



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

LUIS CAMPILI PEREIRA

**HISTÓRIA NATURAL DA INTERAÇÃO ENTRE O PARASITOIDE *Eruga unilabiana*
PÁDUA & SOBCZAK, 2018 (HYMENOPTERA, ICHNEUMONIDAE, PIMPLINAE) E
DUAS ARANHAS HOSPEDEIRAS, NA SERRA DE BATURITÉ, CE, BRASIL**

FORTALEZA

2021

LUIS CAMPILI PEREIRA

HISTÓRIA NATURAL DA INTERAÇÃO ENTRE O PARASITOIDE *Eruga unilabiana*
PÁDUA & SOBCZAK, 2018 (HYMENOPTERA, ICHNEUMONIDAE, PIMPLINAE) E
DUAS ARANHAS HOSPEDEIRAS, NA SERRA DE BATURITÉ, CE, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Jober Fernando Sobczak

Co-orientador: Dr. German Antonio Villanueva-Bonilla

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P492h Pereira, Luis Campili.

História natural da interação entre o parasitoide *Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, 2018 (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) e duas aranhas hospedeiras, na Serra de Baturité, CE, Brasil / Luis Campili Pereira. – 2022.

80 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Jober Fernando Sobczak.

Coorientação: Prof. Dr. German Antonio Villanueva-Bonilla.

1. Aranhas construtoras de teias de lençol. 2. Grupo de gêneros *Polysphincta*. 3. Manipulação comportamental. 4. Mata atlântica. 5. Vespas-de-Darwin. I. Título.

CDD 577

LUIS CAMPILI PEREIRA

HISTÓRIA NATURAL DA INTERAÇÃO ENTRE O PARASITOIDE *Eruga unilabiana*
PÁDUA & SOBCZAK, 2018 (HYMENOPTERA, ICHNEUMONIDAE, PIMPLINAE) E
DUAS ARANHAS HOSPEDEIRAS, NA SERRA DE BATURITÉ, CE, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial de obtenção de título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovado em: ___/___/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jober Fernando Sobczak (Orientador)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Thiago Gechel Kloss
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Dr. Diego Galvão de Pádua
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Prof. Dr. Yves Patric Quinet
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida.

A minha família, meus pais, irmãos e irmãs, primos e primas. Em especial a minha querida mãe, que me educou e deu todas as condições para que eu pudesse estar hoje perseguindo meus sonhos.

Ao meu orientador Dr. Jober Fernando Sobczak por me orientar, introduzir no mundo de pesquisa científica e me apresentar o maravilhoso mundo dos parasitoides de aranhas e suas fascinantes histórias.

Ao meu co-orientador Dr. German Antonio Villanueva-Bonilla pela orientação, ensinamentos e toda ajuda oferecida na análise de dados, elaboração dos manuscritos e desta dissertação.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Ecologia e Evolução da UNILAB, que me proporcionaram ao longo destes anos muitas experiências boas e aprendizagens. E também pelo apoio e contribuições que deram para que este trabalho seja uma realidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN-UFC) e a UFC e seus estimados professores pelo curso proporcionado.

Aos todos colegas e amigos da turma 2019.1 do PPGERN pelo apoio e experiências compartilhadas ao longo destes anos.

Aos meus amigos e compatriotas Guineenses da UNILAB e do Ceará pelo apoio dentro e fora dos corredores da universidade.

A UNILAB por toda estrutura que proporcionou para realização deste trabalho e sem esquecer seus estimados motoristas.

Ao Sr. Francisco Bonaldo Nogueira Braga pelo acesso e apoio oferecido na área de estudo no Mulungu e também por todos os nossos parceiros na Serra de Baturité que sempre nos acolheram e nos permitiram o acesso às áreas para nossas pesquisas.

Às agências de financiamento de pesquisas no Brasil, a CAPES pela bolsa de mestrado, a FUNCAP e ao CNPq pelos materiais e projetos do laboratório financiado.

A todos parceiros do laboratório de Ecologia e Evolução da UNILAB, a Butantan, o INPA, INCT HYMPAR e demais colaboradores.

E todos amigos fora da universidade pelo acolhimento e apoio durante todo esses anos aqui no Brasil.

RESUMO

As vespas do grupo de gênero *Polysphincta* são atualmente os únicos Pimpliinae (Hymenoptera: Ichneumonidae) conhecidos como ectoparasitóides cenobiontes de aranhas. Elas exibem uma diversidade de estratégias de exploração dos hospedeiros, entre elas, a manipulação comportamental dos hospedeiros para que estas construam teias com estruturas que forneçam proteção às suas pupas contra inimigos naturais e fatores abióticos. No entanto, existe uma enorme escassez de conhecimentos da história natural de muitas interações já registradas, sobretudo onde os dados apontam para a ocorrência de manipulação comportamental dos hospedeiros. Este trabalho se concentra no parasitoide do grupo *Polysphincta* recentemente descrito, *Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, 2018, o qual está associado a aranha *Sphecozone* sp. (Linyphiidae) na serra de Baturité, Ceará, Brasil. No primeiro capítulo, (i) reportamos a interação da *E. unilabiana* com a aranha *Eurymorion* sp. (Linyphiidae), pela primeira vez, (ii) descrevemos a teia normal e modificada de *Eurymorion* sp. induzida por larva do penúltimo ínstar de *E. unilabiana*, (iii) quantificamos as diferenças entre as estruturas das teias normais e modificadas de *Eurymorion* sp. e de *Sphecozone* sp. e, (iv) descrevemos o comportamento de ambas aranhas sob influência da larva do penúltimo ínstar da *E. unilabiana*. Descobrimos que teias modificadas construídas por indivíduos de *Eurymorion* sp. possuem características mais protetoras e estáveis que as teias normais e, são estruturalmente semelhantes às que indivíduos da *Sphecozone* sp. fazem quando são manipulados pelo mesmo parasitóide. As áreas dos lençóis e o comprimento dos fios de interceptação das teias modificadas foram significativamente menores quando comparadas com teias normais. Os indivíduos das duas espécies de aranhas são induzidos a abandonar suas teias normais para construir teia modificada do zero. Tanto (1) o abandono da teia normal para construção de teia modificada do zero como (2) as características das teias da teia modificada, oferecem provavelmente maiores chances de sobrevivência para as pupas de *E. unilabiana*. No segundo capítulo, (i) descrevemos a morfologia, comportamento e desenvolvimento dos estágios imaturos de *E. unilabiana*, (ii) investigamos a frequência de parasitismo de *E. unilabiana* na população de *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp., (iii) avaliamos a possível seleção do tamanho do hospedeiro no momento de oviposição e, (iv) relatamos o ataque de uma fêmea adulta de *E. unilabiana* num indivíduo de *Eurymorion* sp. registrada no campo. Descobrimos que o ovo é uma massa branca cilíndrica que é geralmente posicionada transversalmente na porção anterior do abdômen da aranha. As larvas do primeiro instar

eclodem do ovo três dias depois de serem depositadas no abdômen da aranha e não apresentam segmentação no corpo e nem estruturas que aparecem nos estágios posteriores. As larvas do segundo instar apresentam segmentação no corpo e induzem às aranhas a construírem uma teia modificada para proteção de pupas. As larvas do terceiro instar apresentam oito pares de tubérculos dorsais retráteis com ganchos minúsculos, dois pares de protuberâncias ventrais e, antes de matarem e descartarem os restos das aranhas, invertem o posicionamento das aranhas no lençol da teia para poderem construir o casulo neste lençol. O casulo é construído no centro do lençol da teia modificada e a seda usada para formação do revestimento externo do casulo é produzida no segmento anal. A vespa adulta eclode em média 10 dias após o início da fase de pupa com liberação do mecônio. A frequência de parasitismo na população de *Sphecozone* sp. e de *Eurymorion* sp. é baixa e foi maior em indivíduos do tamanho intermediário e do sexo feminino de ambos espécimes de aranhas. Com estes resultados, descobrimos que os estágios imaturos da *E. unilabiana* apresentaram não só as mesmas características morfológicas e comportamentais básicas já conhecidas para espécies dentro do grupo *Polysphincta*, mas também outras novas ajustadas a ecologia e comportamentos das duas aranhas hospedeiras. A produção da seda no segmento anal para construção do casulo é também o primeiro registro em vespas Ichneumonidae.

Palavras-chave: aranhas construtoras de teias de lençol; cenobionte; ephialtini; grupo de gêneros *Polysphincta*; manipulação comportamental; mata atlântica; vespas-de-Darwin.

ABSTRACT

Wasps of the *Polysphincta* genus-group are currently the only Pimpliinae (Hymenoptera: Ichneumonidae) known as Koinobiont ectoparasitoids of spiders. They exhibit a variety of host exploration strategies, including the behavioral manipulation of hosts so that they build webs with structures that provide protection to their pupae against natural enemies and abiotic factors, however, there is a lack of knowledge of natural history of many interactions already registered, especially where the data point to the occurrence of behavioral manipulation of hosts. This work focuses on the recently described parasitoid of the *Polysphincta* group, *Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, 2018, which is associated with the spider, *Sphecozone* sp. (Linyphiidae) in the mountains of Baturité, Ceará, Brazil. In the first chapter, (i) we (i) report the interaction between the parasitoid wasp *Eruga unilabiana* and the spider *Eurymorion* sp., for the first time, (ii) describe of the normal and cocoon webs of *Eurymorion* sp. induced by larvae of the penultimate instar of *E. unilabiana*, (iii) quantified the differences between the structures of normal and cocoon webs of *Eurymorion* sp. and *Sphecozone* sp. spiders and (iv) we describe the behavior of two spiders under influence of the larvae of the penultimate instar of *E. unilabiana*. We found that modified webs constructed by individuals of *Eurymorion* sp. have more protective and stable characteristics than normal webs and are structurally similar to individuals of *Sphecozone* sp. they do when they are manipulated by the same parasitoid. Sheet areas and interception thread length of the modified webs were significantly smaller when compared to normal webs. Individuals of the two species of spiders are induced to abandon their normal webs to build modified web from scratch. Both (1) the abandonment of the normal web to build the cocoon web from scratch and (2) the characteristics of the webs of the modified web probably guarantee greater chances of survival for *E. unilabiana* pupae. In the second chapter, (i) we describe the morphology, behavior and development of the immature stages of *E. unilabiana*, (ii) we investigate the frequency of parasitism of *E. unilabiana* in the population of *Sphecozone* sp. and *Eurymorion* sp., (iii) we evaluated the possible selection of host size at the time of oviposition and, (iv) we report the attack of an adult female of *E. unilabiana* on an individual of *Eurymorion* sp. registered in the field. We found that the egg is a white cylindrical mass that is usually positioned across the anterior portion of the spider's abdomen. First-instar larvae hatch from the egg three days after being deposited in the spider's abdomen and do not have segmentation in the body or structures that appear in later stages. Second instar larvae present segmentation in the body and induce spiders to build a modified web to pupae protection. Third-

instar larvae have eight pairs of retractable dorsal tubercles with tiny hooks, two pairs of ventral protuberances and, before killing and discarding the spider's remains, they invert the spider's position on the web sheet in order to build the cocoon on this sheet. The cocoon is constructed in the center of the modified web sheet and the silk used to form the cocoon's outer lining is produced in the anal segment. The adult wasp hatch on average 10 days after the beginning of the pupae stage with release of meconium. The frequency of parasitism in the population of *Sphecozone* sp. and *Eurymorion* sp., is low and was higher in intermediate size and female individuals of both spider species. With these results, we found that the immature stages of *E. unilabiana* present not only the same basic morphological and behavioral characteristics already known for species within the *Polysphincta* group, but also new ones adjusted to the ecology and behavior of the two hosts spiders. The production of silk in the anal segment for the construction of the cocoon is also the first recorded in Ichneumonidae wasps.

