argyraphaga* Gauld 2000 eram capazes de induzir o seu hospedeiro, a aranha *Leucauge argyra* (Walckenaer 1842), a construir uma teia modificada na noite que a larva mata a aranha. Além disso, forneceu informações detalhadas sobre o comportamento e morfologia dos ínstares larvais de *H. argyraphaga*.

Gonzaga & Sobczak (2007) descreveram o comportamento de ataque, oviposição e também um evento de infanticídio na espécie *Hymenoepimecis veranii* Loffredo e Penteado-Dias, 2009, parasitando *Araneus omnicolor* (Keyserling 1893) na Serra do Japi Jundiá-SP. Essa espécie de vespa parasita preferencialmente aranhas fêmeas de tamanho médio (abdômen com comprimento entre 4,9 e 6,9 mm), contrariando a hipótese de que aranhas maiores (abdômen com comprimento acima de 7,0 mm) seriam selecionadas por apresentarem maior disponibilidade de biomassa para o desenvolvimento das larvas. Padrão semelhante na utilização de hospedeiros de tamanho médio já havia sido observado por Fincke *et al.* (1990) em *N. clavipes* parasitada por *H. robertsae*.

Gonzaga *et al.* (2010) verificaram que as larvas de terceiro ínstar de *H. bicolor* e *H. robertsae* foram capazes de induzir a aranha *N. clavipes* a construir uma teia modificada, sendo que a teia induzida pela larva de *H. bicolor* era muito mais resistente a fatores abióticos (como vento e chuva) que teias construídas por aranhas não parasitadas.

Além da alteração na arquitetura da teia de *N. clavipes*, desencadeada possivelmente por compostos químicos que a larva de terceiro ínstar injeta na aranha (Gonzaga *et al.* 2010), a alteração no formato da teia desta espécie pode ocorrer ao longo do ciclo de vida da aranha, podendo refletir, entre outros aspectos, uma alteração fisiológica (Higgins 1990). A alteração no padrão de construção da teia desta espécie foi observada pela primeira vez por Robinson & Robinson (1973), quando verificaram que as teias diminuíaam de tamanho no período pré-ecdise.

Material e métodos

O estudo foi conduzido na Reserva Biológica da Serra do Japi, localizada no município de Jundiá (23°15'S, 46°57'W), Estado de São Paulo, Brasil.

Para verificar a frequência de aranhas parasitadas e a existência de escolha de hospedeiro baseada em tamanho corporal foram inspecionadas fêmeas e machos adultos e sub-adultos de *N. clavipes* encontrados na borda da mata ao longo de um transecto de 2 km, entre novembro de 2009 e novembro de 2010, na região conhecida como “DAE”. A variável comprimento do abdômen foi mensurada com um paquímetro e foi escolhida por ser altamente correlacionada com o peso das aranhas para ambos os sexos (fêmeas: $r=0.88$, $n= 15$, $P< 0.001$, machos: $r=0.87$, $n= 15$, $P< 0.001$; Gonzaga *et al.* dados não publicados), e por ser de fácil obtenção em condições de campo.

Os dados de ecdise e duplo parasitismo foram obtidos de aranhas mantidas em condições de semi-cativeiro em gaiolas confeccionadas com varas de bambu (0,5 x 0,5 x 1,6m) cobertas com uma tela fina (Fig.1). As aranhas foram alimentadas diariamente com exemplares de *Musca domestica* durante o período de janeiro a março em 2010 e 2011.

As larvas de *H. bicolor* e suas aranhas hospedeiras foram depositadas na coleção da Universidade Federal de São Carlos (DCBU - curadora A. M. Pentead-Dias), São Carlos, SP, Brasil.



Figura. 1. Gaiolas de bambu montadas próximas a estação de pesquisa da REBIO Serra do Japi, onde foram mantidas as fêmeas de *Nephila clavipes*.

Resultados

Frequência de parasitismo

A população de *N. clavipes* apresentou apenas um ciclo anual com um pico de crescimento das aranhas durante a estação chuvosa (novembro-abril). No final da estação seca e início da estação chuvosa (novembro) pequenas aranhas, com tamanho do abdômen em média de 1,9 mm até aranhas com tamanho médio de 4,5 mm foram encontradas, sendo que as aranhas com tamanho próximo de 4,5 mm foram encontradas parasitadas por larvas de *H. bicolor* (Fig. 2). A frequência de ocorrência de aranhas parasitadas foi maior entre os meses de janeiro e fevereiro e diminuiu conforme as aranhas foram crescendo e atingindo o estágio de adultas (Fig. 2).

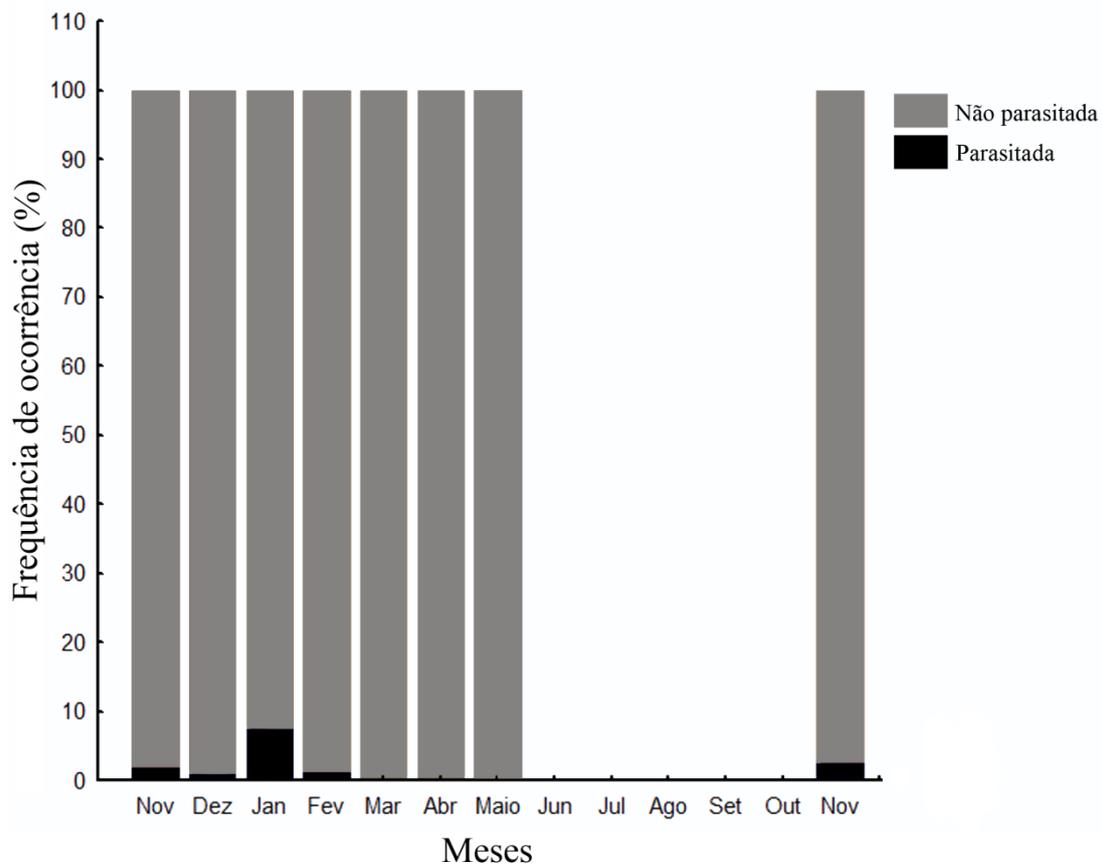


Figura 2. Frequência de ocorrência de *Nephila clavipes* encontradas parasitadas e não parasitadas durante o período de observação na Reserva Biológica da Serra do Japi, Jundiá, SP, Brasil.

Escolha de hospedeiro

Das 1626 aranhas amostradas durante o período de estudo, 56 estavam parasitadas por larvas ou ovos de *H. bicolor*, sendo, portanto a frequência de parasitismo de 3,5% (Fig. 3). Observamos também que existe preferência da vespa *H. bicolor* por hospedeiros de tamanho intermediário (entre 4,5 a 8,9 mm de comprimento do abdômen). Aranhas com abdômen menor que 4.0 mm e maior que 10 mm nunca foram encontradas parasitadas.

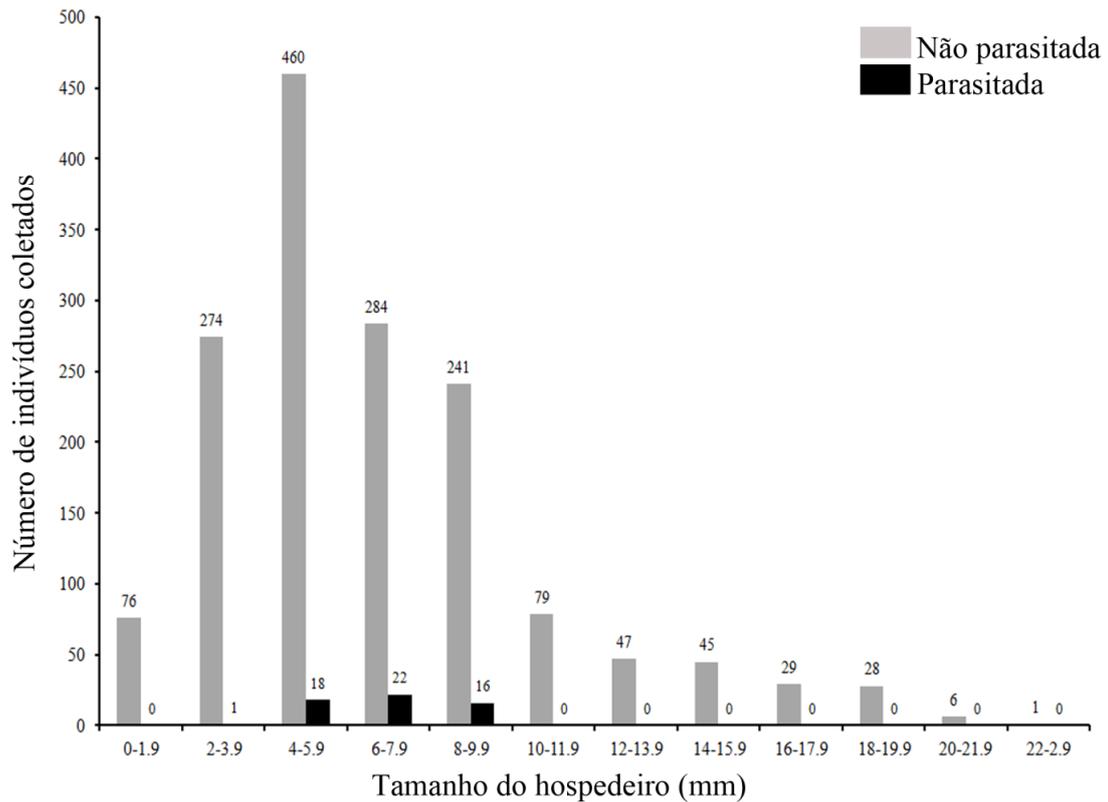


Figura 3. Comprimento do abdômen de *Nephila clavipes* encontradas parasitadas e não parasitadas entre novembro de 2009 á novembro de 2010 na Reserva Biológica da Serra do Japi, Jundiaí, SP, Brasil.

Ecdise da aranha parasitada

Constatamos (n=3) que a aranha realiza a ecdise sem remover a larva do parasitoide (2^o. ínstar) que estava aderida ao seu abdômen (Figs 4a, b). Em local próximo do corpo da larva a cutícula antiga da aranha se destaca sem, no entanto, desgrudar do corpo da aranha (Fig. 4b, seta). A larva do parasitoide continua consumindo hemolinfa durante e após a ecdise da aranha, perfurando as cutículas antiga e nova.

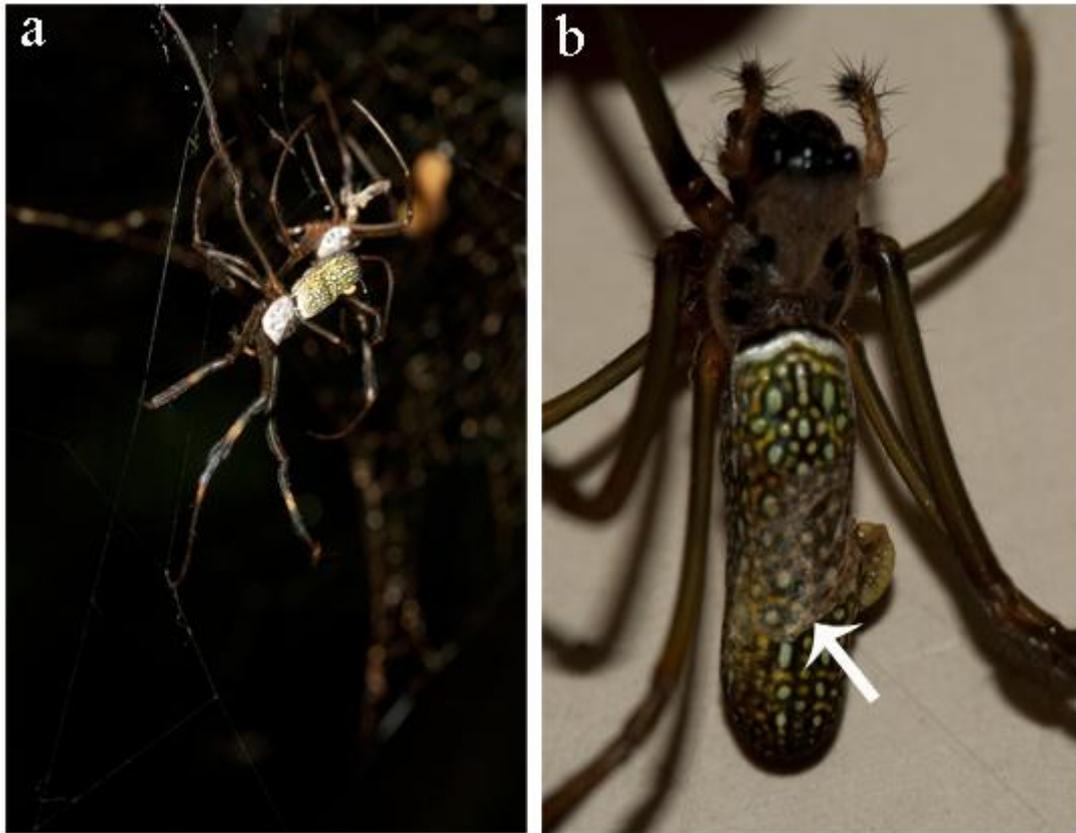


Figura 4. a) Fêmea sub-adulta de *Nephila clavipes* após ecdise; b) Aranha após a ecdise, detalhe de resto da antiga cutícula ainda aderida ao abdômen da aranha (seta).

Teia modificada para a ecdise de aranhas não parasitadas

Ocorre uma diminuição do número de raios e espiras em teias construídas por *N. clavipes* dias antes da realização da ecdise (n=5) (Fig. 5c), ficando a teia normal semelhante à teia modificada construída por aranhas com larvas de terceiro ínstar de *H. bicolor* (Fig.5b).

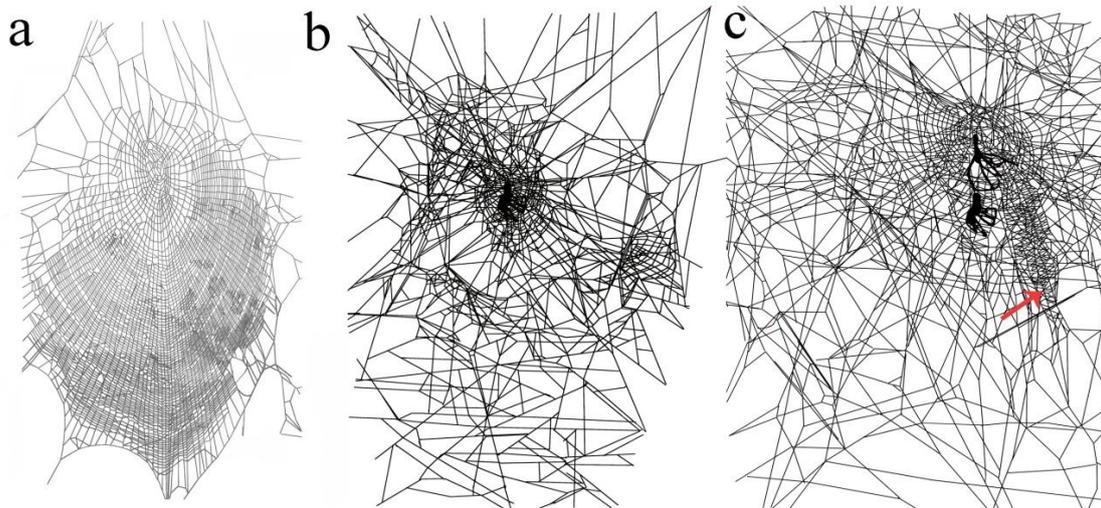


Figura 5. **a)** Teia normal construída por *Nephila clavipes* não parasitada (adaptado de Gonzaga *et al.* 2011); **b)** teia modificada construída pela aranha parasitada; **c)** teia construída para a ecdise da aranha não parasitada, a seta mostra os estabilimentos em zigue-zague.