Keywords: atlantic forest; behavioral manipulation; cenobiont; darwin's wasps; ephialtini; *polysphincta* group of genera; sheet web-building spiders.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	CAPITULO 1 - BEHAVIORAL MANIPULATION IN TWO SHEETWEB WEAVER-SPIDER INDUCED BY THE PARASITOID WASP <i>ERUGA UNILABIANA</i> PÁDUA & SOBCZAK, 2018 (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE)	13
2.1	Introduction	14
2.2	Material and Methods	16
2.2.1	<i>Study area</i>	17
2.2.2	<i>Sampling of spiders and parasitoids</i>	17
2.2.3	<i>Description of normal and cocoon webs of <i>Eurymorion</i> sp.</i>	17
2.2.4	<i>Differences between normal and cocoon web structures</i>	18
2.2.5	<i>Behavior of parasitized spiders</i>	18
2.2.6	<i>Statistical analysis</i>	19
2.3	Results	19
2.3.1	<i>Normal webs of <i>Eurymorion</i> sp.</i>	19
2.3.2	<i>Cocoon webs of <i>Eurymorion</i> sp.</i>	20
2.3.3	<i>Differences between normal and cocoon web structures</i>	22
2.3.4	<i>Behavior of parasitized spiders</i>	22
2.3.4.1	<i>Eurymorion</i> sp.	22
2.3.4.2	<i>Sphecozone</i> sp.	22
2.4	Discussion	23
3	CAPITULO 2 - HISTÓRIA NATURAL E COMPORTAMENTO DOS ESTÁGIOS IMATUROS DA <i>ERUGA UNILABIANA</i> PÁDUA & SOBCZAK, 2018 (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE): PARASITOIDE DE <i>SPHECOZONE</i> SP. E DE <i>EURYMORION</i> SP. (LINYPHIIDAE)	43
3.1	Introdução	46
3.2	Materiais e Métodos	48
3.2.1	<i>Área de estudo</i>	48
3.2.2	<i>Táxons de estudo</i>	48
3.2.3	<i>Estágios Imaturos</i>	49
3.2.4	<i>Frequência de parasitismo e seleção do tamanho do hospedeiro</i>	49

3.3	Resultados.....	50
3.3.1	<i>Estágios imaturos.....</i>	50
3.3.1.1	<i>Morfologia, comportamento e desenvolvimento.....</i>	50
3.3.1.2	<i>Inversão do posicionamento da aranha na teia.....</i>	52
3.3.1.3	<i>Construção de casulo.....</i>	54
3.3.2	<i>Ataque e oviposição de vespas adultas.....</i>	56
3.3.3	<i>Frequência de parasitismo e a seleção do tamanho do hospedeiro.....</i>	57
3.4	Discussão.....	58
3.4.1	<i>Estágios imaturos.....</i>	58
3.4.2	<i>Frequência de parasitismo e a seleção do tamanho do hospedeiro.....</i>	60
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os parasitoides são grupos de organismos em que as fêmeas adultas colocam seus ovos dentro ou sobre o corpo de outros organismos (os hospedeiros) para o desenvolvimento enquanto os indivíduos adultos, na maioria dos casos, são de vida livre (DOUTT, 1959; HASSELL; WAAGE, 1984). Os ovos depositados nos hospedeiros pelos parasitoides eclodem depois em larvas e passam a alimentarem-se dos tecidos hospedeiros, que geralmente acabam sendo mortos no final do processo (DOUTT, 1959; HASSELL & WAAGE, 1984). Os parasitoides são mais comuns em insetos, sobretudo na ordem Hymenoptera, que abriga a maior diversidade de espécies (HASSELL & WAAGE, 1984).

Vários ordens de insetos são utilizados como hospedeiros por parasitoides, incluindo os próprios himenópteros e muitos deles são pragas em agroecossistemas, tornando estes parasitoides muito importantes para regulação da população destes insetos (WAINBERG et al., 2008; QUICKE, 2015). No entanto, outros parasitoides se especializaram em parasitar aranhas, atacando desde sacos de ovos de aranhas até indivíduos adultos e ocorrendo praticamente em todos ecossistemas terrestres (NIELSEN, 1923; TOWNES, 1960; FITTON et al.; 1987, 1988; GAULD, 1988; GAULD et al., 2002; GAULD; DUBOIS, 2006; MATSUMOTO, 2016).

Nos parasitoides que atacam aranhas, um grupo tem se destacado como parasitoides exclusivos de aranhas, o grupo de gêneros *Polysphincta* (*Polysphinctini* sensu Gauld & Dubois, 2006). O grupo de gêneros *Polysphincta* é agrupamento de 25 gêneros de vespas da família Ichneumonidae, subfamília Pimplinae e que se desenvolvem como ectoparasitoides cenobiontes de aranhas (GAULD; DUBOIS, 2006; MATSUMOTO, 2016; EBERHARD; GONZAGA, 2019). Nesta interação, a vespa fêmea adulta ataca a aranha na sua teia ou refugio paralisando-a temporariamente, depois deposita um único ovo sobre o abdômen ou no cefalotórax da aranha que, posteriormente recupera sua atividade, alimentando e crescendo enquanto o parasitoide imaturo se desenvolve e sugando a sua hemolinfa (FINCKE et al., 1990; EBERHARD, 2000b; GONZAGA; SOBCZAK, 2007; MATSUMOTO; KONISHI, 2007).

Matsumoto (2016) dividiu os *Polysphinctines* em três clados principais e sendo cada um deles composto por espécies que possuem características biológicas e ecológicas distintas. Os gêneros do clado I (subgrupo *Schizopyga* sensu Matsumoto, 2016) são considerados mais próximos à linhagem irmã do grupo, uma linhagem de espécies ancestrais que atacam sacos de ovos de aranhas e por vezes aranhas fêmeas adultas guardiãs desses ovos

(MATSUMOTO, 2016; TAKASUKA et al., 2018). As vespas do clado I desenvolvem associações com aranhas caçadoras errantes ou com aquelas que constroem teias ou retiros no solo e possuem um conjunto de adaptações morfológicas e comportamentais que acabam com o desenvolvimento do ovo no cefalotórax das hospedeiras (MATSUMOTO, 2016; TAKASUKA et al., 2019). Os gêneros dos clados II e III (subgrupo *Acrodactyla* e *Polysphincta* sensu Matsumoto, 2016), por outro lado, são considerados mais derivados do grupo, desenvolvendo associações com aranhas de várias famílias que constroem teias aéreas, teias construídas na vegetação e, com o ovo desenvolvendo no abdômen das hospedeiras (MATSUMOTO, 2016; TAKASUKA et al., 2019).

Ao longo do processo evolutivo, as larvas de muitas espécies desenvolveram adaptações morfológicas e comportamentais que permitiram explorar as aranhas hospedeiras garantindo não só recurso alimentar para o crescimento e desenvolvimento, como também para sobreviverem durante o período em que estão no corpo das hospedeiras e na fase de pupa (NIELSEN, 1923; EBERHARD, 2000b, 2001; GAULD; DUBOIS, 2006; MATSUMOTO, 2009, 2016; TAKASUKA et al., 2018; EBERHARD; GONZAGA, 2019). Uma destas adaptações é a capacidade das larvas do penúltimo instar de induzir uma mudança comportamental nas aranhas fazendo com que construam teias especiais para proteção e suporte da pupa em seu casulo contra inimigos naturais e fatores abióticos (EBERHARD, 2001, 2010, 2013; WENG; BARRANTES, 2007; MATSUMOTO 2009; GONZAGA et al., 2010; KORENKO; PEKAR 2015; TAKASUKA et al., 2015; KLOSS et al., 2016; SOBCZAK et al., 2018).

Apesar do grande interesse que a interação entre Polysphinctines e aranhas desperta no universo de pesquisadores das áreas de ecologia, entomologia, zoologia e outras, ela continua pouco explorada em vários aspectos. Um deles é a escassez de conhecimentos da história natural de muitas interações já registradas, sobretudo onde os dados apontam para a ocorrência de manipulação comportamental. O registro de novas interações, o conhecimento das estratégias de exploração dos hospedeiros, a documentação dos padrões de modificações comportamentais e os mecanismos de manipulação do comportamento das hospedeiras continuam sendo as principais direções das pesquisas (GONZAGA et al., 2017; WEINERSMITH, 2019; EBERHARD; GONZAGA, 2019).

Nesta dissertação, concentramos na interação de uma vespa Polysphinctine recentemente descrito, *Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, 2018, o qual está associado a aranha *Sphecozone* sp. (anteriormente *Dubiaranea* sp. ver SOBCZAK et al., 2018)

(Linyphiidae) na serra de Baturité, Ceará, Brasil. A presente dissertação está dividida em dois capítulos, a seguir:

No capítulo 1 (manuscrito preparado para submissão na revista *Entomological Science*) (i) reportamos a interação da *E. unilabiana* com a aranha *Eurymorion* sp., pela primeira vez, (ii) descrevemos a teia normal e modificada de *Eurymorion* sp. induzida por larva do penúltimo instar de *E. unilabiana*, (iii) quantificamos as diferenças entre as estruturas das teias normais e modificadas de *Eurymorion* sp. e de *Sphecozone* sp. e, (iv) descrevemos o comportamento de ambas aranhas sob influência da larva do penúltimo instar de *E. unilabiana*. No capítulo 2, (i) descrevemos a morfologia, comportamento e desenvolvimento dos estágios imaturos de *E. unilabiana*, (ii) investigamos a frequência de parasitismo de *E. unilabiana* na população de *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp., (iii) avaliamos a possível seleção do tamanho do hospedeiro no momento de oviposição e, (iv) relatamos o ataque de uma fêmea adulta de *E. unilabiana* num indivíduo de *Eurymorion* sp. registrada no campo.