A teia de ecdise caracteriza-se por uma diminuição gradativa do número de raios e espiras dias antes da aranha realizar a ecdise (Fig. 6). As espiras deixam de ser adesivas; na parte central da teia existem várias espiras e, na região abaixo do centro da teia, ocorrem estabilimentos em zigue-zague (Fig. 5c). Em quatro observações, a aranha só retornou a construção da teia normal após se passarem quatro dias após a ecdise. Durante este período a aranha não adiciona fios na teia, permanecendo imóvel na maior parte do tempo. Em apenas uma observação a aranha abandonou o local onde estava a teia de ecdise e construiu uma nova teia normal.

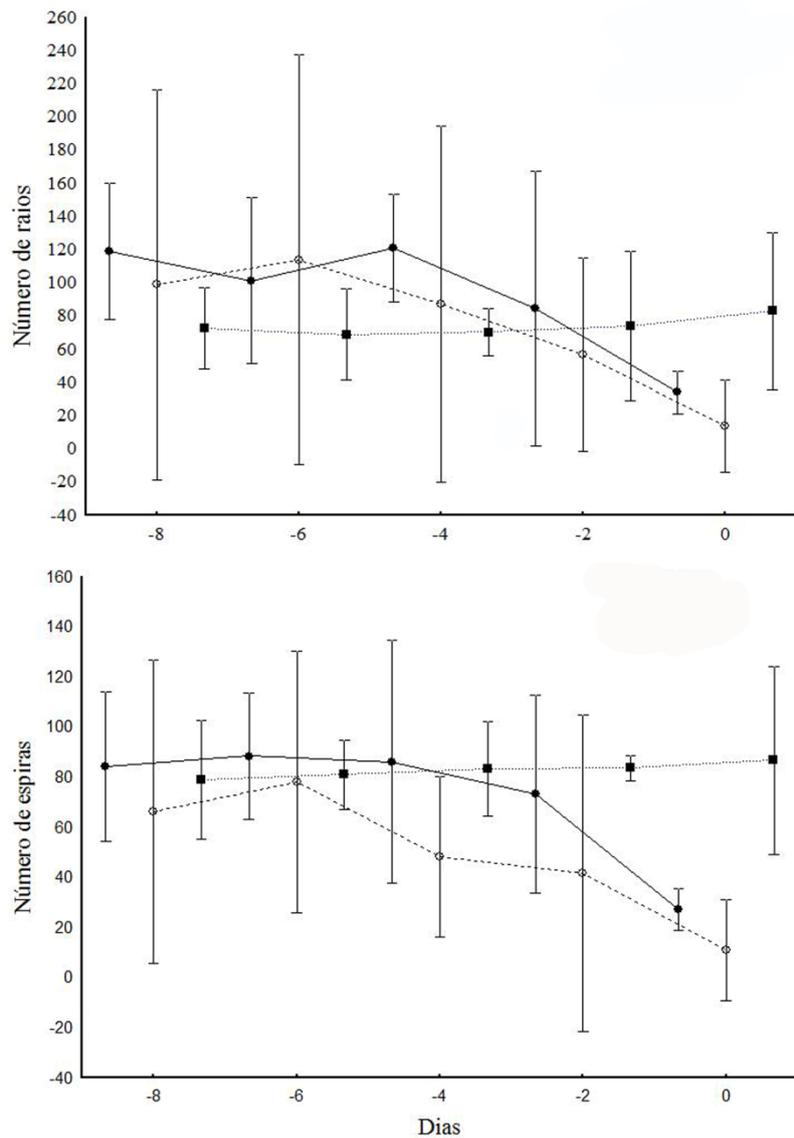


Figura 6. Número de raios e espiras em teias modificadas construídas por *Nephila clavipes* parasitadas com larvas de terceiro ínstar de *Hymenoepimecis bicolor* (círculos pretos); por aranhas não parasitadas dias antes da ecdise (círculos brancos); e por aranhas em estado normal (quadrados pretos). O dia 0 representa o dia em que a aranha parasitada é consumida pelo parasitoide e que as aranhas realizam ecdise.

Duplo parasitismo

Em março de 2010, um macho sub-adulto de *N. clavipes* foi coletado com duas larvas de *H. bicolor* aderidas ao seu abdômen, ambas com tamanhos diferentes, a menor ocupando a posição próximo do cefalotórax e a maior posicionada no centro do

abdômen da aranha (Fig. 7a). Destas apenas a larva menor sobreviveu com crescimento rápido, chegando a envolver a outra com seu corpo (Fig. 7b), perfurando e matando a mesma (Figura 7a seta apontando os pontos vermelhos).

Depois de consumir toda a parte do abdômen e também sugar a hemolinfa presente nas pernas da aranha, a larva sobrevivente descartou os restos do hospedeiro juntamente com o corpo da outra larva (Fig. 7c). Constatamos que os casos de duplo parasitismo são aparentemente mais frequentes no início e no final da estação chuvosa.



Figura 7. Macho de *Nephila clavipes* parasitado por duas larvas de *Hymenoepimecis bicolor*; **a)** larva 2 bem menor do que a larva 1, a seta aponta para as cicatrizes e hemolinfa coagulada na larva 2; **b)** larva 2 sugando hemolinfa das pernas da aranha; **c)** despojos do hospedeiro descartado pela larva 1, juntamente com o corpo da larva 1.

Discussão

A frequência de ocorrência de aranhas parasitadas foi baixa se comparada com outros estudos. Eberhard (2000a), por exemplo, observou que 66,4% dos exemplares de *L. argyra* estavam parasitadas com larvas de *H. argyraphaga* na Costa Rica. Gonzaga & Sobczak (2007) também registraram alta frequência de parasitismo, ao investigar a interação entre *Araneus omnicolor* e *Hymenoepimecis veranii* na Serra do Japi. Nesse caso, também descrito na Serra do Japi, 41,17% dos exemplares de *A. omnicolor* estavam parasitados.

Hymenoepimecis veranii escolhe aranhas de tamanho intermediário para ovipor (Gonzaga & Sobczak (2007). Fincke *et al.* (1990) também observaram que *H. robertsae* evita aranhas de tamanho muito grande ou muito pequeno. O presente trabalho corrobora a hipótese de que aranhas menores não apresentam a quantidade de biomassa requerida para o desenvolvimento da larva, enquanto aranhas maiores apresentam um maior grau de dificuldade no momento da imobilização.

Nielsen (1923) foi o primeiro a observar que a aranha *Meta segmentada* (Clerck 1757) parasitada por larva de *Polysphincta clypeata* (Holmgren 1860) passa pelo processo de ecdise, mas não consegue remover a larva aderida em seu abdômen. Este último autor tratou de detalhes sobre este fenômeno para outras espécies de aranhas: *Cyclosa conica* (Pallas 1772), *Theridium lunatum* (Koch, 1841), *Epeira quadrata* (Clerck 1757), todas parasitadas por vespas do grupo *Polysphincta*. Eberhard (2000a) também observou que algumas aranhas da espécie *L. argyra* passam pela ecdise sem eliminar a larva de primeiro ínstar do parasitoide *H. argyraphaga*. Finalmente, Gonzaga *et al.* (2010) observaram um adulto de *N. clavipes* que realizou ecdise, mas não removeu a larva do parasitoide *H. robertsae*. Uma provável explicação para a

permanência da larva seria que ela é capaz de produzir alguma substância que interfere na renovação da cutícula em seu local de fixação, delimitando uma área próxima do seu corpo onde a cutícula antiga não é eliminada.

A ocorrência de uma possível manipulação química por parte da larva (Eberhard, 2000a) ou por parte da fêmea adulta da vespa no momento da oviposição (Nielsen, 1923) são as duas possíveis causas descritas para a larva do parasitoide não ser removida no momento da ecdise. Supomos, assim como (Eberhard, 2000a), que a larva de primeiro ínstar é capaz de secretar substâncias que atuam inibindo a ecdise da aranha, manipulando, desta forma, a fisiologia deste hospedeiro.

As teias normais construídas por *N. clavipes* sub-adultas são compostas por uma parte orbicular formada por vários raios e espiras adesivas, uma parte central sem espiras onde a aranha permanece posicionada e uma teia de barreira formada por fios mais resistentes e que ficam posicionados na frente da parte orbicular (Gonzaga *et al.*, 2010). Já as teias modificadas construídas por aranhas parasitadas por larvas de terceiro ínstar de *H. bicolor* apresentam diminuição abrupta do seu tamanho, com redução significativa do número de raios e no número de espiras apenas três dias antes da morte do hospedeiro. Neste caso as espiras não são adesivas (Gonzaga *et al.*, 2010). A teia de ecdise também apresenta uma redução da parte orbicular nos dias que antecedem a ecdise e as espiras também não são adesivas. Nestas teias existe a presença da estrutura de estabilimento em forma de zigue-zague que talvez proporcione mais resistência à teia (Robinson & Robinson 1973).

A redução do tamanho das teias de ecdise e modificadas e a ausência de espiras adesivas podem refletir uma alteração na fisiologia da aranha, seja em decorrência da injeção de compostos químicos pela larva ou pelo aumento do nível de hormônio

ecdisona. Bonaric (1987) descreveu que em *Pisaura mirabilis* (Clerck, 1757) (Pisauridae) a aranha deixa de reparar a parte orbicular da teia dias antes do momento da ecdise, coincidindo com um pico de concentração de ecdiesteróide no corpo da aranha. É possível que o composto que a larva de terceiro ínstar injeta na aranha seja semelhante ao hormônio ecdisona. Em *A. omnicolor* (Araneidae), quando a aranha se aproxima do período de pré-ecdise também ocorre redução da parte orbicular da teia. Depois deste período a aranha volta a construir teias normais (Sobczak, dados não publicados). O mesmo foi constatado por Gonzaga *et al.* (2010), estudando *N. clavipes* parasitadas por *H. robertsae* na Costa Rica.

A degradação da teia poderia por em risco a sobrevivência da pupa do parasitoide, o que pode ser o principal motivo para o surgimento de estratégias relacionadas à indução de modificações comportamentais nos hospedeiros. Com essas modificações, as aranhas passam a construir uma estrutura mais resistente para abrigar o casulo. A alteração da teia de ecdise com alteração do número de raios e espiras, bem como a ausência de espiras adesivas e o reforço proporcionado pelos estabilimentos logo abaixo da plataforma de ecdise (Higgins, 1990), são estratégias que provavelmente foram adotadas pela aranha para evitar que, nesta fase, a teia intercepte insetos. Na tentativa de se libertarem poderiam danificá-la e comprometer a sobrevivência da aranha durante este período vulnerável do seu ciclo de vida (Robinson & Robinson 1973).

Casos de duplo parasitismo sobre aranhas não são muito comuns na literatura. Fincke *et al.* (1990), estudando espécimes de *N. clavipes* no Panamá parasitados por *H. robertsae*, encontraram quatro casos de duplo parasitismo. Eberhard (2000a) encontrou algumas aranhas da espécie *L. argyra* com duas larvas de *H. argyraphaga* aderida em seu abdômen. O duplo parasitismo é raro na natureza, uma vez que no momento da

oviposição a vespa pode remover a larva ou ovo anteriormente depositados (Eberhard 2000a; Fincke *et al.* 1990; Gonzaga & Sobczak 2007). Casos de remoção de ovos ou mesmo larvas de primeiro ínstar só foram registrados para dois gêneros do grupo *Polysphincta*, *Hymenoepimecis* (Gonzaga & Sobczak 2007; Eberhard, 2000a; Fincke *et al.*, 1990) e *Zatypota* (Takasuka & Matsumoto 2011; Sobczak *et al.*, em preparação). Gonzaga & Sobczak (2007) observaram que fêmeas de *H. veranii* podem remover, com o auxílio do ovipositor, ovos previamente colocados no abdômen de *A. omnicolor*, o que foi caracterizado como um evento de infanticídio. Quando a vespa falha em remover a larva ou o ovo previamente depositado, pode levar à ocorrência de duplo parasitismo. Neste caso, provavelmente apenas uma das larvas consegue sobreviver .

No início da estação chuvosa, o tamanho das aranhas hospedeiras de *H. bicolor* está muito abaixo do tamanho adequado ao parasitismo (tamanho intermediário de abdômen (Fig.3). Neste período algumas aranhas de tamanho intermediário apresentaram duplo parasitismo. Quando as aranhas ultrapassam o tamanho intermediário, já no fim da estação chuvosa, ocorre um aumento no número de machos parasitados. Nesse período, recursos adequados (fêmeas de tamanho intermediário) também são escassos, o que levaria a casos de duplo parasitismo. Além disso, os machos de *Nephila clavipes*, nesse período, apresentam tamanho muito similar ao tamanho das fêmeas sub-adultas de tamanho intermediário. Possivelmente devido à escassez de hospedeiros, as vespas preferem ovipor em aranhas que chegam próximo do tamanho adequado, mesmo com o risco de canibalismo inerente nos casos de duplo parasitismo.

Agradecimentos

Ao prof. Dr. João Vasconcellos Neto. pelo fornecimento dos equipamentos de filmagens e fotografias; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de doutorado para JF Sobczak e bolsa de pesquisa para AM Penteado-Dias; ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Hymenoptera Parasitoides da Região Sudeste Brasileira, pelo suporte financeiro; à Prefeitura Municipal de Jundiaí, por permitir as estadias de JF Sobczak na Base de Estudos de Ecologia e Educação Ambiental da Serra do Japi.

Referências Bibliográficas

- Bonari JC (1987) Molting hormones. In Nentwig, W. (ed.), *Ecophysiology of Spiders*, Springer-Verlag, New York, pp. 111-118.
- Dubois J, Rollard, C, Villemant, C. and Gauld, I. D (2002) The phylogenetic position of parasitoids of spiders within Pimplinae (Hymenoptera, Ichneumonidae). In: Samu F, Szinetár Cs (eds) *Proceedings of the 20th European Colloquium of Arachnology*. Plant Protection Institute and Berzsenyi College, Budapest, pp 27–35.
- Eberhard WG (2000a) The natural history and behavior of *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera: Ichneumonidae) a parasitoid of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae). *Journal of Hymenoptera Research* 9:220-240.

Eberhard WG (2000b) Spider manipulation by a wasp larva. *Nature* 406: 255-256.

Eberhard WG (2001) Under the influence: webs and building behavior of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae) when parasitized by *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Journal of Arachnology* 29: 354-366.

Fincke OM, Higgins L, Rojas E (1990) Parasitism of *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae) by an ichneumonid (Hymenoptera, Polysphinctini) in Panama. *Journal of Arachnology* 18:321-329.

Gauld ID (2000) The re-definition of pimpline genus *Hymenoepimecis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) with a description of a plesiomorphic new Costa Rican species. *Journal of Hymenoptera Research* 9: 213-219.

Gauld ID, Dubois J (2006) Phylogeny of the *Polysphincta* group of genera (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae): a taxonomic revision of spider ectoparasitoids. *Systematic Entomology* 31: 529-564.

Gonzaga MO, Sobczak JF (2007) Parasitoid-induced mortality of *Araneus omnicolor* (Araneae, Araneidae) by *Hymenoepimecis* sp. (Hymenoptera, Ichneumonidae) in southeastern Brazil. *Naturwissenschaften* 94: 223-227.

Gonzaga MO, Sobczak JF, Pentead-Dias AM, Eberhard WG (2010) Modification of *Nephila clavipes* (Araneae: Nephilidae) webs induced by the parasitoids *Hymenoepimecis bicolor* and *H. robertsae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Ethology Ecology and Evolution* 22: 151-165.

Higgins LE (1990) Variation in foraging investment during the intermolt interval and before eggLaying in the spider *Nephila clavipes* (Araneae: Araneidae). *Journal of insect Behavior* 3: 773-783.

Matsumoto R, Takasuka K (2011) infanticide by a solitary koinobiont ichneumonid ectoparasitoid of spider. *Naturwissenschaften* 98: 529-536.

Nielsen E (1923) Contributions to the life history of the Pimplinae spider parasites (*Polysphincta*, *Zaglyptus*, *Tromatobia*). *Entomologiske Meddelelser* 14: 137-205.

Palacio EI, Saaksjarvi V, Vahtera (2007) *Lamnatibia*, a new genus of the *Polysphincta* group of genera from Colombia (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae). *Zootaxa* 1431: 55–63.

Robinson MH, & Robinson BC (1973) The stabilimenta of *Nephila clavipes* and the origins of stabilimentum-building in Araneids. *Psyche* 80: 277-288.

Sobczak JF, Loffredo APS, Pentead-Dias AM, Gonzaga MO (2009) Two new species of *Hymenoepimecis* (Hymenoptera: Ichneumonidae, Pimplinae) with notes on their spider hosts and behaviour manipulation. *Journal Natural History* 43: 2691-2699.

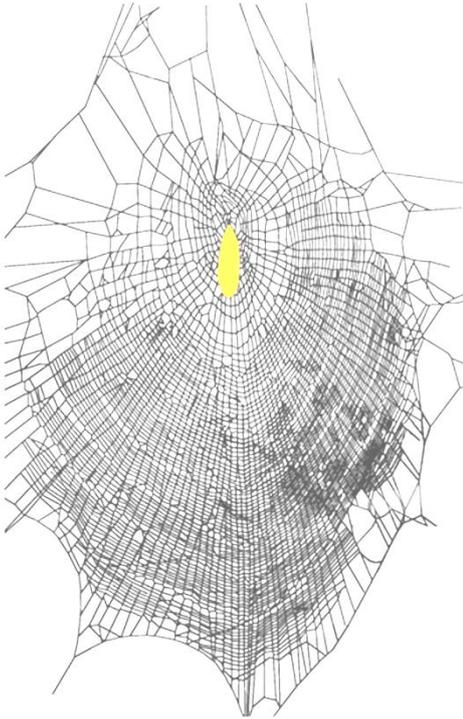
Sobczak JF, Loffredo APS, Pentead-Dias AM (2012a) Parasitism on *Araneus venatrix* (Koch, 1838) (Araneae: Araneidae) by *Hymenoepimecis silvanae* Loffredo & Pentead-Dias, 2009 (Ichneumonidae, Pimplinae) with description of male of the wasp. *Brazilian Journal of Biology* 72: 221-223.

Sobczak JF, Loffredo APS, Pentead-Dias AM (2012b) *Hymenoepimecis neotropica* (Brues & Richardson) (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) parasitoid of *Araneus omnicolor* (Keyserling) (Araneae, Araneidae) first host record and new occurrence to Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 56: 390-392.

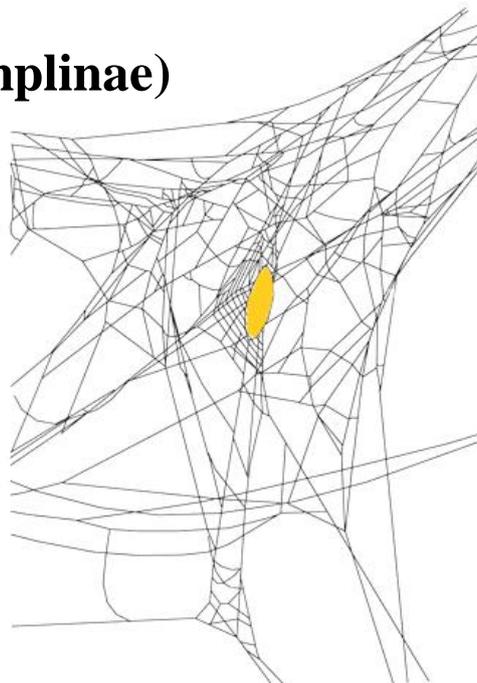
Takasuka K, Matsumoto R (2011) Infanticide by a solitary koinobiont ichneumonid ectoparasitoid of spiders. *Naturwissenschaften* 98: 529- 536.

Townes H. 1969. The genera of Ichneumonidae, part 1: Ephialtinae to Agriotypinae.
Memoirs of the American Entomological Institute 11: 1–300.

CAPÍTULO III



Efeito da modificação na estrutura orbicular de teias de *Nephila clavipes* (Linnaeus 1767) (Araneae: Nephilidae) na sobrevivência das pupas do parasitoide *Hymenoepimecis bicolor* (Brullé 1846) (Hymenoptera: Ichneumonidae, Pimplinae)



Resumo

A modificação do comportamento do hospedeiro induzida por vespas do grupo de gêneros *Polysphincta* pode ocorrer devido a de compostos químicos que a larva de terceiro ínstar injeta no seu hospedeiro. O objetivo desta modificação é tornar a teia do hospedeiro um local mais resistente para a sobrevivência durante o período de pupa. Neste estudo, foram conduzidos dois experimentos, o primeiro para verificar qual seria o efeito da teia modificada na sobrevivência da pupa do parasitoide e o segundo para testar a influência da larva do parasitoide no comportamento de construção de teia. Os casulos construídos em teias normais são mais susceptíveis aos fatores abióticos (ex. vento, chuva) e, portanto, ofereceram um risco maior de mortalidade quando comparado com casulos construídos em teias modificadas. Assim, a teia modificada fornece uma estrutura adequada para que a larva do parasitoide construa o casulo e permaneça em segurança durante todo o estágio de pupa. Após a aranha construir a teia modificada, e a larva de terceiro ínstar ser removida de seu abdômen, foi observado que a aranha retorna gradativamente a construção de uma teia normal. A teia volta a apresentar uma arquitetura normal após 10 dias da remoção da larva. Portanto, este experimento comprova que a larva de terceiro ínstar de *H. bicolor* pode realmente estar injetando compostos químicos no corpo da aranha que alteram a sua fisiologia que a induz a construir uma teia modificada.

Palavras chave: teias orbiculares, grupo de gêneros *Polysphincta*, parasitoide, manipulação comportamental de hospedeiros

Introdução

A manipulação comportamental dos hospedeiros induzida por insetos parasitoides pode incluir a mudança do hospedeiro de um habitat para outro, o aumento da taxa de consumo de alimentos pelo hospedeiro, o cuidado da prole do parasitoide pelo hospedeiro e/ou a construção de estruturas para suportar e proteger o casulo do parasitoide (Wickler 1976, Godfray 1994, McLachlan 1999, Eberhard 2000a, Grosman *et al.* 2008, Matsumoto 2009, Sobczak *et al.* 2009, Gonzaga *et al.* 2010, Korenko & Pekár 2011). O desenvolvimento, crescimento e a sobrevivência do hospedeiro parasitado apresentam consequências diretas para o desenvolvimento dos estágios imaturos do parasitoide (Fritz 1982). Desta forma, o parasitoide pode regular os processos de desenvolvimento do hospedeiro injetando substâncias, como venenos e hormônios, que são capazes de alterar a fisiologia do hospedeiro, assegurando que seu ciclo de vida não será interrompido (Vinson 1975).

Parasitoides do grupo de gêneros *Polysphincta* (= *Polisphinctini sensu* Towes 1969) são conhecidos como ectoparasitoides cenobiontes de aranhas construtoras de teias de várias famílias (veja Dubois *et al.* 2002, Gauld & Dubois 2006). Os estágios imaturos de algumas espécies deste grupo, cuja biologia está bem conhecida, podem manipular o comportamento de construção da teia de seus hospedeiros através da inoculação de compostos químicos, induzindo as aranhas a construírem teias modificadas (Eberhard 2000a, b, Gonzaga & Sobczak 2007, Sobczak *et al.* 2009, Gonzaga *et al.* 2010), as quais parecem ser muito mais resistentes às intempéries (Gonzaga *et al.* 2010).

A teia modificada construída pela aranha *Leucauge argyra* (Tetragnathidae) induzida pelo parasitoide *Hymenoepimecis argyraphaga*, aparentemente, é resultado da injeção de compostos químicos pela larva no corpo do hospedeiro (Eberhard 2000a, b,

2001). Como consequência a aranha constrói uma teia modificada mais resistente, usada para suportar o casulo da vespa (Eberhard 2001). Gonzaga & Sobczak (2007) observaram que teias de *Araneus omnicolor* parasitada por *Hymenoepimecis veranii* também apresentavam a parte orbicular reduzida. Matsumoto (2009) demonstrou que a manipulação comportamental em *Agelena limbata* Thorell 1897 (Agelenidae), feita pelo ectoparasitoide cenobionte *Brachyzapus nikkoensis* Uchida 1928, (Ichneumonidae) resulta na construção de uma estrutura de seda muito particular, conferindo uma maior capacidade de proteção ao casulo do parasitoide contra o ataque de formigas. Gonzaga *et al.* (2010) observaram que as teias modificadas construídas por *N. clavipes*, induzidas provavelmente por substâncias químicas injetadas pela larva do parasitoide, *H. bicolor*, são muito mais resistentes à ação de vento e chuva comparada com uma teia normal construída por aranhas não parasitadas.

As modificações estruturais observadas nas teias orbiculares de várias espécies de aranhas (ex: Eberhard 2000a, b, Gonzaga & Sobczak 2007, Sobczak *et al.* 2009, Gonzaga *et al.* 2010, Gonzaga & Sobczak 2011), como a redução do número de raios e espiras viscosas, poderia ser consequência da proximidade com o período de ecdise (Robson & Robson 1973, ver cap. II desta tese), ou ser ocasionada pelo estado fisiológico debilitado da aranha (Sherman 1994, Gonzaga & Sobczak 2007). Porém, Gonzaga *et al.* (2010) demonstraram, através de um experimento de privação alimentar, que a carência nutricional em *N. clavipes* não promove a construção de uma teia modificada, o que reforça a hipótese de que as alterações na arquitetura da teia ocorrem devido a compostos químicos injetados pela larva da vespa.

Na maioria desses casos, entretanto, apesar da constatação da existência de teias modificadas contendo casulos dos parasitoides, se conhece muito pouco sobre os efeitos da modificação na sobrevivência da pupa (ver Matsumoto 2009, Gonzaga *et al.* 2010).

Neste trabalho realizamos um experimento para verificar o efeito da teia modificada, construída por *N. clavipes* parasitadas, na sobrevivência da pupa do parasitoide *H. bicolor*. Foi comparada a sobrevivência das pupas fixadas em teias normais e em teias modificadas. Um segundo experimento foi desenvolvido para demonstrar a influência da presença da larva de terceiro ínstar na construção e manutenção da teia modificada.

Material e Métodos

Área de estudo

O estudo foi conduzido na Reserva Biológica da Serra do Japi, uma reserva florestal localizada no município de Jundiaí (23°15'S, 46°57'W), no estado de São Paulo, Brasil. Aranhas adultas e subadultas de *N. clavipes* parasitadas e não parasitadas foram coletadas na área conhecida como DAE e em estradas próximas da base de pesquisa da Serra do Japi durante o período de janeiro a maio de 2010 e 2011.

Sobrevivência das pupas

Para testar se a teia modificada promove um incremento na probabilidade do casulo permanecer suspenso durante todo o período de desenvolvimento da pupa para a construção do casulo, comparada com casulos construídos em teias normais, foram construídas, durante os anos de 2010 e 2012 no período de janeiro a maio, 30 gaiolas (0,5x0,5x1,6m), confeccionadas com varas de bambu e totalmente cobertas com uma rede fina, para evitar a fuga das aranhas (Fig. 1). Dentro de cada gaiola foi mantida apenas uma aranha. Essas gaiolas foram posicionadas no campo a aproximadamente 100 metros da base de pesquisa. As aranhas mantidas nas gaiolas foram separadas em

três grupos experimentais: **grupo 1)** formado por aranhas parasitadas que construiriam as teias modificadas; **grupo 2)** aranhas parasitadas que seriam transferidas para o grupo 3; **grupo 3)** aranhas não parasitadas que apenas construíam as teias normais para serem utilizadas pelas aranhas do grupo 2. O número de raios e o número de espiras adesivas nas teias de cada grupo foram registrados diariamente (para maiores detalhes da teia ver Gonzaga *et al.* 2010). Após as aranhas do grupo 2 construírem teias modificadas, a larva, juntamente com a aranha ainda viva, foram colocadas no centro da teia normal construídas por aranhas do grupo 3 (Fig. 2 a, b) e a aranha residente era removida. Este momento era contado como dia 0 e, a partir de então, registrava-se por quantos dias o casulo construído na teia normal permanecia ancorado na teia.

Experimento de remoção da larva

Para testar se as larvas de terceiro ínstar são as responsáveis por induzir o hospedeiro a construir teia modificada, as larvas de terceiro ínstar foram removidas dos hospedeiros logo após a construção da teia (Fig. 2). Durante esse experimento foi observado e registrado o número de raios e espiras das teias dois dias antes da construção da teia modificada, logo após sua construção e, em seguida, a cada dois dias após a remoção da larva, durante 10 dias.

Espécimes testemunhos de *H. bicolor* foram depositados na coleção da Universidade Federal de São Carlos (DCBU - curadora A. M. Penteado-Dias), São Carlos, SP, Brasil.

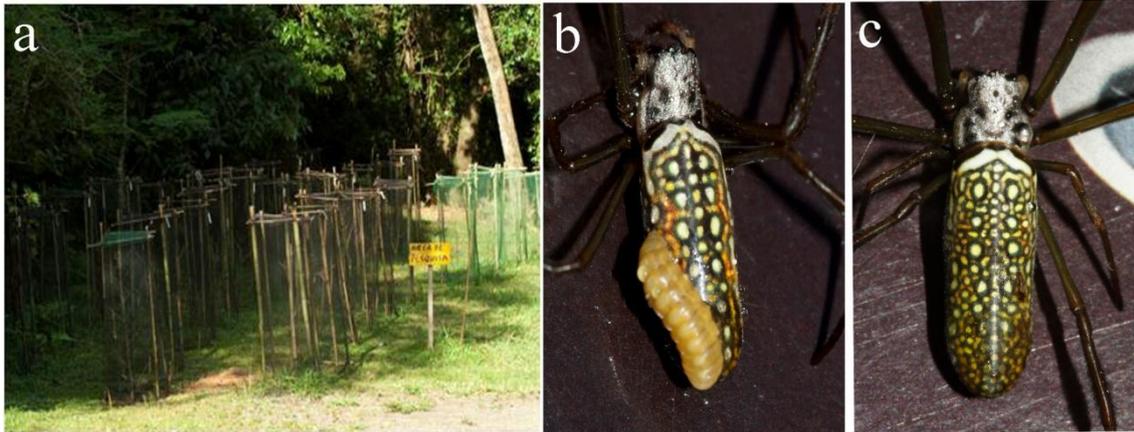


Figura 1. a) Gaiolas de bambu onde foram mantidas as fêmeas de *N. clavipes*; **b)** *N. clavipes* com larva de terceiro ínstar de *H. bicolor*; **c)** aranha após a remoção da larva na Serra do Japi, Jundiá, SP, Brasil.

Resultados

Quando a aranha era transferida para a teia normal, a larva do parasitoide se fixava na teia e retomava o comportamento de sugar a hemolinfa (= retomava a alimentação), ocasionando a morte da aranha. (Fig. 2 a, b), a larva retorna o comportamento de sugar hemolinfa, ocasionando a morte da aranha (Fig. 2c). Após consumir grande parte do corpo da aranha, a larva descarta os despojos do hospedeiro, repetindo os mesmos comportamentos observados nas larvas em teia modificadas (ver cap. IV). Em três ocasiões, a larva falhou em descartar os restos do hospedeiro, sendo que em um caso construiu o casulo envolvendo os restos da aranha (Fig. 4a).

Após a liberação dos despojos da aranha, a larva inicia a construção do casulo presa na teia normal (Fig. 2 d), não sendo observada nenhuma mudança no padrão de construção do casulo entre larvas em teia normal ou em teia modificada. Após quatro horas, a larva estava envolta pelos fios do casulo (Fig. 2e), e após 12 horas o casulo era finalizado (Fig. 2f).

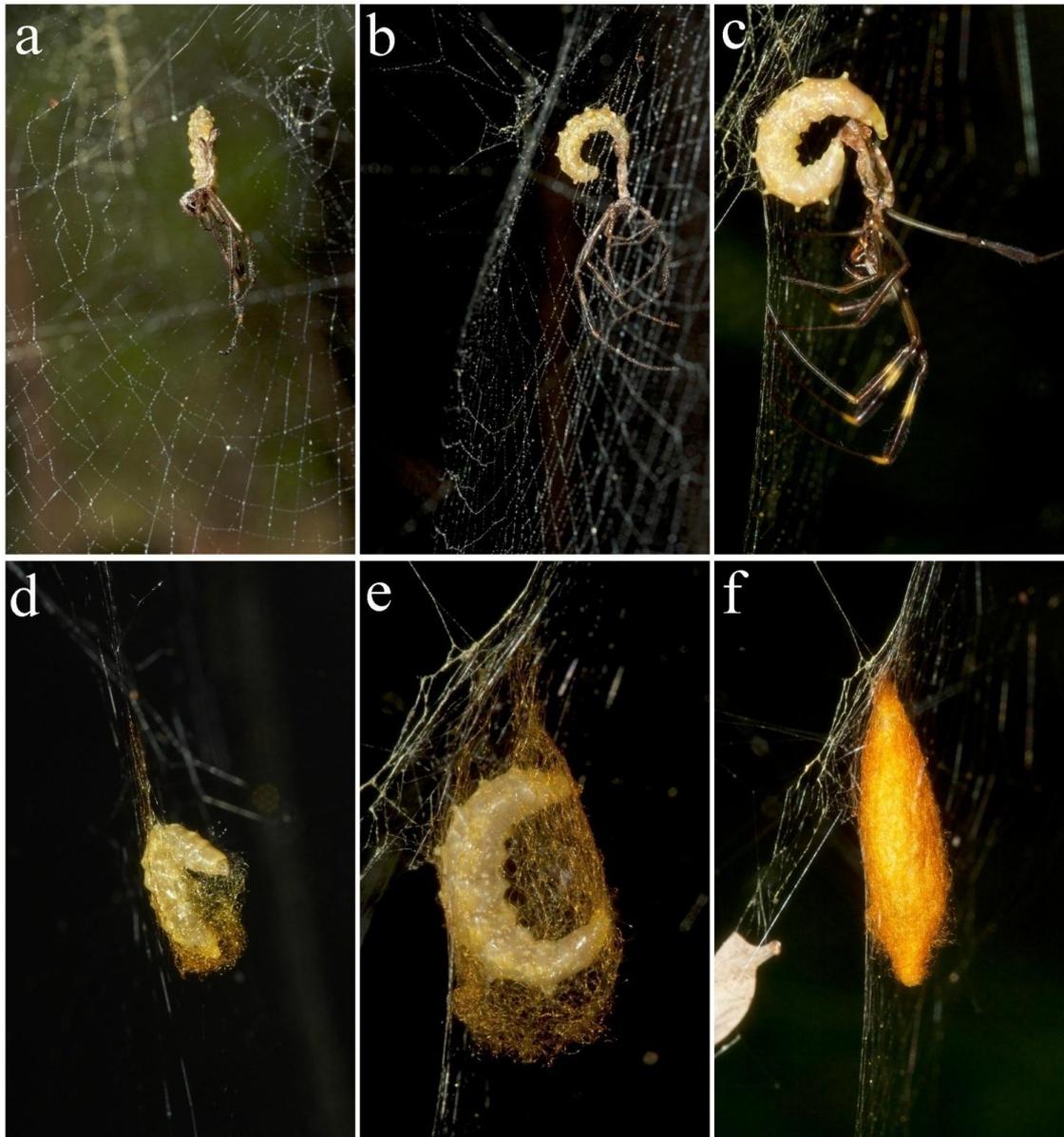


Figura 2. **a)** Vista frontal da teia normal de *Nephila clavipes* com a larva de *Hymenoepimecis bicolor* e os restos da aranha; **b)** Vista lateral da teia normal com a larva presa ao centro da teia; **c)** Detalhe da ancoragem da larva com a cabeça voltada para baixo na teia normal; **d)** Construindo o casulo; **e)** Envoltos pelos fios de seda do casulo; **f)** Casulo finalizado.