2 CAPITULO 1

1 **Behavioral manipulation in two sheet web weaver-spider induced by the parasitoid wasp**
2 ***Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, 2018 (Hymenoptera: Ichneumonidae)**

3

4 Luis Campili Pereira^{1,2}, German Antonio Villanueva-Bonilla³, Raul Azevedo^{1,2} Jober Fernando
5 Sobczak^{1,2}

6

7 ¹*Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade*
8 *da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, Rodovia CE-060, Km 51,*
9 *s/n, 62785-000, Acarape, CE, Brazil;* ²*Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos*
10 *Naturais, Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará,*
11 *Avenida Mister Hull, s/n 8, Fortaleza, CE, Brazil e* ³*Universidade Estadual de Campinas,*
12 *Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Rua Monteiro Lobato, 255,*
13 *Campinas, São Paulo, Brazil*

14

15

16

17

18 *Correspondence:* Luis Campili Pereira, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos
19 Naturais, Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará –
20 UFC, Avenida Mister Hull, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil

21 Email: luiscampili@alu.ufc.br

22

23

Manuscrito preparado para submissão Entomological Science, Fator de Impacto 1.38 (2021)
(A4 em Biodiversidade)

24 **Abstract**

25 The ability of some organisms to manipulate the behavior, physiology and morphology of other
26 individuals to increase the chances of survival and reproduction is well known among animals
27 with a parasitic lifestyle. In the present study we (i) report the interaction between the parasitoid
28 wasp *Eruga unilabiana* and the spider *Eurymorion* sp., for the first time, (ii) describe of the
29 normal and cocoon webs of *Eurymorion* sp. induced by larvae of the penultimate instar of *E.*
30 *unilabiana*, (iii) quantified the differences between the structures of normal and cocoon webs
31 of *Eurymorion* sp. and *Sphecozone* sp. spiders and (iv) we describe the behavior of two spiders
32 under influence of the larvae of the penultimate instar of *E. unilabiana*. The cocoon webs built
33 by individuals of *Eurymorion* sp. have more protective and stable characteristics than normal
34 webs and are structurally similar to that of individuals from *Sphecozone* sp. do when they are
35 manipulated by the same parasitoid. The areas of the sheets and the length of the intercepting
36 threads of the cocoon webs were significantly smaller than those of normal webs. Several
37 individuals of the two species of spiders are induced to abandon their normal webs to build a
38 cocoon web from scratch, a very rare behavior in non-parasitized individuals. Both (1) the
39 abandonment of the normal web to build the cocoon web from scratch and (2) the characteristics
40 of the cocoon webs are likely to ensure greater chances of survival for *E. unilabiana* pupae.

41

42 **Keywords:** Atlantic forest, cocoon web, Linyphiidae, Pimplinae, *Polysphincta* genus group,
43 three-dimensional webs.

44 2.1 INTRODUCTION

45

46 The ability of some organisms to manipulate the behavior, physiology or morphology of other
47 individuals to increase the chances of survival and reproduction is well known among animals
48 with parasitic lifestyle (parasites and parasitoids) (Poulin 1995; Eberhard 2000a; Thomas *et al.*
49 2005; Lefèvre *et al.* 2008). Among the parasitic organisms that manipulate their host's behavior
50 are the wasp from the *Polysphincta* genus-group. The *Polysphincta* genus-group (sensu Gauld
51 & Dubois 2006; “polysphinctines” hereafter) is a monophyletic group belonging to the family
52 Ichneumonidae, subfamily Pimplinae, that develop as exclusive koinobiont ectoparasitoids of
53 spider (Nielsen 1923; Gauld *et al.* 2002; Gauld & Dubois 2006; Matsumoto 2016). In this
54 interaction, an adult female deposits an egg on the outside of the abdomen or on the spider's
55 cephalothorax after it has been temporarily paralyzed, later the egg hatches and the larva
56 develop by consuming the spider's internal fluids until its dies (Eberhard 2000b; Gonzaga &
57 Sobczak 2007; Weng & Barrantes 2007; Matsumoto, 2009; Takasuka *et al.* 2009). Moments
58 before the larva molts to the third instar and kills the spider, it induces the spider to build a
59 modified web (“cocoon web” sensu Eberhard 2000a) that, most of the time, has characteristics
60 that protect the pupa against natural enemies and abiotic factors such as rain and wind (Eberhard
61 2000a, 2001, 2010a, 2010b; Gonzaga *et al.* 2010; Takasuka *et al.* 2015; Kloss *et al.* 2016, 2017;
62 Eberhard & Gonzaga 2019).

63 A variety of cocoon web patterns were observed in spiders belonging to the Araneidae,
64 Linyphiidae, Tetragnathidae, Theridiidae, Agelenidae and Salticidae families, when they were
65 carrying larvae of the penultimate instar of *Polysphinctine* wasp (reviewed in Gonzaga *et al.*
66 2017; Eberhard & Gonzaga 2019). These changes ranged from shifting from two-dimensional
67 to three-dimensional webs (Gonzaga & Sobczak 2011; Korenko *et al.* 2014, 2018), addition of
68 specific structures in normal webs (Weng & Barrantes 2007; Matsumoto 2009; Eberhard
69 2010b), reductions in the structural components of the webs

70 (Eberhard 2001; Gonzaga & Sobczak 2011; Takasuka *et al.* 2015; Sobczak *et al.* 2018; Kloss
71 *et al.* 2017; Villanueva-Bonilla *et al.* 2021), and cocoon webs similar to webs built by non-
72 parasitized spiders for other purposes (e.g. webs of ecdysis, hibernation or egg protection)
73 (Korenko & Pekar 2011; Takasuka *et al.* 2015; Kloss *et al.* 2017). In addition to the cocoon web
74 patterns, some manipulated spiders have been observed to omit some common behaviors for
75 the construction of prey capture webs (Eberhard 2001; Eberhard 2013) and others were
76 observed to abandon normal webs and build cocoon webs from scratch (Eberhard 2010b;
77 Fernandez-Fournier *et al.* 2019).

78 *Eruga unilabiana* is a Polysphinctine wasp was recently described together with its larvae
79 that induce individuals of *Sphecozone* sp. (formerly *Dubiaranea* sp. see Sobczak *et al.* 2018) to
80 build a cocoon web with more protective and stable characteristics than normal webs (Sobczak
81 *et al.* 2018). The cocoon web of *Sphecozone* sp. retains some structures that are seen in normal
82 webs, but with reduced sizes (Sobczak *et al.* 2018). However, the differences between the
83 structures of normal and cocoon did not quantify and it is not known whether this behavioral
84 change occurs gradually (over two or more days) or abruptly (only in a few hours) as observed
85 in other spiders parasitized by Polysphinctine wasp (Eberhard 2001; Gonzaga *et al.* 2010).

86 In the present study, we (i) report the interaction between the parasitoid wasp *E. unilabiana*
87 and the host spider *Eurymorion* sp., for the first time, (ii) describe the normal and cocoon webs
88 of *Eurymorion* sp. induced by larvae of the penultimate instar of *E. unilabiana*, and (iii)
89 quantified the differences between the structures of normal and cocoon web *Eurymorion* sp.
90 and *Sphecozone* sp.. Finally, (iv) we observed parasitic individuals of both spiders in the
91 laboratory until the construction of the cocoon web to find out if the behavioral changes occur
92 gradually or abruptly.

93

94 **2.2 MATERIALS AND METHODS**

95 **2.2.1 Study area**

96 We carried out the study in a montane semi-deciduous tropical forest, located in Mulungu,
97 Ceará, Brazil (04°19'26.3" S 38°56'18.0" W, altitude 840 m) from August 2020 to January
98 2021. The area is part of an environmental protection area - APA de Baturité and the annual
99 averages of temperature and precipitation are 20.8°C and 1221.86 mm, respectively (Araújo *et*
100 *al.* 2007).

101

102 **2.2.2 Sampling of spiders and parasitoids**

103 We sampled the two species of host spiders by active search in the interior and at the edges of
104 the forest. The parasitized and non-parasitized spiders were taken to UNILAB (University of
105 International Integration of Afro-Brazilian Lusophony) Ecology and Evolution laboratory and
106 kept in plastic pots (80 mL) at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, natural light regime and appropriate
107 relative humidity maintained through frequent water sprays. They were fed daily with
108 *Drosophila* sp. and a nutritious solution of protein powder dissolved in water (Zanata &
109 Vasconcellos-Neto, unpublished data). The specimens of spiders collected were deposited in
110 the collection of the Butantan Institute, São Paulo, Brazil (Curator: Antonio D. Brescovit) and
111 the wasps were deposited in the Invertebrate Collection of the Amazonas Research National
112 Institute -INPA, Amazonas, Brazil (Curator: Marcio L. Oliveira).

113

114 **2.2.3 Description of normal and cocoon webs of *Eurymorion* sp.**

115 We analyzed the structures of normal webs constructed by non-parasitized individuals and
116 cocoon webs constructed by parasitized individuals hours before being killed by *E. unilabiana*
117 third instar larvae to determine the differences between them. We analyzed 8 normal webs and
118 22 cocoon webs built in the laboratory. To build these webs, we placed the spiders collected in
119 the field in a square polystyrene box (60x60x60 cm) covered above and in front with a
120 transparent tulle fabric to prevent the spider's escape. Inside the

121 box, we put a support made of tree branches. The webs made in the boxes by the parasitized
122 and non-parasitized spiders were sprayed with water and corn starch to facilitate the
123 photographic record and description of their structures (Eberhard 1976). For the photographs
124 we use a Canon EOS Rebel SL2 digital camera, with Macro EF 100mm f / 2.8 Macro USM
125 lens.

126

127 **2.2.4 Differences between normal and cocoon web structures**

128 We quantified the differences between sheets and interception threads of the normal and cocoon
129 webs of the two spider species. (Fig. 1A–F). For normal webs, we use 35 webs of *Eurymorion*
130 sp. and 24 webs of *Sphecozone* sp. built in the field. For cocoon webs, we use 12 webs of
131 *Eurymorion* sp. and 11 from *Sphecozone* sp. built in the laboratory at night, when they were
132 killed by the larva of the third instar of *E. unilabiana*. The length and width of the sheets of the
133 normal and cocoon webs were measured with a ruler to estimate the area of the sheet. We also
134 measured the length of the intercepting threads of the normal webs (from the center of the main
135 sheet to the point of attachment to the highest vegetation) and of the vertical threads above the
136 sheet of the cocoon webs, which are equivalent to the intercepting threads (from the center of
137 the cocoon sheet to the connection point with anchor threads that crosses the cupola region).
138 For normal webs in the field, we use only sub-adult and adult individuals with an abdomen
139 length greater than or equal to 1 mm, as they are most preferred by the female of *E. unilabiana*
140 at the time of oviposition and also because some immature individuals of both parasitized
141 spiders species observed on laboratory were only killed when they had abdomen length in this
142 size range (manuscript in prep.). In all ruler measurements, the accuracy was ± 0.5 cm.

143

144 **2.2.5 Behavior of parasitized spiders**

145 We studied the behavior of parasitized individuals of *Eurymorion* sp. and *Sphecozone* sp.

146 placed in the Styrofoam box for the construction of cocoon webs in the laboratory. We analyzed
147 all the webs built by these individuals from the first day that were placed in the box until they
148 were killed by the larva of the third instar. The webs were photographed and their structures
149 were compared to determine whether there are differences and whether changes in the web
150 architecture have occurred gradually or abruptly. The construction behavior of a cocoon web
151 by an individual from *Sphecozone* sp. was recorded with a Canon EOS Rebel SL2 digital
152 camera, with Macro EF 100mm f / 2.8 Macro USM lens.