Ao todo, 15 aranhas com larvas foram transferidas das teias modificadas para as teias normais construídas por aranhas não parasitadas. Foi observada uma alta taxa de mortalidade para as pupas em teias normais quando comparada com pupas em teias modificadas (Fig. 3). As pupas em teias modificadas sobrevivem mais que aquelas fixadas em teias normais (log-rank: $X^2= 48,13$, $P= 0,0001$) (Fig. 3).

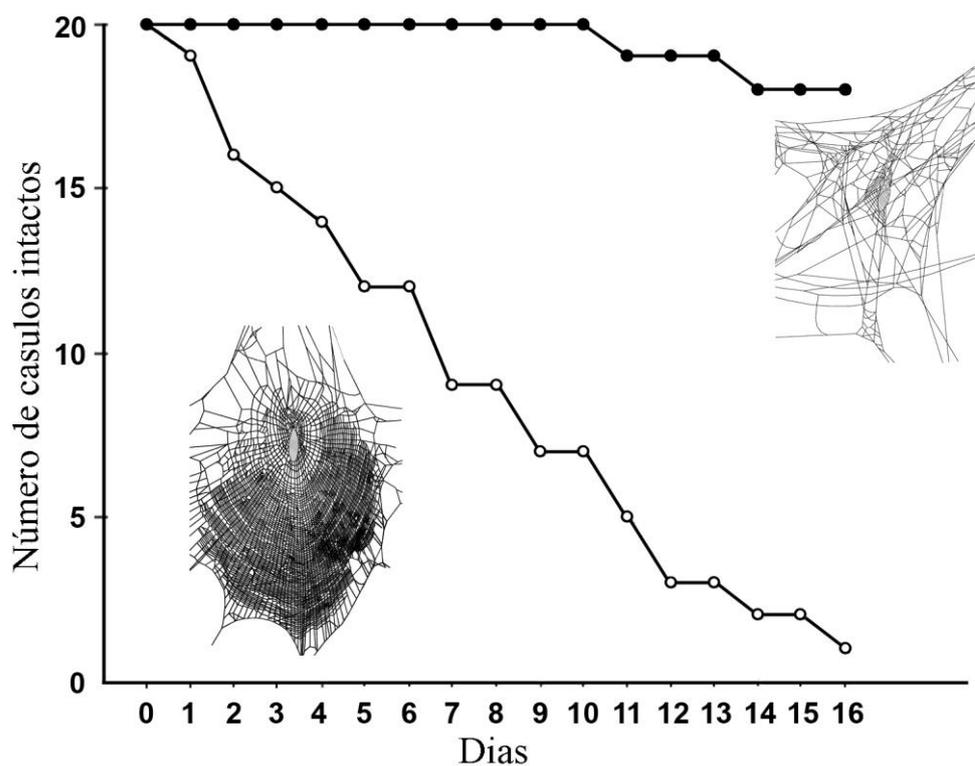


Figura 3. Número de casulos intactos ao longo dos 16 dias do experimento realizado na Reserva Biológica da Serra do Japi. Círculos fechados correspondem aos casulos construídos em teias modificadas, círculos abertos são os casulos construídos em teias normais.

Os casulos que foram construídos em teias modificadas (Fig. 3.) permaneceram intactos nas teias durante todo o desenvolvimento da pupa até a eclosão da vespa adulta. Em apenas uma situação, um casulo construído em teia modificada foi derrubado por uma grande quantidade de folhas que caíram na teia, ocasionando a morte da pupa.

Dentre as causas registradas de insucesso da pupa na teia normal registramos: restos do corpo do hospedeiro junto do casulo dificultando a construção do casulo (Fig. 4a, b), ataque por fungos (Fig. 4c), enrolamento na própria trama de fios do casulo (Fig. 4d), queda da larva (Fig. 4e), queda do casulo na vegetação em decorrência de fortes chuvas e restos de folhas (Fig. 4f).

Os casulos construídos em teias normais balançavam muito devido aos fortes ventos que ocorriam no momento do experimento (vídeo 1), comparado com o casulo construído em teia modificada (vídeo 2). Nestes dois vídeos é possível observar que o casulo preso à teia normal balança muito com a força do vento, uma vez que a teia normal não apresenta a arquitetura adequada para suportar o casulo. Já os casulos presos nas teias modificadas praticamente não se moviam com o vento, demonstrando que a arquitetura da teia modificada pode agir como uma boa estrutura de sustentação (vídeo 2).

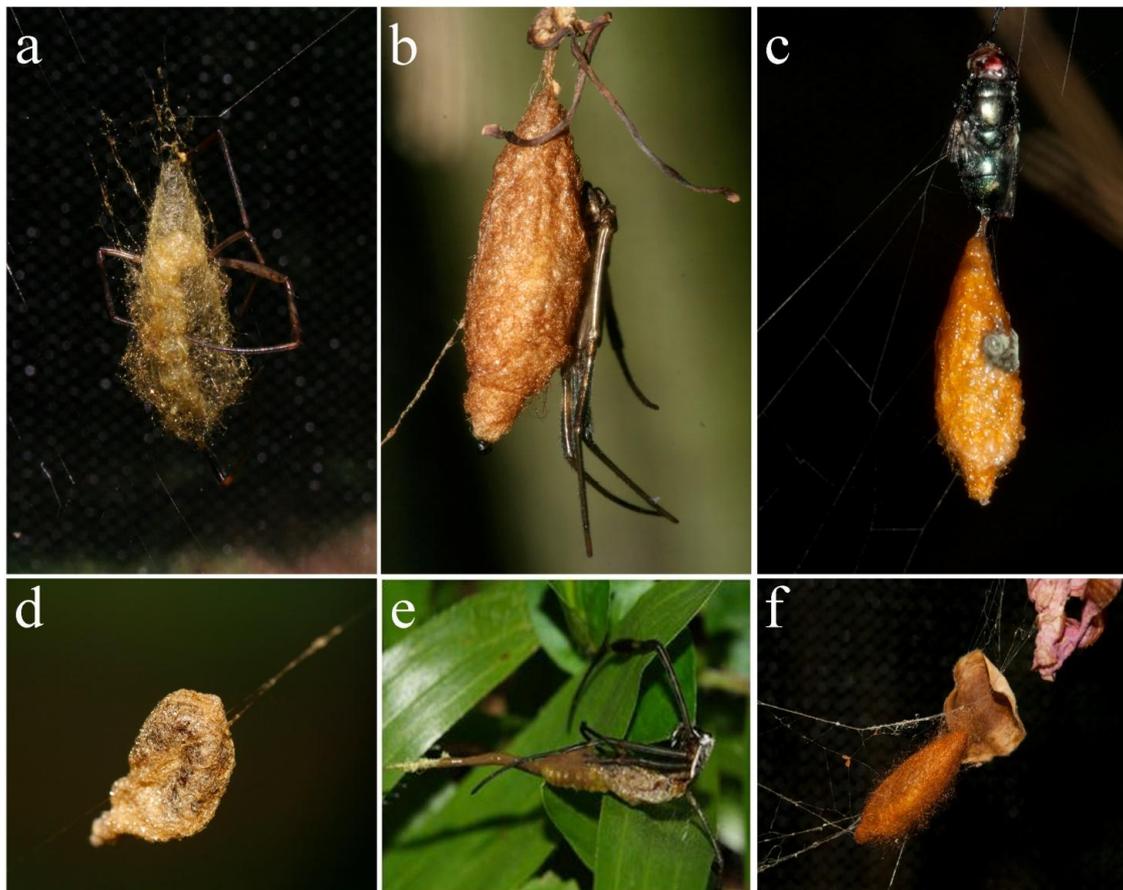


Figura 4. **a)** Larva de *Hymenoepimecis bicolor* construindo casulo em teia normal de *Nephila clavipes*; **b)** restos do hospedeiro aderido ao casulo; **c)** casulo com fungo e, acima, restos de presa do hospedeiro; **d)** larva enrolada na própria seda; **e)** larva e restos do hospedeiro que caíram ao solo; **f)** casulo em teia normal semi destruída após uma forte chuva.

Remoção da larva de terceiro ínstar

Foram removidas as larvas de terceiro ínstar de 15 aranhas parasitadas quando constatamos que a teia normal (Fig. 5a) diminuía a quantidade de raios e espiras, passando para o formato de teia modificada (Fig. 5b).



Figura 5. a) Teia normal construída pela aranha *N. clavipes* parasitada; b) A mesma aranha constrói a teia modificada induzida pela larva do parasitoide; c) Retorno da área

de captura após dois dias da remoção da larva; **d)** Teia normal construída pela aranha após seis dias que a larva havia sido removida.

Em todos os casos observados, no dia em que a larva é removida a aranha permanece imóvel, geralmente no centro da teia modificada, por várias horas, sem adicionar fios de seda. No dia seguinte, faz pequenos reparos nos fios que sustentam a teia, adicionando mais fios de sustentação e ancorando melhor a teia na vegetação. No próximo dia, portanto dois dias depois que a larva foi removida (Fig. 5c e Fig. 6 no dia 02), a aranha volta a construir a parte orbicular, adicionando espiras e raios e também reforçando os fios que sustentam e prendem a teia na vegetação e volta a capturar e ingerir presas (Fig. 5d). Gradativamente, a aranha adiciona raios e espiras na teia e, no sexto dia após a remoção da larva, a teia já apresenta um grande número de raios e espiras, semelhante à teia normal construída antes de ser induzida pela larva (Fig. 5d, Fig. 6, no dia 10).

Em duas observações, a aranha abandonou a teia modificada e construiu outra teia ao lado, porém com número reduzido de raios e espiras. Foi observado também que duas aranhas que estavam parasitadas e faziam parte deste experimento passaram pelo processo de ecdise, alterando a arquitetura de suas teias (ver cap. I teias modificadas para ecdise); estas duas aranhas não foram incluídas nas análises estatísticas.

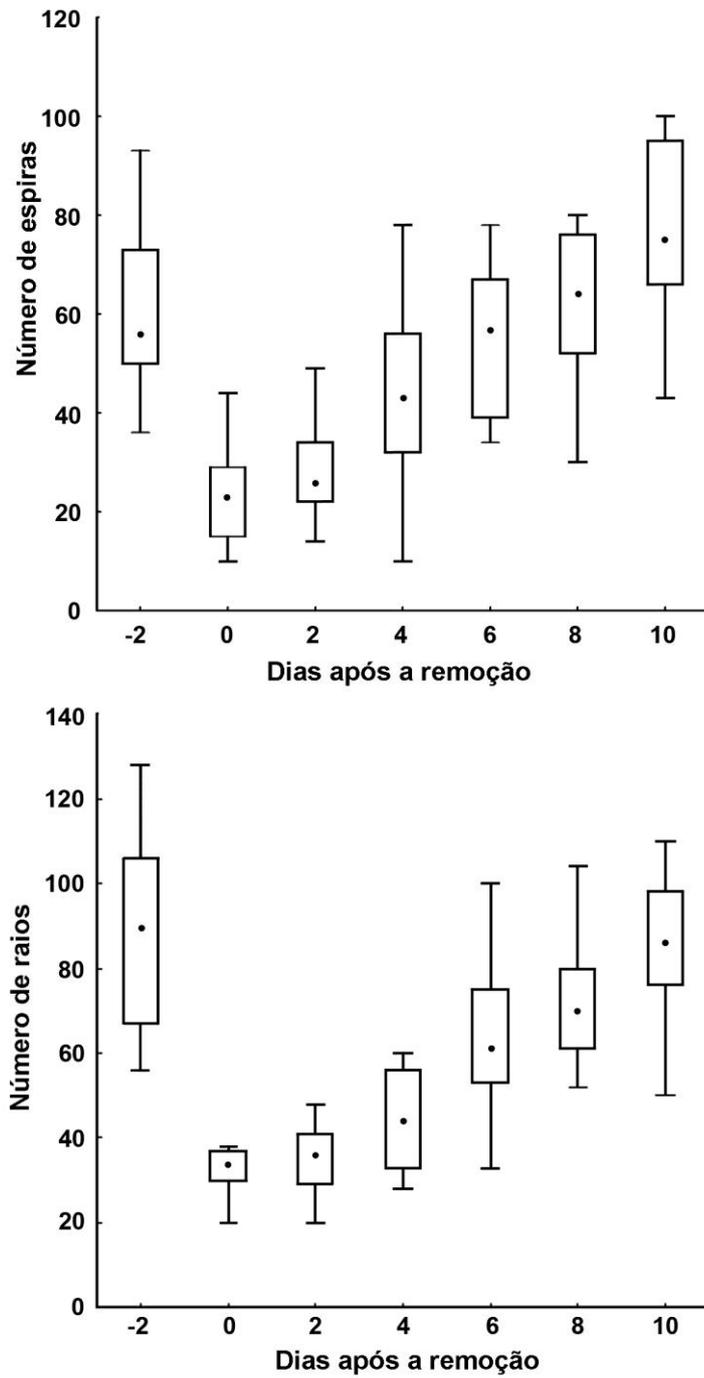


Figura 6. Número de raios e espiras (média e desvio padrão) antes e após a remoção da larva de *Hymenoepimecis bicolor* sobre *Nephila clavipes*.

Discussão

A grande maioria dos casulos construídos em teias normais, sem a devida estabilidade proporcionada pela teia modificada, não sobreviveram até o momento da emergência da vespa adulta (Fig. 2), que ocorre geralmente após o décimo dia (ver cap. III). Em outro experimento realizado com *N. clavipes* no mesmo local, Gonzaga *et al.* 2010 demonstraram que as teias modificadas são realmente muito mais resistentes a fatores abióticos, como chuva e vento forte, que as teias normais construída por aranhas não parasitadas.

A alteração do padrão da arquitetura da teia de *N. clavipes* pode ocorrer quando a aranha é induzida pela larva do parasitoide *H. bicolor* ou *H. robertsae* (Gonzaga *et al.* 2010) ou quando está próxima do período de ecdise (Robson & Robson 1973, ver cap. I). Esta alteração no formato da teia proporciona uma estrutura mais resistente para a pupa do parasitoide, ou para a aranha durante o período de ecdise.

Uma provável explicação para o sucesso da sobrevivência das pupas em teias modificadas pode estar relacionada com a diminuição da parte orbicular da teia e ausência de espiras adesivas. Desta forma, evita-se que presas possam ser interceptadas e ficar aderidas na teia, o que em muitos casos poderia comprometer a estabilidade da teia modificada e interferir na sobrevivência da pupa.

Nas interações registradas envolvendo vespas do grupo *Polysphincta* e aranhas construtoras de teias, a maioria destas teias construídas por aranhas não parasitadas necessita constantemente de reparos e aparentemente são mais frágeis. As teias modificadas construídas por aranhas parasitadas não são reparadas, portanto, precisam ser mais resistentes. Por exemplo, a teia modificada construída por *L. argyra* induzida pela larva de *H. argyraphaga* é muito mais forte do que uma teia normal, construída por

aranhas não parasitadas (Eberhard 2000b). Weng & Barrantes (2007) observaram que a larva de *Zatypota petronae* induz a aranha *Theridion evexum* a adicionar mais fios em diferentes partes da teia, o que incrementa a proteção do casulo contra fortes chuvas que afetariam a sobrevivência da pupa.

Comprovamos nos nossos experimentos que além de promover uma estrutura de ancoragem melhor para a larva do parasitoide construir seu casulo, a teia modificada é eficiente em evitar que injúrias possam danificar ou ocasionar a morte durante o estágio de pupa do parasitoide. A principal causa de morte das pupas/larvas nas teias normais são a chuva e o vento, que danificam as teias e ocasionam a queda das pupas/larvas da teia (Fig.4 e, f). Fincke *et al.* (1990) observaram que fortes chuvas danificam o casulo de *Hymenoepimecis robertsae*, causando a morte da pupa.

A manipulação do comportamento da aranha *N. clavipes* para construir uma teia modificada pode ser desencadeada por substâncias químicas que a larva de terceiro ínstar da vespa *H. bicolor* injeta no corpo da aranha nos três últimos dias que antecedem a morte da aranha (ver Gonzaga *et al.* 2010). Comportamento semelhante foi registrado por Eberhard 2000a,b estudando a aranha *Leucauge argyra* parasitada por *H. argyraphaga* e *Allocyclosa bifurca* parasitada por *Polysphincta gutfreundi* (Eberhard 2010).

A existência desta substância (ou substâncias) é evidenciada neste experimento, pois quando removemos a larva, que seria a fonte da substância, a aranha retorna a construção da teia normal após alguns dias, quando cessa o efeito da substância. Eberhard (2001) também observou que quando removia a larva de terceiro ínstar de *H. argyraphaga*, a aranha *L. argyra* retornava a construção da teia normal com o passar dos dias, corroborando com a hipótese da existência de neuromoduladores.