153

154 **2.2.6 Statistical analysis**

155 To find out if (i) the sheet area and (ii) the length of the interception threads are different
156 between normal and cocoon webs, we performed a T test and a Wilcoxon test respectively,
157 since the normality of the data was verified with the Shapiro-Wilk test. We performed the
158 analyzes in the free software R version 4.0.3 (R Core Team 2020) and set the level of
159 significance at 0.05.

160

161 **2.3 RESULTS**

162

163 **2.3.1 Normal webs of *Eurymorion* sp.**

164 Non-parasitized individuals of *Eurymorion* sp. (N = 8) build a sheet-web (Fig. 2A) as most
165 spiders of family Linyphiidae. Structurally, the web is formed by a horizontal and concave main
166 sheet where the spiders hang in an inverted position with the dorsum of the abdomen facing
167 down. It also has a secondary sheet below a small space after the main sheet and a set of
168 interception threads above and perpendicular to the main sheet and connected to the substrate
169 (Fig. 2A). The main sheet usually has several depressions on the surface (Fig. 2B), which are
170 caused by threads pulled by the spider to make the connection with the secondary sheet. The
171 threads that support the secondary sheets have a

172 V-shape at the end that is connected to the sheets (Fig. 2C). Some of these threads have two or
 173 more ramifications near the points where they were fixed to the substrate and are more common
 174 below the secondary sheet and at the intermediate height of the web holding the two sheets (Fig.
 175 2B).

176

177 **2.3.2 Cocoon webs of *Eurymorion* sp.**

178 In total, 22 webs with cocoons were built in the laboratory by parasitized *Eurymorion* sp.. Of
 179 the total recorded, 14 webs (64%) have two main characteristics that distinguish them from
 180 normal webs. First, they have a three-dimensional cupola that houses the cocoon (Figura 3A-
 181 B). The cupola has a sheet that is reduced, convex (sometimes plane) and the cocoon is built
 182 horizontally in the center of the sheet (Fig. 3C). There was no depression on the surface of the
 183 sheet as seen in normal webs (Fig. 2C), except that some had depressions at the edge of the
 184 sheet. Below the sheet where the cocoon was built (cocoon sheet) there is a three-dimensional
 185 empty space (Fig. 3D), free of threads, especially those vertical threads that are seen between
 186 the sheets of normal webs . Below this three-dimensional empty space, it has a three-
 187 dimensional structure with a predominance of horizontal threads (bottom trapezium in Fig. 3E)
 188 and it is the last barrier under the place where the cocoon is built. On the upper surface of the
 189 cocoon sheet there are short vertical threads (perpendicular to the cocoon sheet) (top trapezium
 190 in Fig. 3E) and are similar to the interception threads of normal webs (Fig. 2A), but are not
 191 connected to the
 192 support as in normal webs. Second, several clusters of threads (clusters of anchor threads), that
 193 depart from the cupola and converge to a single point or adjacent points on the substrate, support
 194 the cupola. They have a V-shape at the end connected to the cupola threads and end up giving
 195 these webs the star or X shape (Fig. 3F-J).

196 Additionally, there is a set of anchor threads that enclose the cupola from the sides and form
 197 a kind of barrier (Fig. 4A–C). In this way, the region where the cocoon is built is protected on
 198 all sides: (i) at the top covered by short vertical threads (those similar to the

199 interception threads that are directly connected to the cocoon sheet and often connected to the
200 cocoon itself) (Fig. 3E), (ii) at the bottom covered by the three-dimensional structure where
201 there is a predominance of horizontal threads (Fig. 3E) and, (iii) at the sides (Fig. 4A–C) , by
202 anchor threads. And this barrier on the sides is sparser than that on the top and bottom.

203 Four webs with cocoons (18% of the 22) built by individuals from *Eurymorion* sp. were
204 incomplete; some were without the cupola formed and others without the sheet where the
205 cocoon is built (see Fig.S1A–D). They consisted only of anchor threads and the cocoon was
206 sometimes in vertical orientation. Of these four cases, one of the spiders left the normal web
207 (unmodified) a few hours before being killed by the larva of the third instar to build a web from
208 scratch in a space above the support provided. There was no cupola or sheet and the cocoon
209 was built next to the anchor threads that formed a two-dimensional structure (see Fig.S1A). In
210 another case, the anchor threads formed a structure similar to a rectangular sheet with a
211 depression in the middle and the cocoon, built in the center and horizontally (see Fig.S1B).
212 Finally, in two cases, the cocoon web was just a three-dimensional structure (similar to
213 undefined web "skeleton"), in which in one of them the cocoon was at the center of the crossing
214 point of three sets of threads that started from above (see Fig.S1C) and, on the other web, under
215 a region with many threads (see Fig.S1D).

216 Another four remaining webs (18% of the 22) are similar to normal webs (see Fig.S2A–H).
217 The top sheets had full of depressions and there was a second sheet underneath that was
218 connected to the top sheet with vertical threads spread from the center to the edges of the sheets.
219 In two of these four webs, the cocoons were built in the space between two sheets and were
220 connected to the vertical threads that were in this space (see Fig.S2A–D). In the other two webs,
221 the cocoons were built on the main sheet (see Fig.S2E–H). Furthermore, these four webs also
222 did not have clusters of anchor lines with the same characteristics and patterns as the 14
223 complete cocoon webs described above. There were many single threads sparsely disposed and
224 most were further under the second sheet and on the sides as is common in normal webs.

225 **2.3.3 Differences between normal and cocoon web structures**

226 The areas of the sheets of the cocoon webs constructed by parasitized parasitized *Eurymorion*
227 sp. and *Sphecozone* sp. were significantly smaller than the main sheet areas of normal webs
228 (*Eurymorion* sp.: Student's t-test, $t = 11.26$, d.f. = 39, $p < 0.0001$; *Sphecozone* sp.: Wilcoxon
229 rank sum test, $W = 226$, $p < 0.0001$) (Table 1) (Fig. 5A, B). Also, the length of the vertical
230 threads on top of the cocoon sheet seems two space of both host spiders was significantly shorter
231 compared to the length of intercept threads of normal webs (*Eurymorion* sp.: Student's t-test, t
232 = 14.11, d.f. = 40, $p < 0.0001$; *Sphecozone* sp.: Wilcoxon rank sum test, $W = 264$, $p < 0.0001$)
233 (Table 1) (Fig. 5C, D).

234

235 **2.3.4 Behavior of parasitized spiders**

236

237 **2.3.4.1 *Eurymorion* sp.**

238 All 22 cocoon webs built by parasitized *Eurymorion* sp. were built in the night, before the larva
239 moulted to the third instar, killed the spider and entered the pupal phase. 15 of these 22 spiders
240 abandoned their normal webs previously built to make a cocoon web from scratch, be it
241 complete, incomplete or webs similar to normal webs. In 10 cases, the cocoon webs were mixed
242 with remnants of the normal webs or very close to each other (Fig. 6A–C). In five, to avoid
243 overlapping webs seen in other cases, normal webs were removed from the support a few hours
244 earlier; on the night they were killed by the third instar larva. There was no use of silk from
245 normal webs to build cocoon webs in the 10 cases of abandonment of normal webs. Seven
246 spiders did not have time to build normal webs after being placed on the support inside the box;
247 they built the cocoon webs and then were killed for a few hours by the larva.

248

249 **2.3.4.2 *Sphecozone* sp.**

250 Although some individuals of *Sphecozone* sp. who built cocoon webs in the laboratory were
251 not carefully observed like *Eurymorion* sp., there were five cases of cocoon webs

252 mixed or next to the normal webs previously constructed (Fig. 7A–D), similar to what was
253 registered in the case of *Eurymorion* sp.

254 Three individuals of *Sphecozone* sp. were found building cocoon webs in the morning and in
255 the afternoon. Two of these three individuals were building the cocoon web on top of or mixed
256 with remnants of previously constructed normal webs and ended up being
257 killed by the third instar larvae of *E. unilabiana* around 1pm to 2pm. The other individual started
258 to build cocoon web, but ended up being killed a few hours after the larva moved to third instar
259 and did not finish building the cocoon web (Fig. 9E, F). Additionally, these three individuals of
260 *Sphecozone* sp. were observed to build structures that appear in the cocoon webs alternately. At
261 a given time when they were building the sheet of the cocoon web, they would go down to add
262 the threads just below this sheet and sometimes they would also add the anchor threads to the
263 support provided.

264

265 **2.4 DISCUSSION**

266

267 Our results showed that the larvae of the penultimate instar larvae of *E. unilabiana* induce
268 *Eurymorion* sp. to build cocoon webs that likely to provide protection during the pupal phase
269 and this web is structurally similar to what *Sphecozone* sp. individuals do when they are
270 manipulated by the same parasitoid (Sobczak *et al.* 2018). The cocoon webs contained
271 structures would provide both protection to the region where the cocoon is built and the stability
272 of the web as a whole. They also retain some characteristics and parts of the normal webs to
273 capture prey, indicating that these larvae take advantage of the innate behaviors of the host as
274 seen in other interactions (Weng & Barrantes 2007; Matsumoto 2009; Eberhard 2010b;
275 Korenko *et al.* 2014; Sobczak *et al.* 2018; reviewed in Eberhard & Gonzaga 2019).

276 The cocoon of *E. unilabiana* wasp is built on a sheet that is very different to the main sheet
277 of normal webs, because it has a very small area, without depressions and its

278 surface has become convex instead of concave as it happens in the normal webs of the two
279 spider species studied. These characteristics probably reduce the risk of damage due to the
280 action of rain and falling debris, since it reduces the contact area and the likelihood of
281 accumulation of water and debris (personal observation). The reduction also occurred in the
282 interception threads of both host spiders, which became shorter than those of normal webs
283 (Sobczak *et al.* 2018; this study). The reduction of structural components of webs has been one
284 of the main modifications that polysphinctine wasps induce in their hosts, as it has been
285 observed in several cases involving orb weaving-spiders (Eberhard 2001, 2010a; Matsumoto &
286 Konish 2007; Gonzaga & Sobczak 2007; Gonzaga *et al.* 2015; Kloss *et al.* 2016; Takasuka *et*
287 *al.* 2015; Sobczak *et al.* 2009; Takasuka *et al.* 2017; Villanueva-Bonilla *et al.* 2021). In most of
288 these cases, the structures that are directly involved in capture prey (radii and sticky spirals)
289 were those that had significant reductions. Some spiders of the family Linyphiidae were
290 registered as hosts of polysphinctine wasps (Blackwall 1843; Manuel 1974; Fitton *et al.* 1987,
291 1988; Matsumoto & Takasuka 2010), however little is known about these interactions,
292 especially behavioral manipulation of hosts except for Sobczak *et al.* (2018). Future studies
293 may help to determine whether the reduction of capture web components also occurs in these
294 interactions, if behavioral manipulation is observed.

295 The cocoon webs of the two spider species had clusters of anchor threads converging towards
296 the fixation point on the substrate that varied from four to approximately seven clusters and the
297 number of threads per cluster varied from four to approximately 40. However, these numbers
298 may have been influenced by complexity of support provided in the laboratory. This pattern of
299 clustering can be analogous to the pattern of reinforcement of frame line that were observed in
300 spiders that build orbicular webs parasitized by polysphinctine wasps (Eberhard 2001, 2010a,
301 2013; Gonzaga *et al.* 2010, 2015; Takasuka *et al.* 2015; Korenko *et al.* 2018), as they somehow
302 give more stability to these webs against damage by rain and wind, conditions that capture webs
303 would hardly be able to

304 offer. Clusters of converging radius towards the center of the cocoon web where the cocoon
305 was built was also observed in *Leucauge mariana* (Taczanowski, 1881) (Tetragnathidae)
306 parasitized by the wasp *Eruga* sp. nr. *gutfreundi* (Eberhard 2013; Eberhard & Gonzaga 2019)
307 and everything indicates that they may be aimed at providing stability against damage
308 especially by rain, wind and other abiotic factors. This expectation can be applicable to the
309 cocoon webs induced by *E. unilabiana* as well.

310 The abandonment of normal webs for the construction of cocoon webs from scratch observed
311 in *Eurymorion* sp. and in *Sphecozone*, sp. parasitized by *E. unilabiana* in the laboratory
312 probably also occurs in the field. We observed eight cocoon webs in the field and three of them
313 were mixed with remnants of normal webs, suggesting that the abandonment behavior of
314 normal webs next to the cocoon web may be common in the natural habitat of these two spiders.
315 This behavior was also observed in the interaction between *Z. solanoi* and its hosts *A. studiosus*
316 and *A. octavius* (Eberhard 2010b) and in the study involving the wasp *Zatypota* sp. with its
317 host *Anelosimus eximius* (Keyserling, 1884) (Fernandez-Fournier et al. 2019). These spiders
318 and the ones in the present study are not known whether to recycle their webs very often or
319 abandon them to build new ones from scratch, as many orb-weaving spiders do (Eberhard 1971,
320 2010b; Janetos 1982; Fernandez - Fournier et al. 2019). Thus, this suggests the existence of
321 other host spider behaviors than web-building behavior that may be being exploited by
322 polysphinctine wasps to ensure greater chances of survival of their pupae in addition to the web-
323 building behavior (Fernandez - Fournier et al. 2019). However, further studies are needed to
324 assess this hypothesis.

325 Incomplete cocoon webs and webs which showed similarities with normal webs may
326 represent “failure” of larvae to induce more complete behavioral changes in their hosts which
327 promote more efficient protection of pupae against natural enemies. These possible failures
328 were also observed in other interactions (Eberhard 2001; 2013; Korenko & Pekar 2011;
329 Takasuka et al. 2017; Kloss dados não publicados). In some cases, these possible failures were
330 accompanied by the construction of cocoons in the structures below the

331 sheet of these webs. Thus, experimental field studies will be needed to estimate the benefits of
332 cocoon webs for pupae protection in this system and to determine whether the survival of pupae
333 which have cocoons built in the cocoon web sheet is the same when the cocoon is built below
334 the cocoon web sheet.

335

336 **ACKNOWLEDGEMENTS**

337

338 This work was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
339 – Brasil (CAPES) – process number 88887.494788/2020-00 (Luis Campili Pereira) and process
340 number 88887.597583/2021-00 (G.A. Villanueva-Bonilla). We
341 would also like to thank the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Hymenoptera
342 Parasitoides da Região Sudeste Brasileira (HYMPAR/Sudeste – CNPq/FAPESP/CAPES),
343 FUNCAP-BPI proc -BP3-00139- 00186.01.00/18 (J. F. Sobczak). We thank Mr. Francisco
344 Bonaldo Nogueira Braga for accessing the study area, Diego G. Pádua and Antonio D.
345 Brescovit for identifying wasps and spiders, respectively.

346

347 **REFERENCES**

348

349 Araújo FS, Gomes VS, Lima-Verde LW et al. (2007) Efeito da variação topoclimática na
350 composição e riqueza da flora fanerogâmica da serra de Baturité, Ceará. In: Oliveira TS, Araújo
351 FS (eds) Diversidade e conservação da biota na serra de Baturité, Ceará, pp140–162. Edições
352 UFC, Fortaleza, CE.

353 Benjamin SP, Zschokke S (2004) Homology, behaviour and spider webs: web construction
354 behaviour of *Linyphia hortensis* and *L. triangularis* (Araneae: Linyphiidae)
355 and its evolutionary significance. *Journal of Evolutionary Biology* 17, 120–130.

356 Blackwall J (1843) I.—Account of a Species of *Ichneumon* whose Larva is parasitic on Spiders.
357 *Journal of Natural History* 11, 1–4.

358 Eberhard WG (1971) The ecology of the web of *Uloborus diversus* (Araneae:

- 359 Uloboridae). *Oecologia*, 6, 328–342.
- 360 Eberhard WG (1976) Photography of orb webs in the field. *Bulletin of the British*
361 *Arachnological Society* 3, 200–204.
- 362 Eberhard WG (2000a) Spider manipulation by a wasp larva. *Nature* 406, 255–256.
- 363 Eberhard WG (2000b) The natural history and behavior of *Hymenoepimecis argyraphaga*
364 (Hymenoptera: Ichneumonidae) a parasitoid of *Plesiometa argyra* (Araneae: Tetragnathidae).
365 *Journal of Hymenoptera Research* 9, 220–240.
- 366 Eberhard WG (2001) Under the influence: webs and building behavior of *Plesiometa argyra*
367 (Araneae: Tetragnathidae) when parasitized by *Hymenoepimecis argyraphaga*
368 (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Arachnology* 29, 354–366.
- 369 Eberhard WG (2010a) Recovery of spiders from the effects of parasitic wasps: implications for
370 fine-tuned mechanisms of manipulation. *Animal Behaviour* 79, 375–383.
- 371 Eberhard WG (2010b) New types of behavioral manipulation of host spiders by a parasitoid
372 wasp. *Psyche* 2010 Article ID950614. <https://doi.org/10.1155/2010/950614>
- 373 Eberhard WG (2013) The Polysphinctine wasps *Acrotaphus tibialis*, *Eruga ca.*
374 *gutfreundi*, and *Hymenoepimecis tedfordi* (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) induce
375 their host spiders to build modified webs. *Annals of the Entomological Society of America* 106,
376 652–660.
- 377 Eberhard WG, Gonzaga MO (2019) Evidence that Polysphincta-group wasps (Hymenoptera:
378 Ichneumonidae) use ecdysteroids to manipulate the web-construction behaviour of their spider
379 hosts. *Biological Journal of the Linnean Society* 127, 429–471.
- 380 Fernandez-Fournier P, Straus S, Sharpe R, Avilés L (2019) Behavioural modification of a
381 social spider by a parasitoid wasp. *Ecological Entomology* 44, 157–162.
- 382 Fitton MG, Shaw MR, Austin AD (1987) The Hymenoptera associated with spiders in
383 Europe. *Zoological Journal of the Linnean Society* 90, 65–93.
- 384 Fitton MG, Shaw MR, Gauld ID (1988) Pimpline ichneumon-flies. *Hymenoptera*,
385 *Ichneumonidae (Pimplinae)* 7, 1–110.

- 386 Gauld ID, Wahl DB, Broad GR (2002) The suprageneric groups of the Pimplinae
387 (Hymenoptera: Ichneumonidae): a cladistic re-evaluation and evolutionary biological study.
388 Zoological Journal of the Linnean Society 136, 421–485.
- 389 Gauld ID, Dubois J (2006) Phylogeny of the Polysphincta group of genera
390 (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae): a taxonomic revision of spider ectoparasitoids.
391 Systematic Entomology 31, 529–564.
- 392 Gonzaga MO, Sobczak JF (2007) Parasitoid-induced mortality of *Araneus omnicolor* (Araneae,
393 Araneidae) by *Hymenoepimecis* sp. (Hymenoptera, Ichneumonidae) in southeastern Brazil.
394 Naturwissenschaften 94, 223–227.
- 395 Gonzaga MO, & Sobczak JF (2011) Behavioral manipulation of the orb-weaver spider
396 *Argiope argentata* (Araneae: Araneidae) by *Acrotaphus chedelae* (Hymenoptera:
397 Ichneumonidae). Entomological Science 14, 220–223.
- 398 Gonzaga MO, Sobczak JF, Pentead-Dias AM, Eberhard WG (2010) Modification of *Nephila*
399 *clavipes* (Araneae: Nephilidae) webs induced by the parasitoids *Hymenoepimecis bicolor* and
400 *H. robertsae* (Hymenoptera Ichneumonidae). Ethology Ecology & Evolution
401 22, 151–165.
- 402 Gonzaga MO, Moura RR, Pêgo PT, Bang DL, Meira FA (2015) Changes to web architecture
403 of *Leucauge volupis* (Araneae: Tetragnathidae) induced by the parasitoid *Hymenoepimecis*
404 *jordanensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Behaviour 152, 181–193.
- 405 Gonzaga MO, Kloss TG, Sobczak JF (2017) Host behavioural manipulation of spiders by
406 ichneumonid wasps. In: Viera C, Gonzaga MO (eds) Behaviour and ecology of spiders:
407 contributions from the neotropical region, pp 417–437. Springer, Cham, Switzerland.
- 408 Janetos AC (1982) Foraging tactics of two guilds of web-spinning spiders. Behavioral Ecology
409 and Sociobiology 10, 19–27.
- 410 Kloss TG, Gonzaga MO, Roxinol JAM, Sperber CF (2016) Host behavioural manipulation of
411 two orb-weaver spiders by parasitoid wasps. Animal Behaviour 111, 289–296.