Já se sabe que a secreção de neuromoduladores por larvas de várias espécies de parasitoides são capazes de alterar o comportamento de alguns hospedeiros (Beckage 1997); contudo nada se conhece sobre as características químicas destes neuromodulares secretados pelas larvas do grupo de gêneros *Polysphincta*. Até o momento este trabalho constitui no segundo caso estudado que evidencia a existência de um possível neuromodulador que altera o comportamento de aranhas parasitadas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (bolsa de pesquisa para A.M. Penteado-Dias e bolsa de doutorado para J.F. Sobczak); ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Hymenoptera Parasitoides da Região Sudeste Brasileira (Hympar/Sudeste), pelo suporte financeiro; à Prefeitura Municipal de Jundiaí, por permitir as estadias de J.F. Sobczak na Base de Estudos de Ecologia e Educação Ambiental da Serra do Japi.

Referências bibliográficas

- Beckage, N. E. 1997. New insights: how parasites and pathogens alter the endocrine physiology and development of insect hosts. Pp. 3-36. In *Parasites and Pathogens, Effects on host hormones and behavior*. Chapman and Hall, New York, New York.
- Dubois J, Rollard C, Villemant C. & Gauld I. D 2002. The phylogenetic position of parasitoids of spiders within Pimplinae (Hymenoptera, Ichneumonidae). In: Samu F, Szinetár CSs (eds) *Proceedings of the 20th European Colloquium of Arachnology*. Plant Protection Institute and Berzsenyi College, Budapest, pp 27–35.
- Eberhard, W. G. 2000a. The natural history and behavior of *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera: Ichneumonidae) a parasitoid of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae). *Journal of Hymenoptera Research* 9: 220-240.
- Eberhard, W.G. 2000b. Spider manipulation by a wasp larva. *Nature* 406:255-256.
- Eberhard, W. G. 2001. Under the influence: webs and building behavior of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae) when parasitized by *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Journal of Arachnology* 29: 354-366.

- Fincke, O. M, Higgins, L. & Rojas, E. 1990. Parasitism of *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae) by an ichneumonid (Hymenoptera, Polysphinctini) in Panama. *Journal of Arachnology* 18:321–329.
- Fritz, R. S. 1982. Selection for host behavior modification by insect parasitoids. *Evolution* 36: 283-288.
- Gauld, I. D. 2000. The re-definition of pimpline genus *Hymenoepimecis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) with a description of a plesiomorphic new Costa Rican species. *Journal of Hymenoptera Research* 9: 213–219.
- Gauld I. D. & Dubois J. 2006. Phylogeny of the *Polysphincta* group of genera (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae): a taxonomic revision of spider ectoparasitoids. *Systematic and Entomol.* 31:529–564.
- Godfray H. C. J 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton, NJ. 473pp.
- Gonzaga M. O. & Sobczak J. F. 2007. Parasitoid-induced mortality of *Araneus omnicolor* (Araneae, Araneidae) by *Hymenoepimecis* sp. (Hymenoptera, Ichneumonidae) in southeastern Brazil. *Naturwissenschaften* 94:223-227.

Gonzaga M. O, Sobczak J. F, Penteado-Dias A. M, Eberhard W. G (2010) Modification of *Nephila clavipes* (Araneae: Nephilidae) webs induced by the parasitoids *Hymenoepimecis bicolor* and *H. robertsae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Ethology Ecology and Evolution* 22: 151-165.

Groaman A. H., Janssen A, De Brito E. F, Cordeiro E.G, Colares F, Fonseca J. O, Lima E. R, Pallini A, & Sabelis W. 2008. Parasitoid increases survival of its pupae by inducing hosts to fight predators. *PloS One* 3(6).

Korenko S, Pekár S. 2011. A parasitoid wasp induces overwintering behavior in its spider host. *PloS One* 6 (9).

Matsumoto R. 2009. “Veils” Against predators: Modified web structure of a host spider induced by an Ichneumonid parasitoid, *Brachyzapus nikoensis* (Uchida) (Hymenoptera). *Journal of insect Behavior* 22: 39-48.

McLachlan A. 1999. Parasites promote mating success: the case of a midge and a mite. *Animal Behaviour* 57: 1199-1205.

Robinson MH, & Robinson BC (1973) The stabilimenta of *Nephila clavipes* and the origins of stabilimentum-building in Araneids. *Psyche* 80, 277-288.

Sherman P. M. 1994. The orb-web: An energetic and behavioural estimator of a spider's dynamic foraging and reproductive strategies. *Animal Behaviour*. Vol. 48, no. 1, pp. 19-34.

Sobczak J. F, Loffredo A. P. S, Pentead-Dias A. M, Gonzaga M. O (2009) Two new species of *Hymenoepimecis* (Hymenoptera: Ichneumonidae, Pimplinae) with notes on their spider hosts and behaviour manipulation. *Journal of Natural History* 43: 2691-2699.

Sobczak J. F, Loffredo A. P. S, Pentead-Dias A. M (2012a) Parasitism on *Araneus venatrix* (Koch, 1838) (Araneae: Araneidae) by *Hymenoepimecis silvanae* Loffredo & Pentead-Dias, 2009 (Ichneumonidae, Pimplinae) with description of male of the wasp. *Brazilian Journal of Biology* 72: 221-223.

Sobczak J. F, Loffredo A. P. S, Pentead-Dias A. M (2012b) *Hymenoepimecis neotropica* (Brues & Richardson) (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) parasitoid of *Araneus omnicolor* (Keyserling) (Araneae, Araneidae) first host record and new occurrence to Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*. 56: 390-392.

Vinson S. B. 1975. Biochemical coevolution between parasitoids and their hosts, p. 14-18. In P. W. Price (ed.), *Evolutionary strategies of Parasitic Insects and Mites*. Plenum Press, N. Y.

Weng J. L. & Barrantes, G. 2007 Natural history and larval behavior of the parasitoid *Zatypota petronae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). 16:326-335.

Wickler W. 1976. Evolution-oriented ethology, kin selection, and altruistic parasites. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 42:200-214.

Capítulo IV

Description of the immature stages of
***Hymenoepimecis bicolor* (Brullé 1846)**
(Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae),
parasitoid of *Nephila clavipes* (Linnaeus 1767)
(Araneae, Nephilidae)

Abstract

The larva of *Hymenoepimecis bicolor* (Brulle 1846) (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) has different morphological and behavioral characteristics in each of its instars. The egg remains attached to the host by a gelatinous substance for three days. After this period the first instar larva breaks the anterior part of the egg and three thoracic segments emerge. Seven dorsal segments remain inserted into the chorion. After five days the larva switches to the second instar, already with all segments outside the chorion, and remains attached to the host body by the deposition of the ecdysis, forming a structure known as “saddle”. At this stage it is possible to observe two pairs of protuberances in the 8-9 segments, whose function has not yet been determined. In the course of five days the larva undergo another ecdysis and reach the third and last instar, characterized by the presence of dorsal tubercles covered by hooks and by the presence of lateral protuberances alongside the body. The larva kills and consumes the spider after the construction of the modified web and then it discards the host remains. Shortly thereafter the larva builds the cocoon, secreting the silk produced by salivary glands, and remains attached to the modified web of the host. The pupa remains in the web for 12 days for females and 11 days for males.

Keywords: behavior, immature stages, *Polysphincta* genus-group, saddle.

Introduction

The wasps of the *Polysphincta* genus-group (= Polysphinctini *sensu* Townes 1969) are known for parasitizing adult and subadult spiders of several families (Nielsen

1923, Gauld and Dubois 2006). They are classified as koinobiont wasps and their hosts remain active for a long period, being slowly consumed over the larval development. The larva remains attached to the host body through a structure called saddle. This saddle has been described by Nielsen (1923) as the remains of larval ecdysis and coagulated, haemolymph which allows the attachment of the larva on the host body.

Within the *Polysphincta* genus-group, the genus *Hymenoepimecis* (nowadays comprising 14 described species) is known for parasitize orbicular web-builder spiders from Neotropical Region (Fincke et al.1990, Eberhard 2000a, Gauld 2000, Gauld and Dubois 2006, Gonzaga and Sobczak 2007, Sobczak et al. 2009, Gonzaga et al. 2010, Sobczak et al. 2012). In some well-documented interactions for this genus (Fincke et al. 1990, Eberhard 2000a, b, 2001, Gonzaga and Sobczak 2007, Sobczak et al. 2009 and Gonzaga et al. 2010), the third instar larva was described as capable of inducing the host to build a modified web, which is possibly more resistant to abiotic factors, providing an additional protection during pupation (Eberhard 2000b, Gonzaga et al. 2010).

Despite recent advances in the research of web building behavior by the hosts and other aspects of the biology of interactions between spider and wasps, only one study has been conducted about the immature stages of *Hymenoepimecis* larvae. Eberhard (2000a) has documented the three larval instars of *H. argyraphaga* larvae, describing the anatomical and behavioral characteristics during each development phase.

In this study we describe the different larval instars of *H. bicolor* and the behavior of cocoon building and disposal of host remains, contributing to the knowledge on the biology of the immature stages of parasitoids belonging to the *Polysphincta* genus-group.

Material and Methods

This research was conducted in Serra do Japi Biological Reserve (Rebio), located in Jundiaí, São Paulo, Brazil (23°15'S, 46°57'W). Adult and sub-adult females of *N. clavipes* carrying eggs or larvae of *H. bicolor* were found and collected along the edges of the forest in an area known as DAE and on the roads near the research station of Rebio, during the months of January and May of 2011 and 2012.

The parasitized spiders were kept in plastic recipients sealed with tulle fabric in the laboratory, receiving water and specimens of *Drosophila melanogaster* daily. When the larvae reached the appropriated instars, they were anesthetized and killed using ether. Then the specimens were placed in fixative solution (4% paraformaldehyde) and kept in *ependorf* tubes in the refrigerator for 24 hours. These samples were examined and photographed in an scanning electron microscope under environmental pressure (ESEM). The adult wasp was dissected 72 hours after leaving the cocoon for observations of the venom apparatus and aturation of the eggs.

The behavior observations of the cocoon building were conducted using a Panasonic HDD digital camera, allowing posterior analysis with Sony Vegas 4.0 software.

The larvae and their host spiders were deposited in the collection of Universidade Federal de São Carlos (DCBU, A.M. Pentead-Dias curator), São Carlos, São Paulo, Brazil.

Results

Three *H. bicolor* larval stages were identified based on the remains of the ecdysis, size, period of development, morphological and behavioral characteristics of the larvae.

Egg (Figs 1 A-E)

The egg emerges from the base of the wasp abdomen along with a semi-transparent gelatinous substance, which after 24 hours of oviposition acquires a grayish color. Most of the eggs found in the body of the hosts were in the middle, side and distal part of the spider's abdomen (Fig. 1A arrow). Eggs were never attached to the anterior region of the abdomen.

The eggs deposited by *H. bicolor* females are anhydropic kind, full of yolk and surrounded by chorion, and develop through the wasp life. In one dissected female of *H. bicolor*, it was possible to observe a developed egg (Fig. 1B, C), as well as several ovarioles (Fig. 1C). Morphologically, the egg is hymenopteriform with a milky white color, cylindrical, with the front portion wider than the rear, and the rear portion has an extension (Fig. 1D) (n = 30). Three days after the oviposition, the egg becomes more elongated and it is possible to observe the formation of the embryo and a yellowish semitransparent serous membrane coating the egg (Fig. 1E). The average length of newly produced eggs is about 1.42 mm (n = 5).

First instar (Figs 2 A-D)

It was not possible to observe if the first instar larva punctures the cuticle of the spider and leaves the haemolymph flowing to form the saddle as seen by Eberhard (2000) in *H. argyraphaga* larvae.

The first instar larva hatches rupturing the anterior part of the egg after three days of the oviposition, but it keeps the posterior region of the body within the chorion (Fig. 2A, D). Minutes after leaving the egg, the larva, with the aid of its mandibles, begins to suck host's haemolymph by making small holes on its cuticle. These holes are made in a position located near the head of the larva, in a 45 ° angle on the host's abdomen. At this stage the larva only consumes haemolymph and it has not been observed ingesting body parts of the spider.

The first instar larva presents a yellowish color (Fig. 2A), with an exposed portion of the body with the three thoracic segments (Fig. 2C) and seven abdominal segments immersed in the chorion at the posterior part of the body (Fig. 2D). The abdominal segments immersed in the chorion allow the larvae to better fasten on the host body. There is a pair of spiracles not well developed at the sides of each segment and absence of bristles on all segments. The head presents two antennal papillae and absence of the sclerotized structures and antennal sockets (Fig. 2B). This first instar larvae remained during five days (n= 4).

Second instar (Fig. 3A-D)

It is possible to recognize all the thirteen body segments of the larva in the second instar (Fig. 3A). We observed the presence of its remains still on the body of the larva. They are stored on the back of the larva forming a brown saddle (Nielsen 1923), whose function is attaching the larva to the spider's body (Fig. 3A, B).

The second instar larva differs from the first due to the presence of the saddle and also because all the segments are located outside the chorion. On the ventral part of the larva, at segments 8 and 9, it is possible to see two pairs of small extensions, which

Nielsen (1923) called taps (Fig. 3B arrow). The body surface of the larva does not have bristles (Fig. 3C). Bristles are present only on the anterior region of the head (Fig. 3D). The time of the larva development at this stage is approximately five days (n= 5). All the larvae observed at this stage presented a yellow color with some white granules (possibly uric acid) under the cuticle and blackish areas at their heads, possibly more sclerotized than these areas in the first instar larvae.

At this stage the larva consumption of haemolymph increases, and it is evidenced by the higher number of holes made in the cuticle of the spider. Furthermore, the larva scratches the surface of the cuticle of the spider host eliminating all the bristles near to the orifices. After five days it reaches the end of the second instar and then it performs another ecdysis, reaching the third instar (Fig.4).

Third instar (Fig. 4A-K)

By achieving the third and final instar, the larva presents a body size three times larger than the first one and it takes more than half of the available space on the spider's abdomen (Fig. 4A). Besides increasing the consumption of haemolymph, there is an increased extension in host injuries (necrotic area at the end of the abdomen Fig. 4A - arrow) and also the increase of the size of the haemolymph suction cavity (Fig. 4B). Two days before killing the host, it is possible to see, at the dorsal segments 3-8, still beneath the larval cuticle, the presence of bright and swollen spots that later will originate the dorsal tubercles (Fig. 4C). In the day of spider's death, these tubers emerge from the cuticle and form the dorsal tubercles on segments 3-8, which were absent in the previous instars (Fig. 4D).

Each tuber has several small hooks on its surface (Figs. 4 E, F), which are responsible for the attachment of the larvae to the center of the modified web (Fig. 4D). The third instar larva is capable of retracting each tuber inside its body independently. In each segment presenting a tuber, there is a lateral protuberance with no hooks and with only a few widely spaced bristle (Fig. 4H).

At the posterior portion of the larva body, it is possible to observe the saddle with the two ecdysis remains from the previous instars (Fig. 4J arrow 1 and 2), together with the chorion and the projection of the taps (Fig. 4J red arrow). The larva has a yellowish color (Fig. 4A) and several white granules of uric acid under the cuticle. It has a sclerotized head with dark areas and protrusions (Fig. 4K). The head of the third-instar larva also has two well developed antennal papillae inserted into the antennal socket (Fig. 4K).

From the oviposition until the end of the second instar of larva, the spider builds webs with normal standard architecture. When the larva reaches the third instar, however, the spider builds a modified web with a significant decrease in the number of radii and adhesive spirals (see Gonzaga et al. 2010). After building this web the spider is killed by the larva, which remains attached to the hub of the web by the hooks of the tubers (Fig. 4D, E, F). After killing the host, the parasitoid larva consumes the spider's abdomen first and then immediately sucks, perhaps by capillarity (Eberhard 2000), the haemolymph present in all segments of the legs. The development time at this stage is two days.

Elimination of the host spider's body remains

After consuming the tissues and haemolymph of the spider host, the larva remains attached to the modified web with by the 5th, 6th, 7th and 8th dorsal tubercles,

and then it needs to eliminate the host spider's body remains that are still attached to their bodies by the saddle. We identify two possible strategies employed by the larvae of *H. bicolor* to eliminate these remains: (A) the larva holds the sternum of the spider and then pulls it against its body, dropping the spider by repeated sudden movements. Then the larva touches its head between segments 10 and 11 of its body, pushing the saddle at the opposite direction, until drop the saddle and spider's remains; and (B) the larva, attached to modified web, put itself at a position forming an angle of 90° relative to the spider's body. Then the larva constricts the final segments of its body, bringing the spider's remains to a position closer to its body. Holding tightly and pushing these remains down, the larva is able to eliminate them. The last segment of the larva's body is contracted with continuous movements. The two pairs of segments "taps", which are also present in other *Polysphincta* larvae, could be seen in *H. bicolor* larvae, but they are not involved in the elimination of the saddle.

Cocoon construction

Shortly after the releasing of the host's remains the parasitoid larva stays attached to the modified web by the dorsal tubercles (Fig. 5A) for about 2 hours. After this period, it begins the construction of the cocoon. We observed that primarily there is the deposition of untied strings and then the larva begins to build the layers. According to the behavior of the larva and cocoon shape, we divided each phase of the construction in three steps described below:

Step 1: It is the beginning of the cocoon construction. At this phase the larva adds silk threads on the posterior segments, between tubercles 4-8, but the first four tubers

remains free of silk (Fig. 5B, C). This enables the larva to move the front portion of the body to build the cocoon. The silk threads are added forming a tangle of strands between the tubers 4-8, allowing a better support to the larva attach itself to the host web. The larva continues to deposit silk next to its body, forming a silk wall (Fig. 5B). There are a few moments of resting (15-20 seconds intervals), in which the larva remains motionless in the web, in a 180° angle.