- 412 Kloss TG, Gonzaga MO, de Oliveira LL, Sperber CF (2017) Proximate mechanism of
413 behavioral manipulation of an orb-weaver spider host by a parasitoid wasp. *PloS one* 12,
414 e0171336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171336>
- 415 Korenko S (2016) Web architecture alteration of the orb web weaving spider *Metellina*
416 *merianae* (Araneae, Tetragnathidae) induced by the parasitoid *Megaetaira madida*
417 (Ichneumonidae, Polysphincta group). *Arachnologische Mitteilungen* 52, 35–37.
- 418 Korenko S, Pekár S (2011) A parasitoid wasp induces overwintering behaviour in its spider
419 host. *PLOS one* 6, e24628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024628>.
- 420 Korenko S, Isaia M, Satrapova J, Pekar S (2014) Parasitoid genus-specific manipulation of orb-
421 web host spiders (Araneae, Araneidae). *Ecological Entomology* 39, 30–38.
- 422 Korenko S, Spasojevic T, Pekár S et al. (2018) One generalist or several specialist
423 species? Wide host range and diverse manipulations of the hosts' web-building behaviour in
424 the true spider parasitoid *Zatypota kauros* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Insect Conservation*
425 *and Diversity* 11, 587–599.
- 426 Lefèvre T, Lebarbenchon C, Gauthier-Clerc M, Missé D, Poulin R, Thomas F (2009) The
427 ecological significance of manipulative parasites. *Trends in ecology & evolution*, 24, 41–48.
- 428 Manuel RL (1974) The biology of *Frontinella pyramitela* (Walckenaer, 1841) (Arachnida:
429 Linyphiidae) with special reference to predation. M.Sc. thesis, Department of Entomology,
430 University of Montreal, Canada.
- 431 Matsumoto R (2009) “Veils” against predators: modified web structure of a host spider induced
432 by an ichneumonid parasitoid, *Brachyzapus nikkoensis* (Uchida)(Hymenoptera). *Journal of*
433 *Insect Behavior* 22, 39–48.
- 434 Matsumoto R (2016) Molecular phylogeny and systematics of the Polysphincta group of
435 genera (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae). *Systematic Entomology* 41, 854–864.
- 436 Matsumoto R, Konishi K (2007) Life histories of two ichneumonid parasitoids of *Cyclosa*
437 *octotuberculata* (Araneae): *Reclinervellus tuberculatus* (Uchida) and its new sympatric

- 438 congener (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae). *Entomological Science* 10, 267–278.
- 439 Matsumoto R, Takasuka K (2010) A revision of the genus *Zatypota* Förster of Japan, with
440 descriptions of nine new species and notes on their hosts (Hymenoptera: Ichneumonidae:
441 Pimplinae). *Zootaxa* 2522, 1–43.
- 442 Nielsen E (1923) Contributions to the life history of the Pimpline spider parasites
443 (*Polysphincta*, *Zaglyptus*, *Tromatobia*) (Hym. Ichneum.). *Entomologiske Meddelelser* 14, 137–
444 205.
- 445 Poulin R (1995) “Adaptive” changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review.
446 *International journal for parasitology* 25, 1371–1383.
- 447 Sobczak JF, Loffredo APS, Pentead-Dias AM, Gonzaga MO (2009) Two new species of
448 *Hymenoepimecis* (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae) with notes on their spider
449 hosts and behaviour manipulation. *Journal of Natural History* 43, 2691–2699.
- 450 Sobczak JF, Pádua DG, Costa LF et al. (2018) The parasitoid wasp *Eruga unilabiana* Pádua &
451 Sobczak, sp. nov. (Hymenoptera: Ichneumonidae) induces behavioral modification in its spider
452 host. *Entomological Science* 21, 59–65.
- 453 Takasuka, K, Matsumoto, R, Ohbayashi, N (2009) Oviposition behavior of *Zatypota*
454 *albicoxa* (Hymenoptera, Ichneumonidae), an ectoparasitoid of *Achaearanea tepidariorum*
455 (Araneae, Theridiidae). *Entomological Science* 12, 232–237.
- 456 Takasuka K, Yasui T, Ishigami T et al. (2015) Host manipulation by an ichneumonid
457 spider ectoparasitoid that takes advantage of preprogrammed web-building behaviour for
458 its cocoon protection. *Journal of Experimental Biology* 218, 2326–2332.
- 459 Takasuka K, Korenko S, Kysilková K et al. (2017) Host utilization of koinobiont spider-
460 ectoparasitoids (Ichneumonidae, Ephialtini, *Polysphincta* genus-group) associated with
461 *Cyclosa* spp. (Araneae, Araneidae) across the Palaearctic. *Zoologischer Anzeiger* 267, 8–14.
- 462 Villanueva-Bonilla GA, Faustino ML, Santos WR, Pereira LC, Pádua DG, Sobczak JF

463 (2021) Behavioral manipulation of the “Trashline Orb-weaving spider” *Cyclosa fililineata*
464 (*Araneidae*) by the parasitoid wasp *Zatypota riverai* (*Ichneumonidae: Pimplinae*). *Journal of*
465 *Arachnology* 49,146–150.

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

468 Thomas F, Adamo S, Moore J (2005) Parasitic manipulation: where are we and where should
469 we go?. *Behavioural processes* 68, 185–199.

470 Zschokke S (1996) Early stages of orb web construction in *Araneus diadematus* Clerck. *Revue*
471 *suisse de zoologie* 2, 709–720.

472

473 **SUPPORTING INFORMATION**

474 Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section
475 at the end of the article.

476

477 Figure S1. Incomplete cocoon webs constructed by parasitized individuals of *Eurymorion* sp.

478

479 Figure S2. Webs built by individuals from *Eurymorion* sp. a few hours before being killed by
480 larvae of the 3rd instar of *E. unilabiana* and which are similar to normal webs. A, B and C, D)

481 Webs where the cocoons were built in the space between the two sheets and; E, F and G, H)

482 Webs where the cocoons were built on the main sheet with many depressions. CC, Cocoon;

483 MSh, Main sheet; VT, Vertical threads; Sh.d, sheet depressions.

Tables

Table 1. Average and standard deviation of the sheet area and interception threads length of normal and cocoon web of *Eurymorion* sp. and *Sphecozone* sp. spiders.

Host	Sheet area (Mean \pm SE cm ²)		Interception threads length (Mean \pm SE cm)	
	Normal web	Cocoon web	Normal web	Cocoon web
<i>Eurymorion</i> sp.	33.7 \pm 15.2, N=35	5.0 \pm 2.6 N=12	9.2 \pm 3.2, N=35	1.5 \pm 0.6, N=12
<i>Sphecozone</i> sp.	47.6 \pm 25.9; N=24	13.8 \pm 11.3, N=11	13.1 \pm 6.7, N=24	1.5 \pm 0.6, N=11

Figures

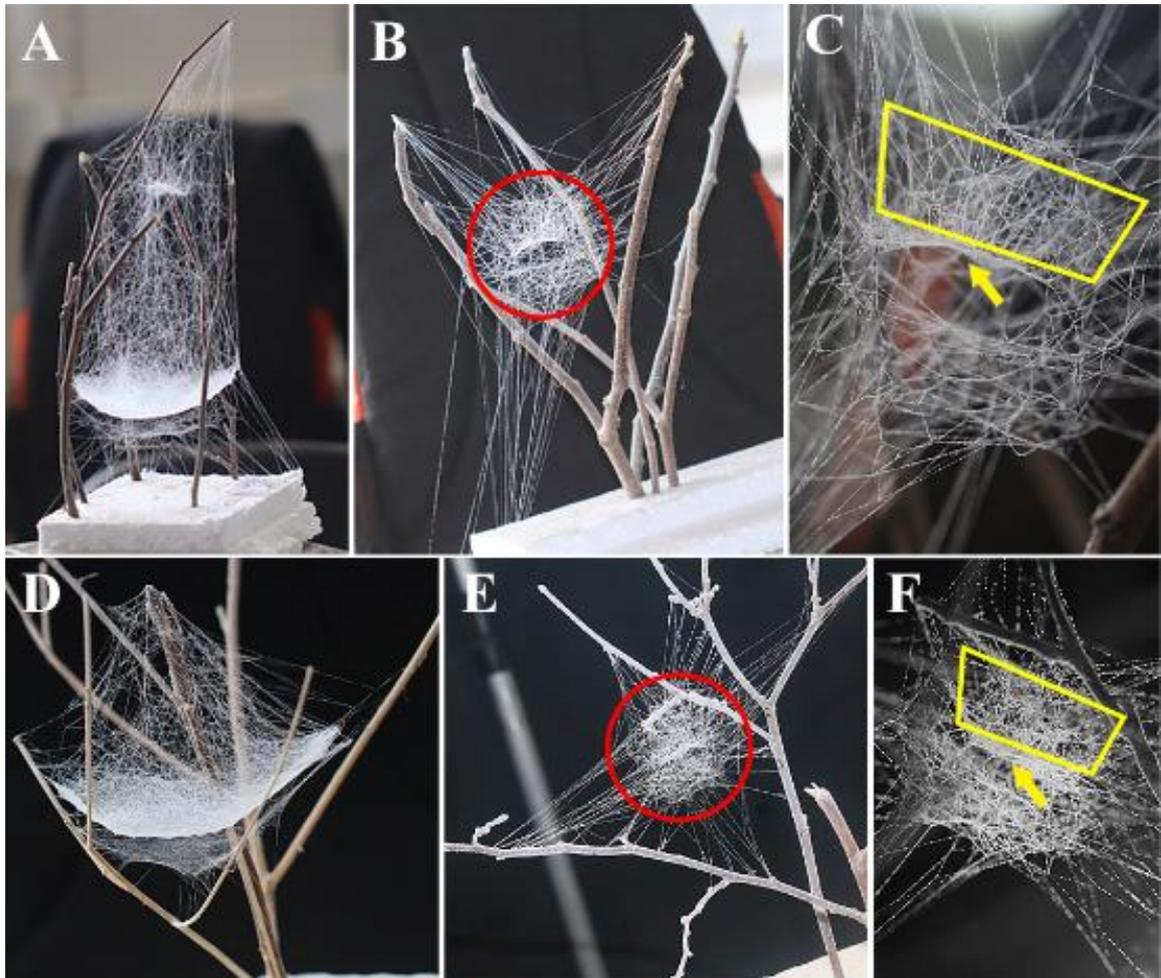


Figure 1. Normal and cocoon webs built in the laboratory by *Sphecozone* sp. and *Eurymorion* sp.. A) Normal web of *Sphecozone* sp.; B) Complete cocoon web of *Sphecozone* sp. with the cupola in a circle; C) Closer view of the cupola of the cocoon web with cocoon sheet (arrow) and vertical threads on top of the sheet (trapezium); ;D) Normal web of *Eurymorion* sp.; E) Complete cocoon web of *Eurymorion* sp. with the cupola in a circle; F) Closer view of the cupola of cocoon web with cocoon sheet (arrow) and vertical threads on top of the sheet (trapezium).

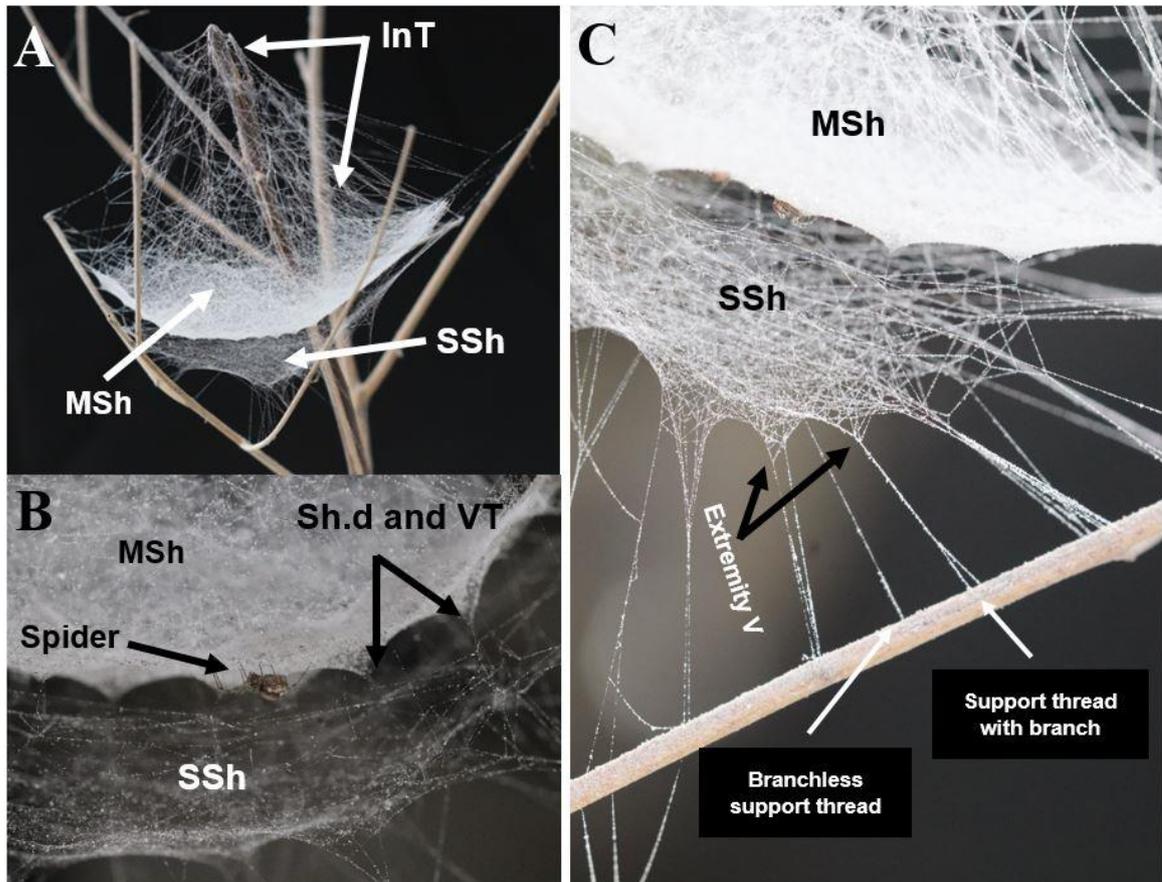


Figure 2. Normal web constructed by a non-parasitized individual from *Eurymorion* sp. in the lab. A) A sheet web complete with its identified structures; B) a sub-adult male of *Eurymorion* sp. on the main sheet with depressions on the surface and vertical threads that connect the two sheets; C) The threads that support the two sheets and how they were fixed to the substrate. MSh, Main sheet; SSh, Secondary sheet; InT, Interception threads; Sh.d, sheet depressions; VT, vertical threads.

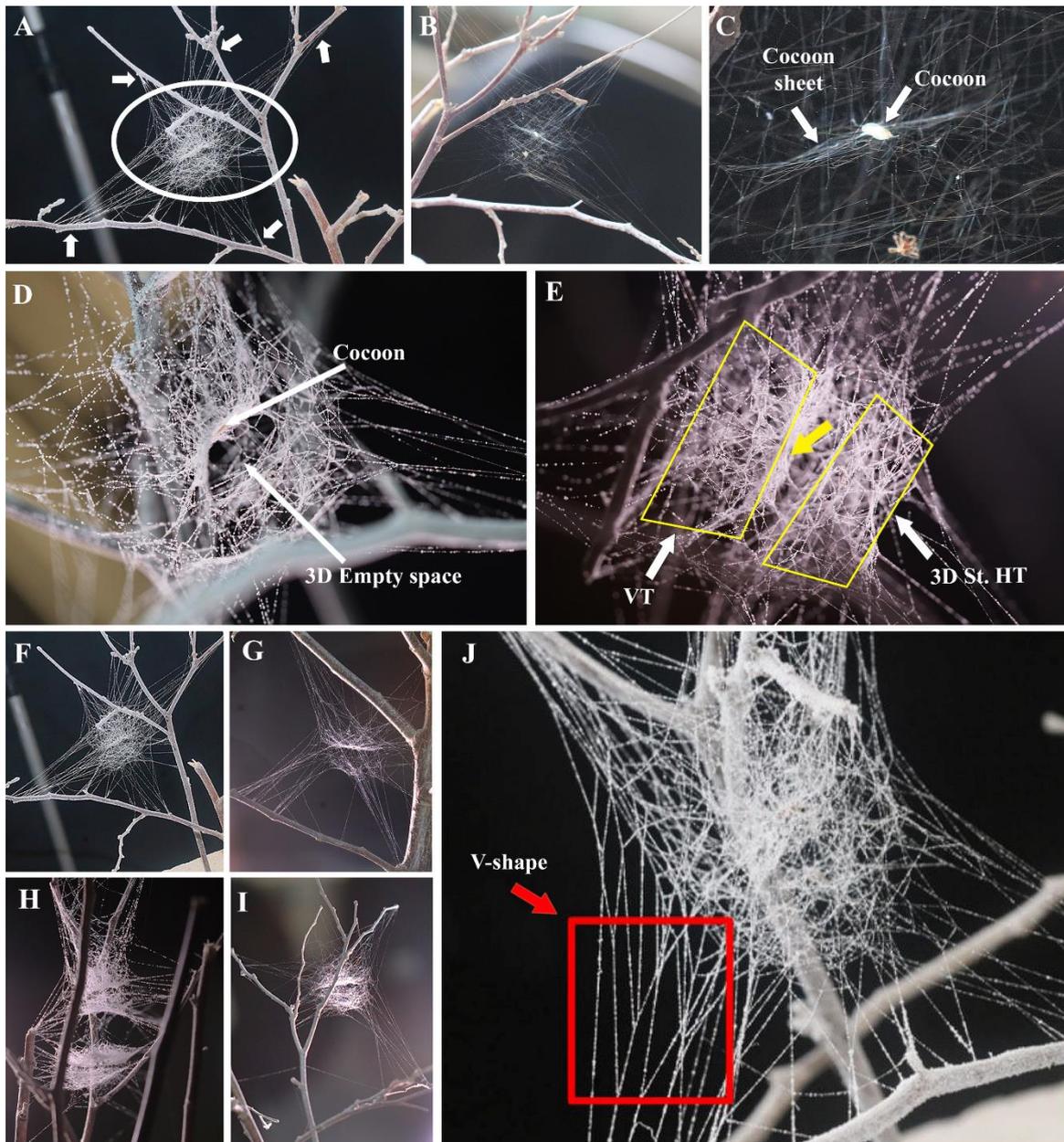


Figure 3. Cocoon webs constructed in the laboratory by individuals of *Eurymorion* sp. a few hours earlier, the night they were killed by the third instar larva of *E. unilabiana*; A) A complete cocoon web with arrows indicating groupings of anchor threads and a circle indicating the cupola in; B) Cocoon web not sprayed with water or cornstarch; C) Closer view of the cupola with the cocoon and cocoon sheet indicated; D) Three-dimensional empty space below the cocoon sheet ; E) Vertical threads on top the of the cocoon sheet (top trapezium) and three-dimensional structure below the three-dimensional empty space (bottom trapezium). F-H) Four examples of complete cocoon webs and the X or star pattern of the clusters of anchor threads; J) Closer view of the end of the anchor threads connected to the cupola and its V-shape. VT, Vertical threads; AT, Anchor threads; St. HT, Structure with horizontal threads.

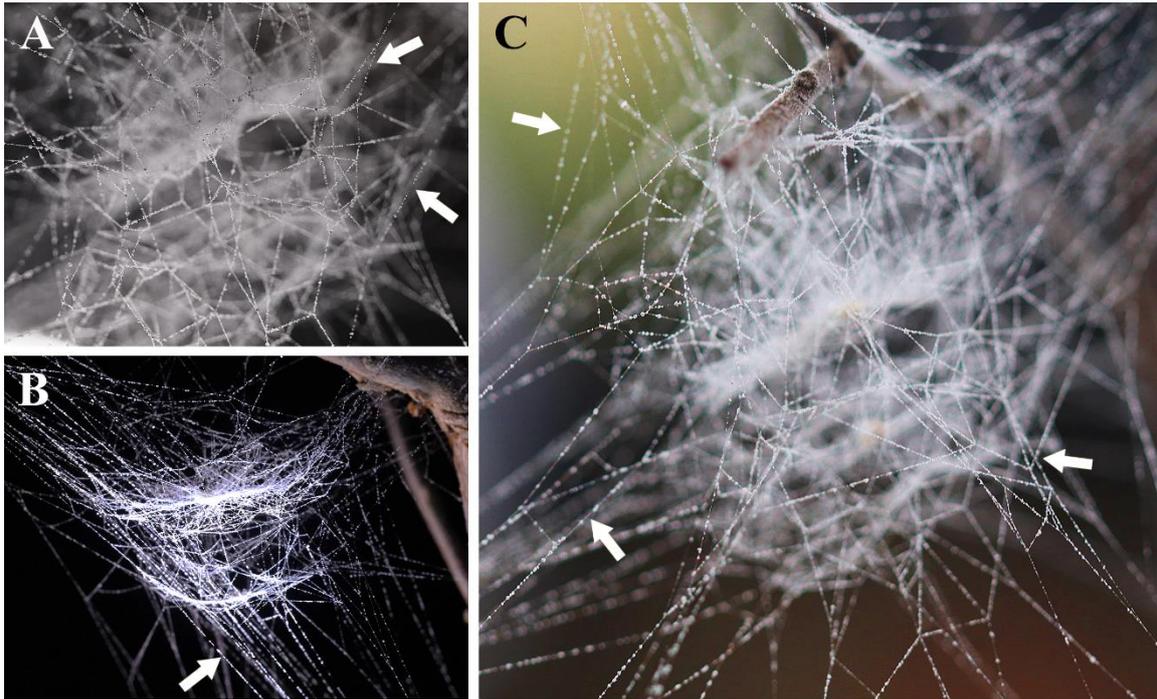


Figure 4. Cocoon webs of *Eurymorion* sp. with barriers on the sides formed by anchor threads (arrows).