Step 2: The larva starts the threads deposition onto the end of its body and the tangle of threads that are placed on the tubers 4-8 (Fig. 5C). Initially it fixes a thread in this tangle and then stretches it away. Then it drops the thread forming a kind of pocket of loose threads at the posterior segments of its body (Fig. 5C). At the next step, the larva adds more threads, gluing them in this thread bag and pulling them above. About 35 minutes after the beginning of the construction it is already possible to observe the cocoon with its conical shape, containing the larva (Fig. 5D,) (see supplementary file 1: Movie). The larva slowly adds more threads and, while adding, pushes the wall of the cocoon with the head, shaping it.

Step 3: The larva keeps adding silk threads at the cocoon walls and doing 360° spins inside. It keeps adding threads both at the medium posterior part and the upper middle of the cocoon. One hour after it started the construction it is possible to observe that the upper part of the cocoon had a greater intake of silk. To counteract this irregular deposition, the larva, after about one hour and ten minutes, changes its position within the cocoon, getting upside down (Fig. 5E, arrow) (see supplementary file 1: Movie). This turning of the body is possible by using by the dorsal tubercles, which are retracted and extended continuously, allowing the larva movements inside the cocoon. Therefore, the larva adds threads at the posterior half of the cocoon and also builds its tip, which will be the site for the meconium deposition. After 41 minutes at the posterior part of

the cocoon, the larva inverts the body again, going upwards this time, and keeps weaving at the top. This behavior of body reversing occurs again 10 times, at intervals of 46 to 60 minutes. By doing this the larva allows a symmetrical construction between the top and bottom of the cocoon. It is the first time that this behavior is described for the *Polysphincta* group.

The cocoon construction is completed in about 12 hours ($n = 5$). On rainy days, however, the larvae can take up to 72 hours to complete this process. The cocoon, at its conclusion, gets a light yellow color (Fig. 5F) and in two days, it turns to a dark orange color (Fig. 5J). About 48 hours after the conclusion of the cocoon, there are several layers of threads arranged irregularly (Fig. 5G) and it is possible to observe that some wires were bonded by the larva at the time of cocoon construction (Fig. 5H).

upa

Three days ($n = 4$) after the construction of the cocoon, the pupal stage begins (Fig. 5I) and the meconium trapped in the posterior portion of the cocoon is released. The pupa remains the whole period within the cocoon with the head turned to the top

The time for development of the pupae was about 11-12 days in field conditions. Most females emerged after 12 days, while males emerged in 11 days.

The adult wasp emerges by cutting the silk threads of the apical portion of the cocoon (Fig. 5J). The adult wasp stays for about three hours in the modified web ($n = 2$), stretching its wings before flying. In these two observations the wasp only emerged from the cocoon when the temperature was above 25° C.

Discussion

At the time of oviposition, the wasp carefully chooses the location to deposit the egg on the host's body, rubbing the ovipositor several times on host's abdomen (Fincke et al. 1990, Eberhard 2000a, Gonzaga and Sobczak 2007). This behavior is probably important to determine whether the egg will remain attached to the abdomen of the host or will be removed. The function of the substance expelled along with the egg is to promote the attachment, probably reducing the success of the spider or other wasps in removing it (for more details on the occurrence of infanticide in *Polysphincta*-group, see Gonzaga and Sobczak 2007, Takasuka and Matsumoto 2011).

The strategy of maintaining part of its body inside the chorion is important to allow the feeding of larvae and, at the same time, it ensures efficient anchorage to the host's body. Several ichneumonid species from the *Polysphincta* genus-group use the chorion to get attached to the host: *Acrodactyla madida* Nielsen (1923), *H. argyraphaga* (Eberhard 2000a), *Zatyota petronae* (Weng and Barrantes 2007), *Brachyzapus nikkoensis*, (Matsumoto 2009), *Acrotaphus chedelae* (Gonzaga and Sobczak 2011) *H. japi*, *H. sooretama*, (Sobczak et al. 2009), *H. silvanae* (Sobczak et al. 2012) and *H. veranii* (Sobczak unpublished).

The necrotic tissue observed in spiders being consumed is probably due to the action of digestive enzymes that are being injected since the first instar. It is possible, however, that the larva injects a large amount of these enzymes at the final instar to improve tissue absorption.

Eberhard (2000a) suggests that the saddle, besides being formed by ecdysis residues, may contain remains of clotted haemolymph. In the *H. bicolor* saddle, however, we observed only remains of the ecdysis. The presence of this fixing structure

has been observed in other larvae of *Hymenoepimecis* (Eberhard 2000, Sobczak et al. 2009), as well as in *Zatypota* larvae (Weng and Barrantes 2007) and *Acrotaphus* (Gonzaga and Sobczak 2011). Eberhard (2000a) suggests that *H. argyraphaga* larva changes, forming the rupture line of ecdysis in the dorsal midline of its body, breaking in the new skin on the sides of the body instead of the back portion as in the pupa stage.

We observed the presence of highly developed “taps” in segments (Fig. 4I, J), but no longer in contact with the saddle, reinforcing the hypothesis that this structure is not involved in the formation of the saddle, as proposed by Nielsen (1923) and Eberhard (2000a). The exact function of these structures is not well understood. Eberhard (2000a) and Nielsen (1923) suggest that these structures are inserted into the saddle and that it should help the larva to get attached to it.

In addition to the lateral protuberances and the dorsal tubercles, there is a row of bristles on each larva segment, probably with sensory function (Fig. 4G). This indicates that the larva has two ecdysis to reach the third instar and that the “taps” are not inserted into the saddle, but they are covered by it (Fig. 4J red arrow). The function of these protrusions has not been set, but it occurs only in the last instar, so it may be important to larva movements inside the cocoon.

The behavior of the host's remains elimination is very similar to that described for larvae *Zatypota petronae* (Weng and Barrantes 2007). Considering the existence of two strategies, we conclude that the position in which the egg is laid at the time of oviposition is essential for the selection of the better way to eliminate the remains.

During the last larval stage, many Hymenoptera are able to build cocoons (Quicke and Shaw 2004) whose function is to protect the pupae. This protection is essential, since they are quite vulnerable to be attacked by other parasitoids and microorganisms (Quicke 1997). Besides, it prevents the dehydration of the pupa

(Tagawa 1996). Larvae have modified salivary glands, an opened structure over the lip, responsible for the formation and application of the silk used in the construction of the cocoon (Hanson and Gauld 2006). According to Quicke (1997), cocoons constructed by parasitoid wasps can be formed of distinct layers of silk threads or untied threads. During the cocoon making, the larva initially settles on the modified web and begins the construction by adding threads around its body and wrapping it up completely. Nielsen (1923) suggested that the change in color is a result of the substances secreted by the larva before turning into pupa and not due to oxidation. The consistency of the cocoon also changes a few hours after its completion. Following Eberhard (2000a) we found that, when the cocoon is disturbed, the pupa contracts rapidly the body in dorsoventral direction.

The position of the pupa probably serves to facilitate the release of meconium, helping the last change (Eberhard 2000a). The mortality of pupae inside the cocoons was not recorded, but Eberhard (2000a) mentions that the *H. argyraphaga* cocoons suspended in *L. argyra* webs are attacked mainly by one hyperparasitoid of the *Conura* (Chalcididae) genus.

Acknowledgements

We thank Dr. João Vasconcellos-Neto for the equipment used for filming and taking photographs of the specimens and Dra. Luciana Fernandes for the images of MEV. We were supported financially by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Hymenoptera Parasitoides da Região Sudeste Brasileira (HYMPAR/Sudeste – CNPq/FAPESP/CAPES), CNPq (research grants to J.F.Sobczak, A.M. Penteado-Dias). We also thank Prefeitura Municipal de Jundiaí, the staff of Base de Estudos de Ecologia e Educação Ambiental da Serra do Japi.

References

Eberhard WG (2000a) The natural history and behavior of *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera: Ichneumonidae) a parasitoid of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae). *Journal of Hymenoptera Research* 9: 220-240.

Eberhard WG (2000b) Spider manipulation by a wasp larva. *Nature* 406: 255-256.

Eberhard WG (2001) Under the influence: webs and building behavior of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae) when parasitized by *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Journal of Arachnology* 29: 354-366.

Fincke OM, Higgins L, Rojas E (1990) Parasitism of *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae) by an ichneumonid (Hymenoptera, Polysphinctini) in Panama. *Journal of Arachnology* 18: 321–329.

Hanson PE, Gauld ID (2006) La Biología de los Himenópteros. In: Hanson PE, Gauld ID (Eds.) *Hymenoptera de La Región Neotropical*. The American Entomological Institute 1-994.

Tagawa J (1996) Function of the cocoon of the parasitoid wasp, *Cotesia glomerata* L. (Hymenoptera: Braconidae): Protection against desiccation. *Applied Entomological Zoology* 31: 99-103.

Gauld ID (2000) The re-definition of pimpline genus *Hymenoepimecis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) with a description of a plesiomorphic new Costa Rican species. *Journal of Hymenoptera Research* 9: 213–219.

Gauld ID, Dubois J (2006) Phylogeny of the *Polysphincta* group of genera (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae): a taxonomic revision of spider ectoparasitoids. *Systematic Entomology* 31: 529–564.

Gonzaga MO, Sobczak JF (2007) Parasitoid-induced mortality of *Araneus omnicolor* (Araneae, Araneidae) by *Hymenoepimecis* sp. (Hymenoptera, Ichneumonidae) in southeastern Brazil. *Naturwissenschaften* 94: 223-227.

Gonzaga MO, Sobczak JF, Pentead-Dias AM, Eberhard WG (2010) Modification of *Nephila clavipes* (Araneae: Nephilidae) webs induced by the parasitoids *Hymenoepimecis bicolor* and *H. robertsae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Ethology Ecology and Evolution* 22: 151-165.

Gonzaga MO, Sobczak JF (2011) Behavioral manipulation of the orb-weaver spider *Argiope argentata* (Araneae: Araneidae) by *Acrotaphus chedelae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Entomological Science* 14: 220-223.ens_

Matsumoto R (2009) “Veils” against predators: modified web structure of a host spider induced by an ichneumonid parasitoid, *Brachyzapus nikkoensis* (Uchida) (Hymenoptera). *Journal of Insect Behavior* 22: 39-48.

Nielsen E (1923) Contributions to the life history of the Pimplinae spider parasites (*Polysphincta*, *Zaglyptus*, *Tromatobia*). *Entomologiske Meddelelser* 14: 137-205.

Sobczak JF, Loffredo APS, Pentead-Dias AM, Gonzaga MO (2009) Two new species of *Hymenoepimecis* (Hymenoptera: Ichneumonidae, Pimplinae) with notes on their spider hosts and behaviour manipulation. *Journal of Natural History* 43: 2691–2699.

Sobczak JF, Loffredo APS, Pentead-Dias AM (2012) Parasitism on *Araneus venatrix* (Koch, 1838) (Araneae: Araneidae) by *Hymenoepimecis silvanae* Loffredo & Pentead-Dias, 2009 (Ichneumonidae, Pimplinae) with description of male of the wasp. *Brazilian Journal of Biology* 72: 221-223.

Takasuka K, Matsumoto R (2011) Infanticide by a solitary koinobiont ichneumonid ectoparasitoid of spiders. *Naturwissenschaften* 98: 529-536.

Townes H (1969) The genera of Ichneumonidae, part 1. *Memoirs of the American Entomological Institute* 11: 1–300.

Quicke DLJ, Shaw MR (2004) Cocoon silk chemistry in parasitic wasps (Hymenoptera, Ichneumonoidea) and their hosts. *Biological Journal of the Linnean Society* 81: 161-170.

Quicke DLJ (1997) *Parasitic Wasps*, Chapman & Hall, London. 1- 470.

Weng JL, Barrantes G (2007) Natural history and larval behavior of the parasitoid *Zatypota petronae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) Journal of Hymenoptera Research 16: 326-335.

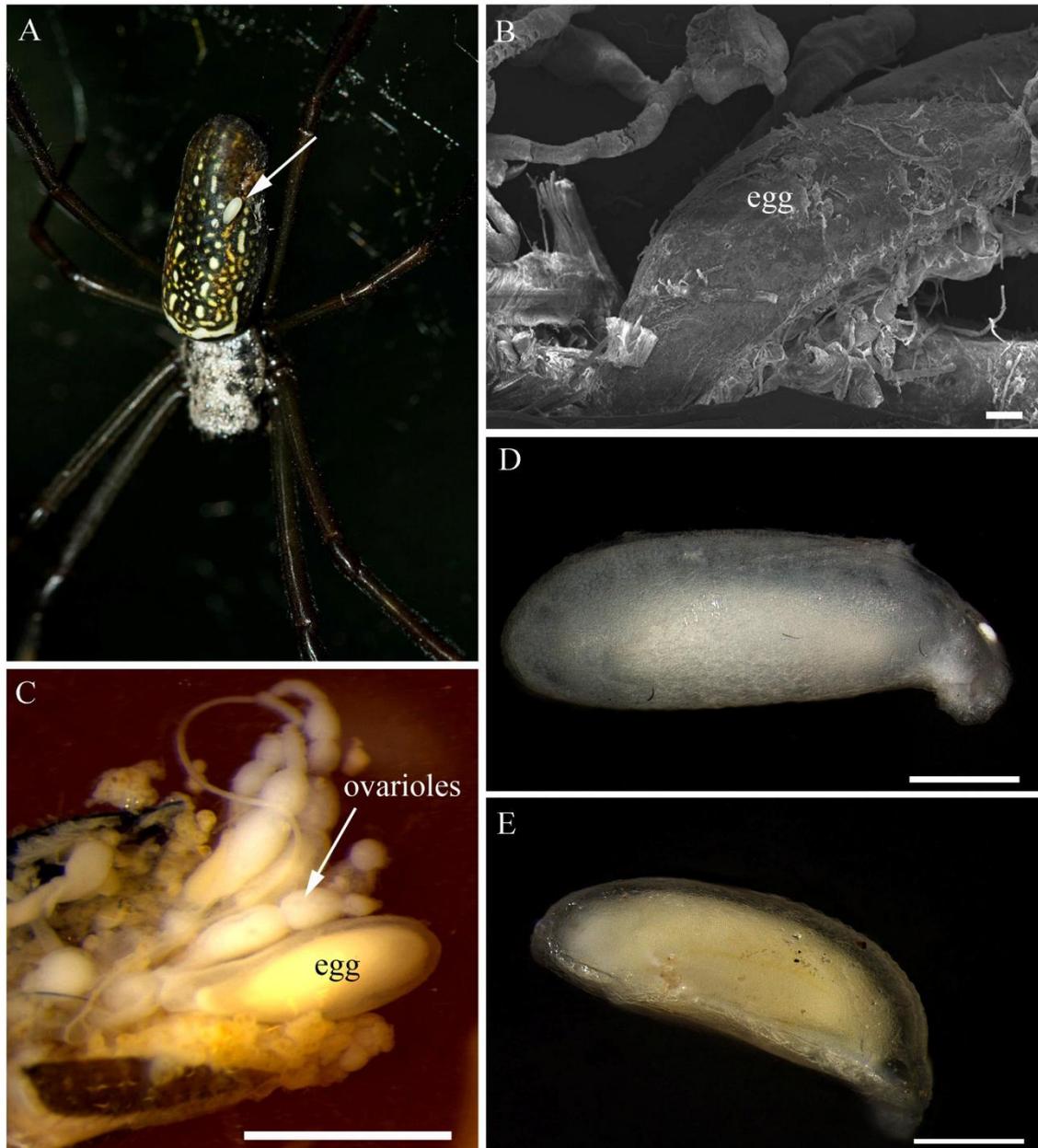


Figure 1: A) Fixed egg of *Hymenoepimecis bicolor* on the abdomen of the *Nephila clavipes* spider; B) Details of the egg still inside of the wasp; C) Dissected *Hymenoepimecis bicolor* female showing ovarioles and the developed eggs; D) Freshly laid egg; E) Egg three days after being laid. Scale bars: B = 100 μ m, L = 0.5 mm, D = 0.2 mm E = 0.2 mm.

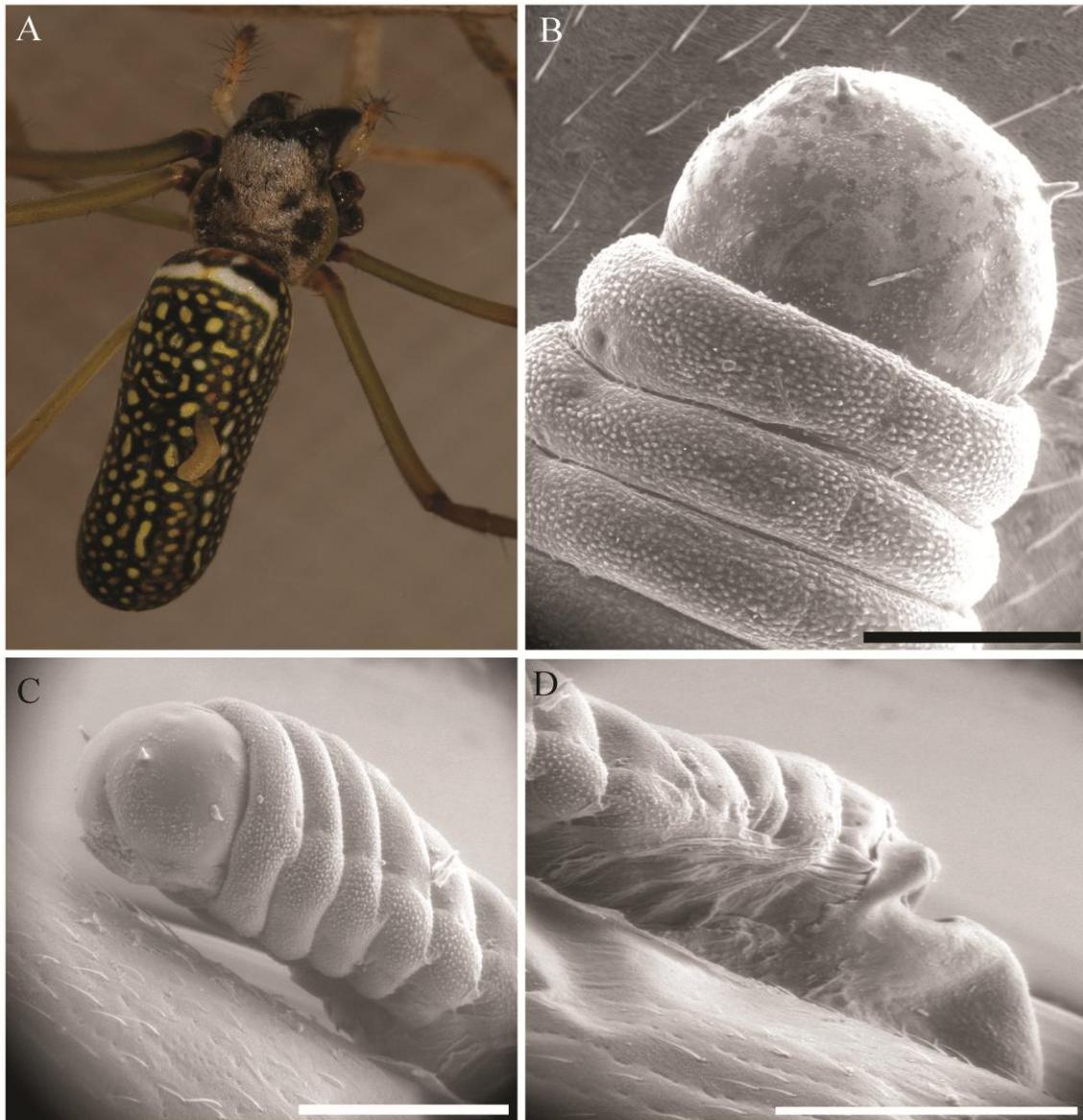


Figure 2: A) *Nephila clavipes*, female, with a first instar larva on it; B) Detail of the head of a second instar larva of *H. bicolor*; C) Free thoracic segments, D) The back of the larva still within the chorion. Scale bars: G = 200 μm , H = 400 μm , I = 400 μm .

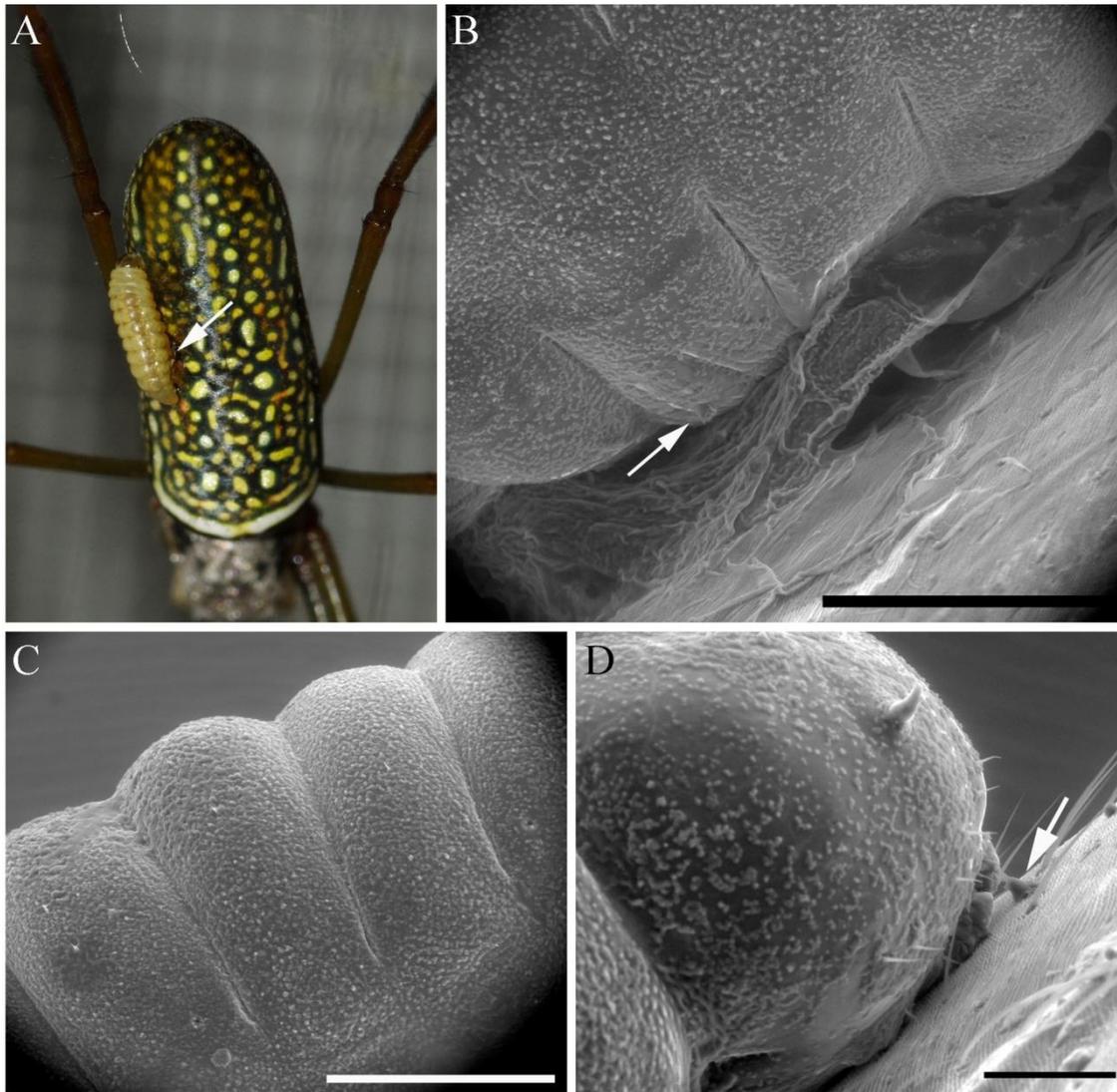


Figure 3: A) *Nephila clavipes* female, with a second instar larva of *H. bicolor*, the arrow shows the barely visible saddle; B) Detail of the saddle holding the larva to the body of the spider, the arrow points to the tap; C) Detail of the segments without no bristles; D) The head of a larva sucking haemolymph, the arrow shows the clotted haemolymph. Scale bars: B, C = 300 μ m, D =100 μ m.

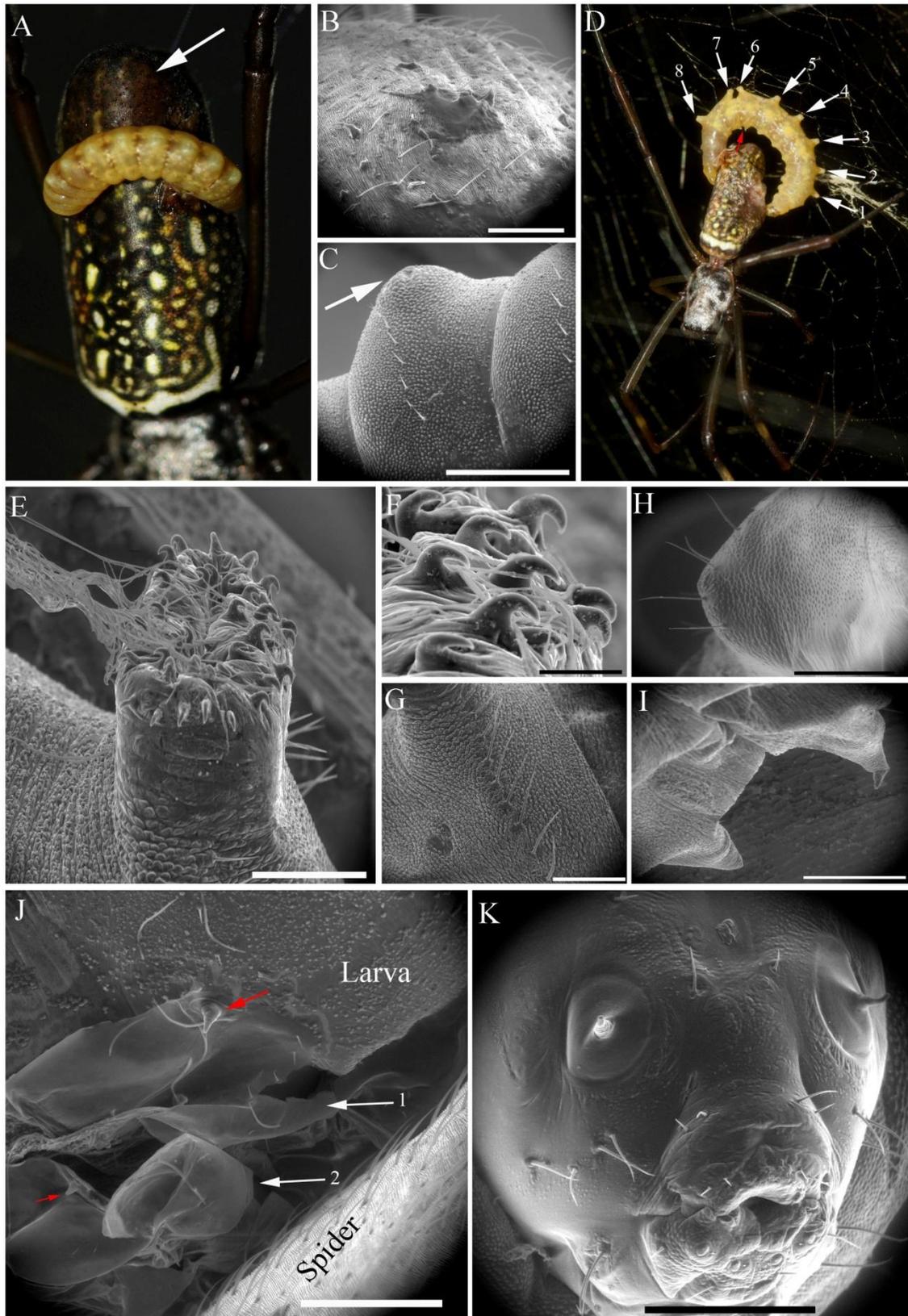


Figure 4: A) *N. clavipes* female with a third-instar larva, the arrow shows the necrotic area; B) Detail of the clotted haemolymph; C) Segment of the larva with the tubercle ready to break through the cuticle (arrow); D) Larva with eight dorsal tubercles (white arrows) and free "taps" (red arrow); E) Dorsal tubercle covered by hooks; F) Detail of the hooks with web between them; G) Lateral protuberance; H) Bristles surrounding the

segments; I) Two "taps"; J) Detail of the saddle showing that the taps are not in the saddle (red arrows), and the remains of two ecdysis (white arrows 1, 2; K) Detail of the head of a third-instar larva. Scale bars: B, C, E, F = 200 μ m, G, H, I, J = 300 μ m, K = 50 μ m.

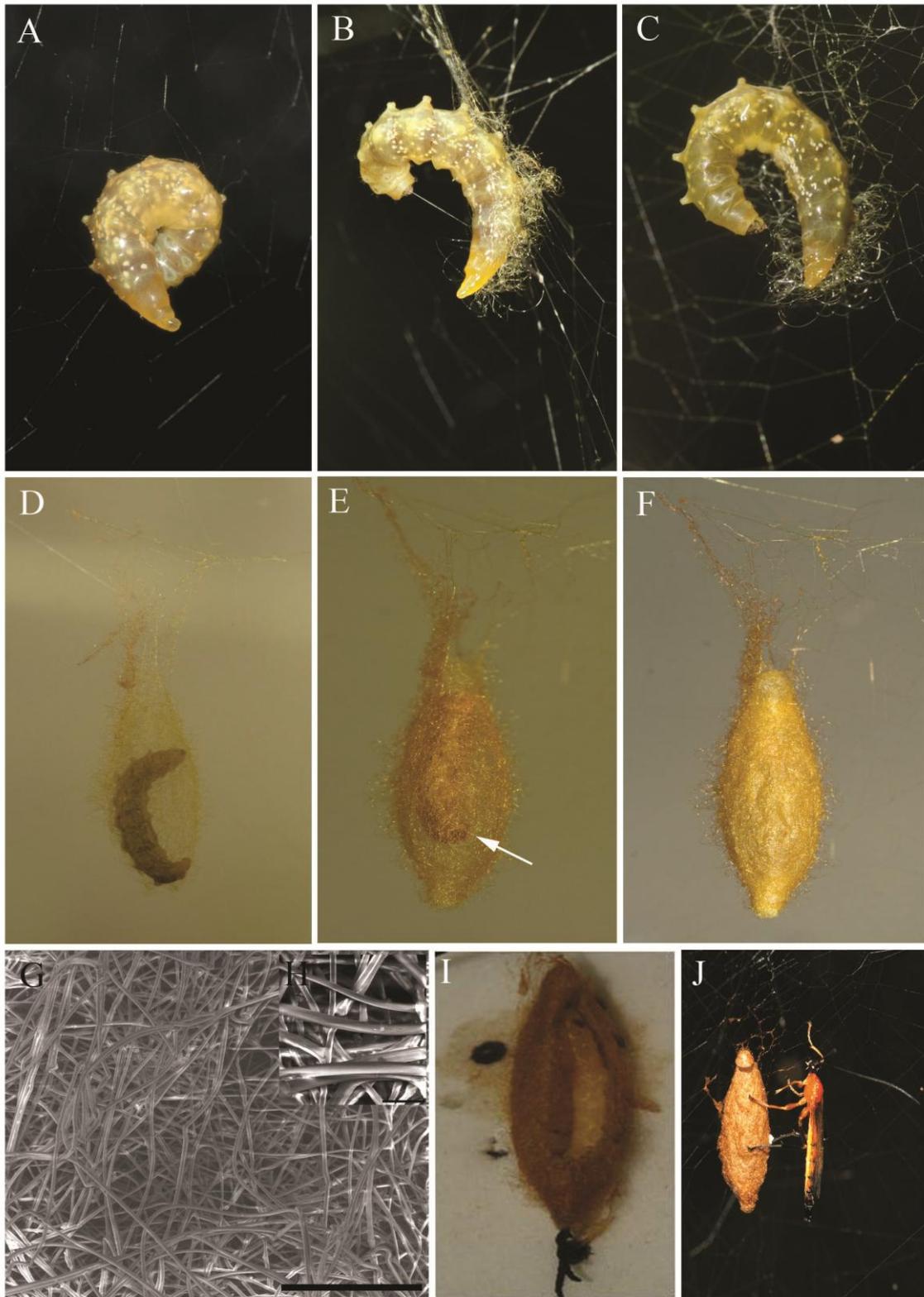


Figure 5: (A-J) *Hymenoepimecis bicolor*. A) Larva after discarding the host; B) Starting of the cocoon construction; C) Deposition of threads forming the bag; D) Larva inside the cocoon; E) Larva weaving the rear of the cocoon; F) Cocoon; G) Details of the arrangement of threads in the layers of the cocoon under SEM; H) Threads tied by the larva; I) Pupa; J) Adult wasp. Scale bars: G = 400 μ m, H = 50 μ m.

DISCUSSÃO GERAL

O comportamento de oviposição de *Hymenoepimecis bicolor* consiste em um breve sobrevoo ao redor da teia da aranha por um período variável de tempo. Esse sobrevoo deve estar relacionado ao reconhecimento do tamanho corpóreo do hospedeiro e da posição ocupada pelo hospedeiro na teia. Após esse período a vespa posiciona-se a uma distância de até 30 cm do centro da teia e lança um ataque certeiro na tentativa de imobilizar, no menor tempo possível, a aranha. Ao atingir a aranha, a vespa tenta imobilizá-la introduzindo o ovipositor na sua boca. O ovipositor funciona como um ferrão, sendo o responsável pela injeção de uma substância que paralisa a aranha em poucos segundos. Esse comportamento de imobilização rápida do hospedeiro aparentemente é muito importante para a sobrevivência da vespa. Desta forma, possuir uma substância que age rapidamente paralisando a aranha deve ser de extrema importância para o sucesso da oviposição. Esse comportamento já havia sido documentado por Gonzaga & Sobczak (2007), em *Hymenoepimecis veranii*. Nessa espécie, as vespas introduzem o ovipositor na boca de seu hospedeiro, a aranha *Araneus omnicolor*, paralisando-a rapidamente. O comportamento de introduzir o ferrão na boca do hospedeiro pode estar relacionado com o local de ação da substância paralisante. O ferrão dentro da boca da aranha atinge diretamente o gânglio subesofágico, paralisando seus movimentos. Algo semelhante foi observado em *Ampulex compressa*, (Fabricius 1781) Sphecidae que introduz o ferrão na cabeça da barata, acertando o gânglio e paralisando o hospedeiro (Libersat 2009).

Segundo Blackledge *et al.* (2003) a estrutura complexa de teias em três dimensões, presente em várias espécies de aranhas, está relacionada com a pressão de predação ocasionada por algumas espécies de vespas, entre as quais estão as vespas das

famílias Pompilidae e Sphecidae. Assim, as teias tridimensionais funcionariam como um obstáculo à aproximação das vespas e facilitariam a percepção de uma situação que envolve risco de predação, permitindo uma reação da aranha antes que seja efetivamente atacada. Contudo, em algumas espécies de aranhas, o componente tridimensional de teias orbiculares (fios de barreira ou de sustentação) pode ser usado pelos parasitoides durante as tentativas de ataque, como registrado por Gonzaga & Sobczak (2007) na interação entre *Araneus omnicolor* e *Hymenoepimecis veranii*. Neste caso o parasitoide usa a região dos fios de barreira para esperar a saída da aranha de seu abrigo. Já em algumas espécies do grupo Polysphinctini (gênero *Zatypota*), o parasitoide pode entrar e locomover-se normalmente pelos fios irregulares. É o que acontece com os parasitoides de *Anelosimus jabaquara* Levi 1956 e *Anelosimus nigrescens* Keyserling, 1884 Theridiidae (Sobczak *et al.*, dados não publicados).

Isso significa que uma estrutura de fios mais complexa não necessariamente representa uma barreira contra a aproximação de parasitoides. Na interação entre *N. clavipes* e *H. bicolor*, após a fase de reconhecimento, a vespa lança-se rapidamente para cima do hospedeiro. Mesmo sendo um ataque direto a um hospedeiro que constrói teia com uma barreira de fios, ou forma agregações com várias teias, a maioria dos ataques é bem sucedida. Este comportamento de ataque é muito similar ao descrito por Eberhard (2000) para a vespa *H. argyraphaga* parasitando a aranha *L. argyra*. Ele observou que a vespa permanece voando a uma distância de 10-30 cm da aranha por alguns segundos e em seguida dispara um ataque preciso sobre o corpo da mesma, paralisando-a em seguida e depois ovipondo em seu abdômen.

Nós observamos que, aparentemente, as fêmeas de *H. bicolor* decidem se fecundarão ou não o ovo antes de ovipor, existindo uma relação positiva entre o tamanho da aranha *N. clavipes* e o sexo da prole. Aranhas cujo tamanho do abdômen é

maior ($\geq 6,1$ mm) dão origem a fêmeas, e aranhas menores ($\leq 6,0$ mm) dão origem aos machos desta espécie. Além disso, observamos que há dimorfismo sexual, em que as vespas fêmeas são maiores que os machos. Em outro estudo envolvendo a aranha *N. clavipes*, Fincke *et al.* (1990) observaram que machos da vespa *H. robertsae* também possuíam o corpo menor do que as fêmeas, e o tamanho da vespa foi correlacionado com o tamanho dos hospedeiros.

A frequência de aranhas encontradas parasitadas foi baixa se comparada com outros estudos. Por exemplo, Eberhard 2000a observou que 66,4% das *L. argyra* estavam parasitadas com larvas de *H. argyraphaga* e Gonzaga & Sobczak (2007) observaram que 41,17% das aranhas *A. omnicolor* estavam parasitadas com larvas ou ovos de *H. veranii* na mesma área desse estudo. Gonzaga e Sobczak (2007) observaram também que a vespa *H. veranii* escolhe hospedeiros de tamanho intermediário com uma frequência maior que a esperada, de acordo com a abundância relativa de potenciais hospedeiros de diferentes tamanhos. Fincke *et al.* (1990) também observaram que *H. robertsae* prefere ovipor em aranhas de tamanho intermediário. Assim como nestes dois estudos, sugerimos que aranhas menores não apresentam a quantidade de biomassa requerida para o desenvolvimento da larva, ao passo que aranhas maiores apresentam um maior grau de dificuldade no momento da imobilização. Além disso, aranhas grandes poderiam remover ovo ou a larva do parasitoide com mais facilidade.

Devido à escassez de hospedeiros do tamanho preferido, o que geralmente ocorre no início e no final da estação reprodutiva (ver cap. II desta tese), as vespas podem ovipor em hospedeiros de tamanho sub-ótimo ou que já se encontrem parasitados, o que caracteriza os casos de duplo parasitismo.

A alteração do padrão de construção de teia observada em várias espécies de aranhas quando parasitadas por larvas de terceiro ínstar de vespas do grupo de gêneros *Polysphincta* pode ser um mecanismo empregado pelas larvas para garantir uma maior taxa de sobrevivência durante o período de pupa. Até o presente momento existem indícios de que esta alteração pode ser provocada por substâncias que a larva de terceiro ínstar injeta no corpo da aranha (Eberhard 2000a, Gonzaga *et al.* 2010), porém ainda não conhecemos as características químicas que compõem este veneno. Essa suposição baseia-se no fato de que, após a remoção da larva de terceiro ínstar do corpo das aranhas, há gradualmente um retorno ao padrão normal de construção de teias.

No experimento envolvendo a remoção da larva do parasitoide do abdômen do hospedeiro quando esta atingia o terceiro ínstar e induzia a aranha a construir uma teia modificada, constatamos que a aranha retorna a construção da teia normal. Eberhard (2001) também observou que quando removia a larva de terceiro ínstar de *H. argyraphaga*, a aranha *L. argyra* retornava a construção da teia normal com o passar dos dias, corroborando com a hipótese da existência de neuromoduladores.

Já se sabe que a secreção de neuromoduladores por larvas de várias espécies de parasitoides são capazes de alterar o comportamento de alguns hospedeiros (Beckage 1997); contudo nada se conhece sobre as características químicas destes neuromodulares secretados pelas larvas do grupo de gêneros *Polysphincta*. Até o momento este trabalho constitui no segundo caso estudado que evidencia a existência de um possível neuromodulador produzido e injetado pela larva do parasitoide que altera o comportamento de aranhas parasitadas.

A alteração do padrão da arquitetura da teia de *N. clavipes* pode ocorrer quando a aranha é induzida pela larva do parasitoide *H. bicolor* ou *H. robertsae* (Gonzaga *et al.*,

2010) ou quando está próxima do período de ecdise (Robinson & Robinson 1973, ver cap. II). Esta alteração no formato da teia proporciona uma estrutura mais resistente para a pupa do parasitoide, ou para a aranha durante o período de ecdise. A teia de ecdise aparentemente também é mais resistente que a teia normal, embora não tenhamos testado se permanecem intactas por mais tempo que teias normais quando expostas às condições ambientais sem reparos periódicos. Uma provável explicação para o sucesso das pupas em teias modificadas pode estar relacionada com a diminuição da parte orbicular da teia e ausência de espiras adesivas. Desta forma, evita-se que presas possam ser interceptadas e ficar aderidas na teia, o que em muitos casos poderia comprometer a estabilidade da teia modificada e interferir na sobrevivência da pupa.

Para verificar se a modificação na teia promove um incremento na probabilidade do casulo permanecer suspenso durante todo o período de desenvolvimento da pupa foi realizado um experimento colocando larvas de *H. bicolor* para construir casulos em teias normais construídas por *N. clavipes* não parasitadas e, em seguida comparado com casulos construídos em teias modificadas construídas por aranhas parasitadas. A grande maioria dos casulos construídos em teias normais, sem a devida estabilidade proporcionada pela teia modificada, não sobreviveu até o momento da emergência da vespa adulta. Em outro experimento realizado com *N. clavipes* no mesmo local, Gonzaga *et al.* (2010) demonstraram que as teias modificadas são realmente muito mais resistentes a fatores abióticos, como chuva e vento forte, que as teias normais construídas por aranhas não parasitadas.

Comprovamos nos nossos experimentos que, além de promover uma estrutura de ancoragem melhor para a larva do parasitoide construir seu casulo, a teia modificada é eficiente em evitar que injúrias possam danificar ou ocasionar a morte durante o estágio de pupa do parasitoide. As principais causas de morte das pupas/larvas nas teias

normais são a chuva e o vento, que danificam as teias e ocasionam a queda das pupas/larvas da teia. Fincke *et al.* (1990) observaram que fortes chuvas também danificam o casulo de *H. robertsae*, causando a morte da pupa.

O ovo da vespa *H. bicolor* permanece aderido por três dias ao abdômen da aranha *N. clavipes* através de uma substância de consistência gelatinosa. Após esse período a larva de primeiro ínstar rompe a parte anterior do ovo e os três segmentos torácicos emergem. Sete segmentos abdominais permanecem inseridos dentro do córion, garantindo assim uma melhor fixação ao corpo da aranha. A estratégia de manter parte do seu corpo dentro do córion é importante para permitir a alimentação da larva ao mesmo tempo que lhe assegura uma fixação eficiente ao corpo do hospedeiro.

Depois de cinco dias a larva passa para o segundo ínstar, e todos os 13 segmentos corporais da larva ficam expostos sobre o abdômen da aranha. Nesta fase permanece aderida ao corpo do hospedeiro pela deposição da ecdise numa estrutura chamada “sela”. Nesta fase é possível perceber dois pares de protuberâncias nos segmentos 8-9, cuja função ainda não foi completamente determinada. Com o decorrer de mais cinco dias a larva passa novamente por uma ecdise e atinge o terceiro e último ínstar, marcado pela presença de tubérculos dorsais cobertos por ganchos e pela presença de protuberâncias laterais ao longo do corpo da larva. Os tubérculos dorsais são as estruturas responsáveis por fixar a larva do parasitoide à teia modificada da aranha (Eberhard 2000a,b, 2001, Sobczak *et al.* 2009, Gonzaga *et al.* 2010). Essa larva mata e consome a aranha presa à teia modificada e então descarta os despojos da mesma com auxílio das mandíbulas. Logo em seguida constrói o casulo. A construção do casulo envolve uma série de comportamentos ritualizados, onde a larva vai adicionando fios de seda que são secretados pelas glândulas salivares e, com auxílio da cabeça, vai lentamente dando forma ao casulo. O tempo de construção do casulo pode variar

conforme as condições climáticas, mas em média é de 12 horas. Após a construção do casulo, a larva permanece imóvel dentro do mesmo e, em seguida, entra em período de pupa. A pupa permanece na teia modificada por 12 dias para fêmeas e 11 dias para machos, havendo uma pequena diferença no tempo de eclosão entre os sexos.

CONCLUSÕES

Neste trabalho nós descrevemos em detalhes o comportamento de ataque e oviposição da vespa *H. bicolor* parasitoide da aranha *N. clavipes*. Demonstramos que o comportamento de ataque ocorre em uma sequência de cinco eventos relacionados e, no momento da oviposição, a vespa pode optar, de acordo com o tamanho do hospedeiro, em ovipor ovos fertilizados ou ovos não fertilizados.

A frequência de aranhas parasitadas foi maior em indivíduos de tamanho intermediário, corroborando a hipótese de que aranhas menores não possuem biomassa suficiente para o desenvolvimento da larva e que aranhas grandes oferecem um risco de injúria muito alto no momento do ataque. Aparentemente existe um *trade-off* entre a disponibilidade de biomassa para a larva e o risco de predação durante a oviposição.

Há indícios de que a modificação da arquitetura da teia seria uma resposta à substância ou substâncias que a larva inocula no corpo da aranha.

Foi comprovado também que a teia modificada é de fundamental importância para a sobrevivência da pupa do parasitoide, evitando que os casulos caiam ao solo e sejam predados.

Os estágios imaturos de *H. bicolor* podem ser diferenciados e caracterizados por várias diferenças morfológicas entre os instares: heteromorfose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barnard CJ, Behnke JM 1990. Parasitism and host behavior. Taylor and Francis, London 332pp.

Beckage NE 1997. New insights: how parasites and pathogens alter the endocrine physiology and development of insect hosts. Pp. 3-36. In Parasites and Pathogens, Effects on host hormones and behavior. Chapman and Hall, New York, New York. 352pp.

Blackledge TA., Coddington JA. & Gillespie RG 2003. Are three-dimensional spider webs defensive adaptations? Ecological Letters. 6: 13-18.

Cram ER 1931. Developmental stages of some nematodes of the Spiruroidea parasitic in poultry and game birds. USDA Technical Bulletin No. 227, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, MD.

De Geer C 1771. Memoires pour servir a l'histoire des insectes, Stockholm, De l'Impr. de L.L. Grefing 863pp.

Dubois, J., Rollard, C., Villemant, C. & Gauld, ID 2002. The phylogenetic position of parasitoids of spiders within Pimplinae (Hymenoptera, Ichneumonidae). In: Samu F, Szinetár Cs (eds) Proceedings of the 20th European Colloquium of Arachnology. Plant Protection Institute and Berzsenyi College, Budapest, pp 27-35.

Eberhard WG 2000a. The natural history and behavior of *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera: Ichneumonidae) a parasitoid of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae). Journal of Hymenoptera Research 9: 220-240.

Eberhard WG 2000b. Spider manipulation by a wasp larva. Nature 406: 255-256

Eberhard WG 2001. Under the influence: webs and building behavior of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae) when parasitized by *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera, Ichneumonidae). Journal of Arachnology 29: 354-366.

Fincke OM., Higgins L. & Rojas E 1990. Parasitism of *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae) by an ichneumonid (Hymenoptera, Polysphinctini) in Panamá. Journal of Arachnology 18: 321-329.

Fritz RS 1982. Selection for host behavior modification by insect parasitoids. Evolution 36: 283-288.

Gauld ID & Dubois J 2006. Phylogeny of the *Polysphincta* group of genera (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae): a taxonomic revision of spider ectoparasitoids. *Systematic Entomology* 31: 529-564.

Gonzaga MO & Sobczak JF 2007. Parasitoid-induced mortality of *Araneus omnicolor* (Araneae, Araneidae) by *Hymenoepimecis* sp. (Hymenoptera, Ichneumonidae) in southeastern Brazil. *Naturwissenschaften* 94: 223-227.

Gonzaga MO., Sobczak JF., Penteado-Dias AM. & Eberhard WG 2010. Modification of *Nephila clavipes* (Araneae: Nephilidae) webs induced by the parasitoids *Hymenoepimecis bicolor* and *H. robertsae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Ethology Ecology and Evolution* 22: 151-165.

Godfray HCJ 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton, NJ. 473pp.

Grosman AH., Janssen A., De Brito EF., Cordeiro EG., Colares F., Fonseca JO., Lima E R., Pallini A & Sabelis W 2008. Parasitoid increases survival of its pupae by inducing hosts to fight predators. *PloS One* 3(6).

Holmes JC & Bethel WM 1972. Modification of intermediate host behaviour by parasites. In: Behavioural Aspects of Parasite Transmission. (Edited by Canning E. U & Wright C. A.), pp. 123-149. Academic Press, London. 219pp.

Korenko S. & Pekár S 2011. A parasitoid wasp induces overwintering behavior in its spider host. PloS one 6 (9).

Libersat F., Delago A & Gal R 2009. Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites. Annual Review Entomology 54: 189-207.

Moore J 1984. Altered behavioural responses in intermediate hosts: an acanthocephalan parasite strategy. American Naturalist 123: 572-577.

McLachlan A. 1999. Parasites promote mating success: the case of a midge and a mite. Animal Behaviour 57: 1199-1205.

Matsumoto R. 2009. "Veils" Against predators: Modified web structure of a host spider induced by an Ichneumonid parasitoid, *Brachyzapus nikoensis* (Uchida) (Hymenoptera). Journal of insect Behavior 22: 39-48.

Moore J. 2002. Parasites and the behaviour of animals. In: *Oxford Series in Ecology and Evolution*. New York: Oxford University Press. 338pp.

Palacio E., Saaksjarvi IE & Vahtera V 2007. *Lamnatibia*, a new genus of the *Polysphincta* group of genera from Colombia (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae). *Zootaxa* 1431: 55-63.

Poulin R 2000. Manipulation of host behaviour by parasites: a weakening paradigm? *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 267: 787-792.

Robinson MH & Robinson BC 1973. The stabilimenta of *Nephila clavipes* and the origins of stabilimentum-building in Araneids. *Psyche* 80:277-288.

Sobczak JF., Loffredo APS., Pentead-Dias AM & Gonzaga MO 2009. Two new species of *Hymenoepimecis* (Hymenoptera: Ichneumonidae, Pimplinae) with notes on their spider hosts and behaviour manipulation. *Journal Natural History*, vol. 43, no. 43–44, p. 2691-2699.

Sobczak J. F., Loffredo APS. & Pentead-Dias AM 2012a. Parasitism on *Araneus venatrix* (Koch, 1838) (Araneae: Araneidae) by *Hymenoepimecis silvanae* Loffredo & Pentead-Dias, 2009 (Ichneumonidae, Pimplinae) with description of male of the wasp. *Brazilian Journal of Biology* 72: 221-223.

Sobczak JF., Loffredo APS & Pentead-Dias AM 2012b. *Hymenoepimecis neotropica* (Brues & Richardson) (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) parasitoid of *Araneus omnicolor* (Keyserling) (Araneae, Araneidae) first host record and new occurrence to Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 56: 390-392.

Thomas F., Adamo, S & Moore J 2005. Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behavioural Processes* 68: 185-199.

Vinson SB 1975. Biochemical coevolution between parasitoids and their hosts, p. 14-18. In P. W. Price (ed.), *Evolutionary strategies of Parasitic Insects and Mites*. Plenum Press, N. Y. 224pp.

Van Dobben WH 1952. The food of the cormorant in the Netherlands. *Ardea* 40: 1-63

Wahl D & Gauld ID 1998. The cladistics and higher classification of the Pimpliformes (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Systematic Entomology* 23: 265-268.

Witt PN., Reed CF & Peakall DB 1968. *A spider's web: problems in regulatory biology*. New York, Springer Verlag, New York.107pp.

Wickler W 1976. Evolution-oriented ethology, kin selection, and altruistic parasites.
Zeitschrift für Tierpsychologie 42: 206-214.