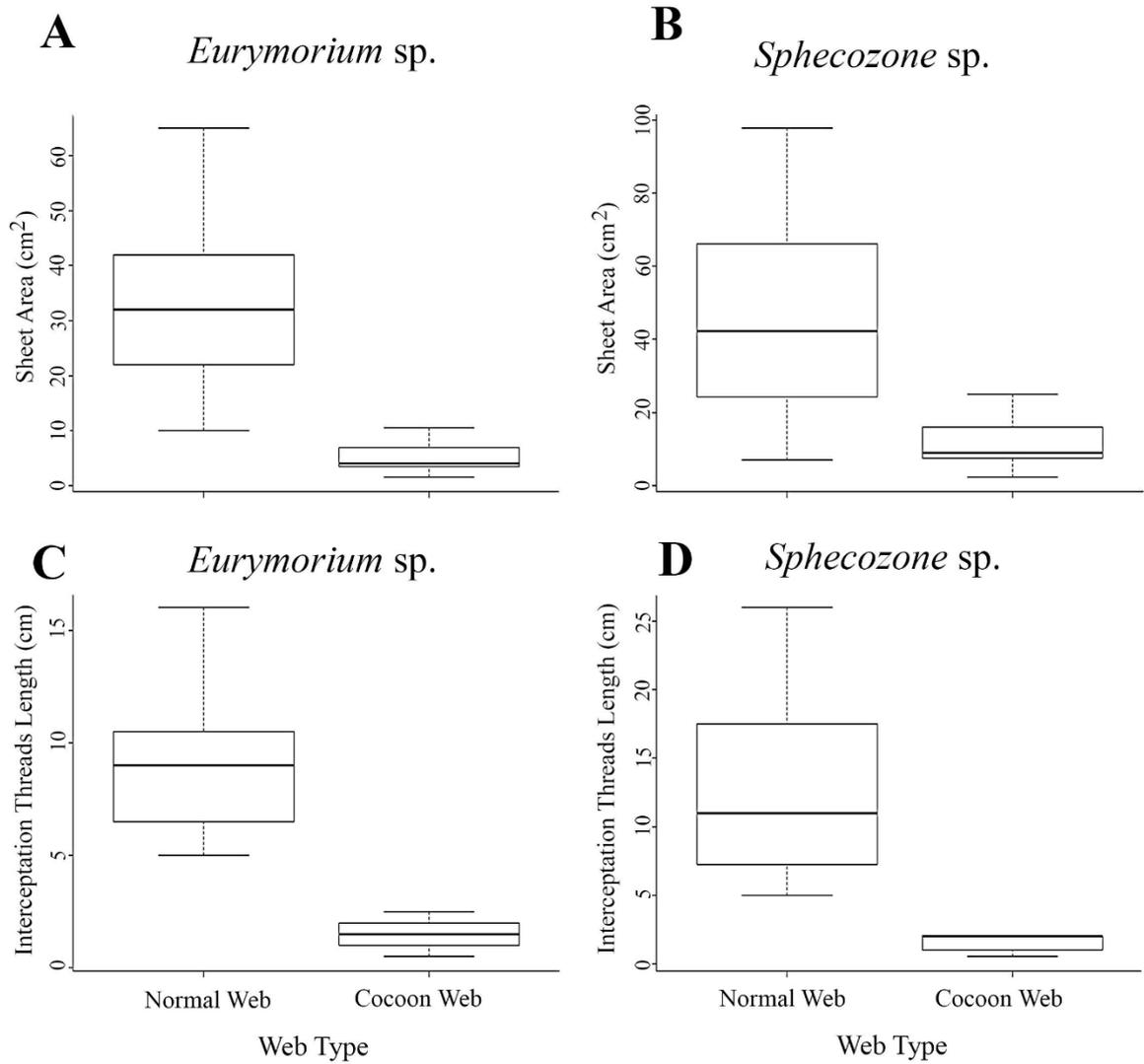


Figure 5. Comparisons between structures of normal and cocoon web of *Eurymorium sp.* and *Sphecozone sp.*. A, B) Main sheet area of normal and cocoon webs and; C, D) Length of interception threads of normal webs and vertical threads on top of the cocoon sheet.

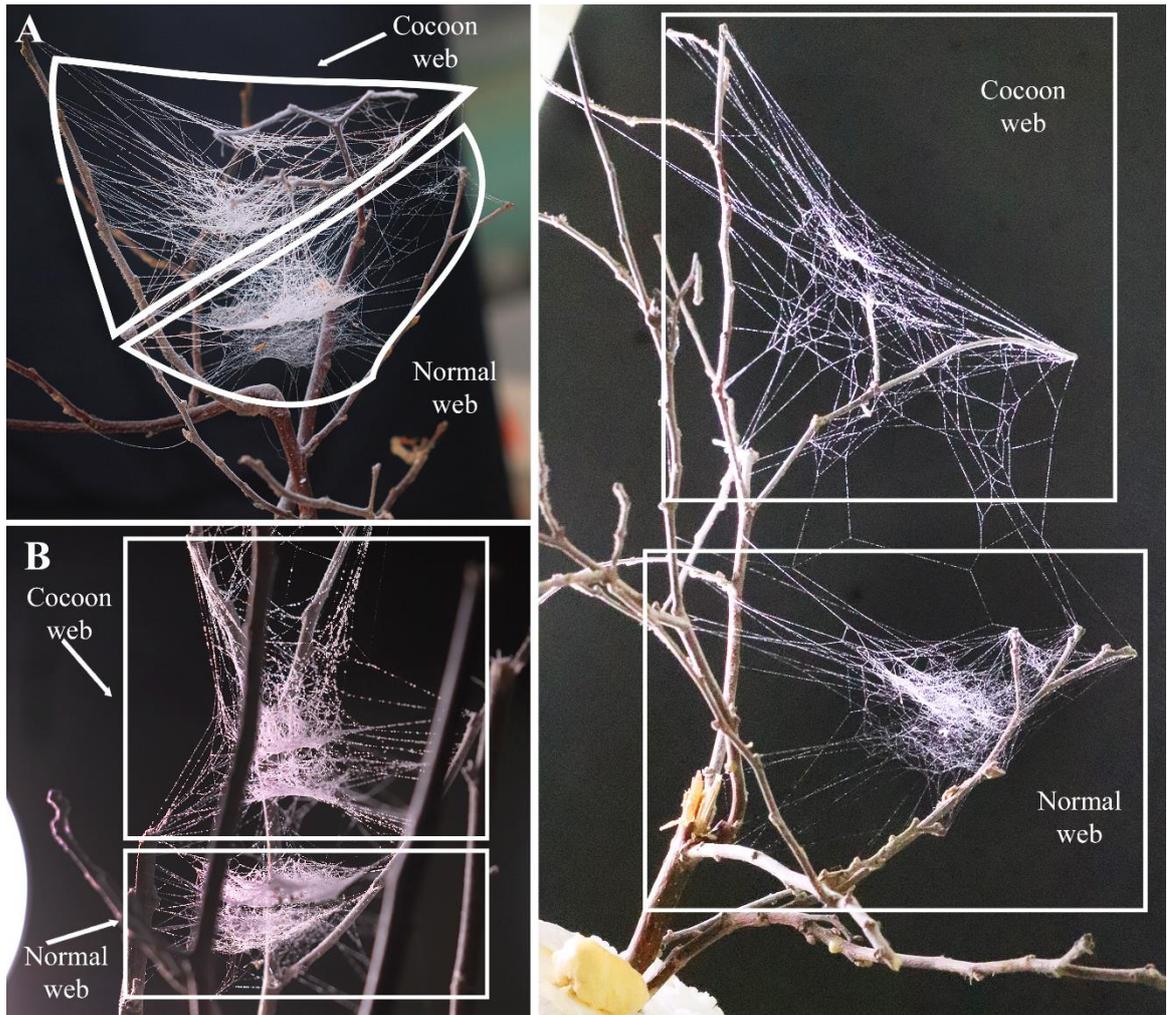


Figure 6. Cocoon webs of *Eurymorion* sp. built on top of or next to normal webs abandoned a few hours from being killed by larvae of the third instar of *E. unilabiana*.

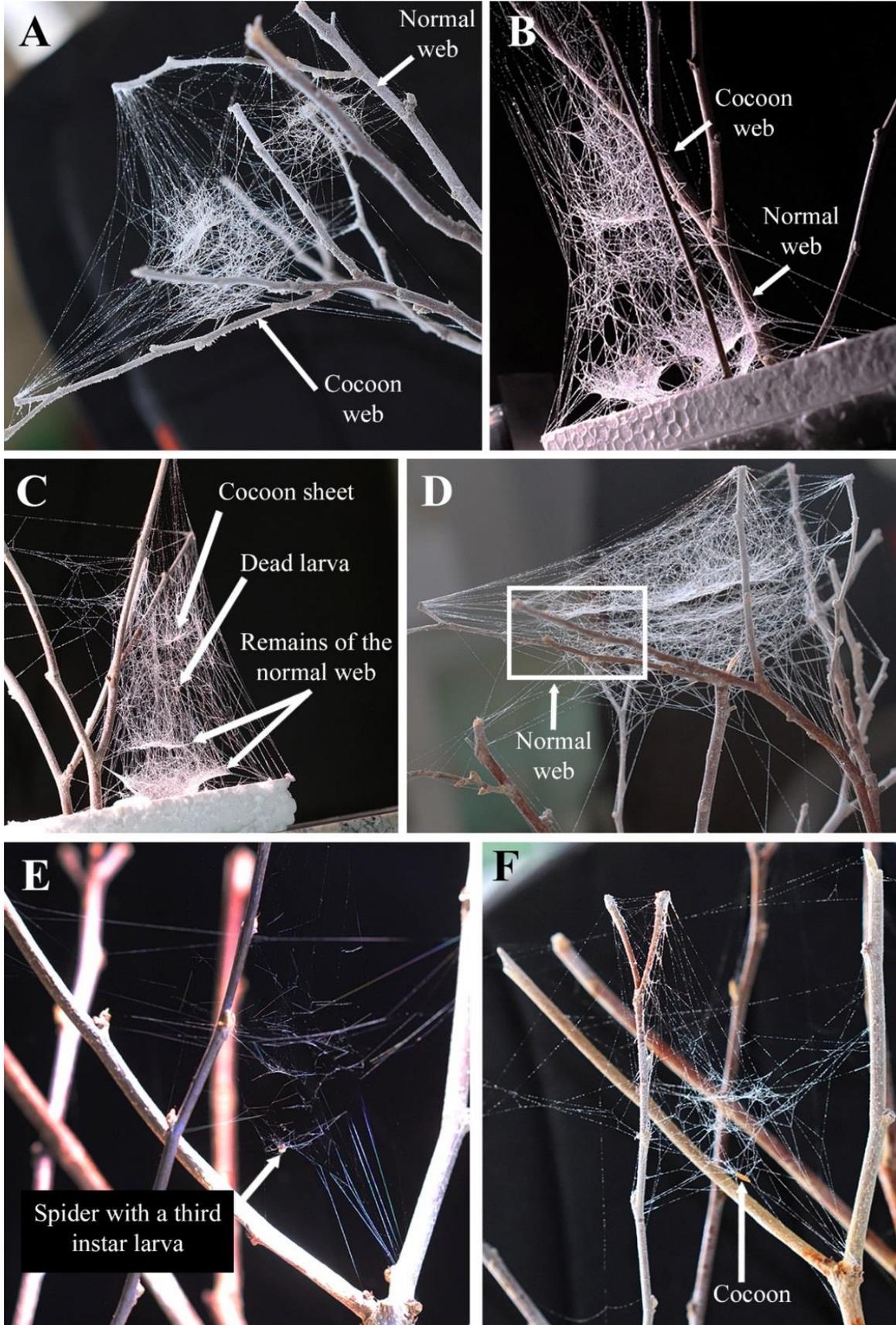


Figure 7. A–D) Cocoon webs of *Sphecozone* sp. built alongside or mixed with remnants of previously constructed normal webs and; E, F) Incomplete cocoon web built by one of the individuals of *Sphecozone* sp. which was found building cocoon webs during the day in the laboratory.

SUPPORTING INFORMATION

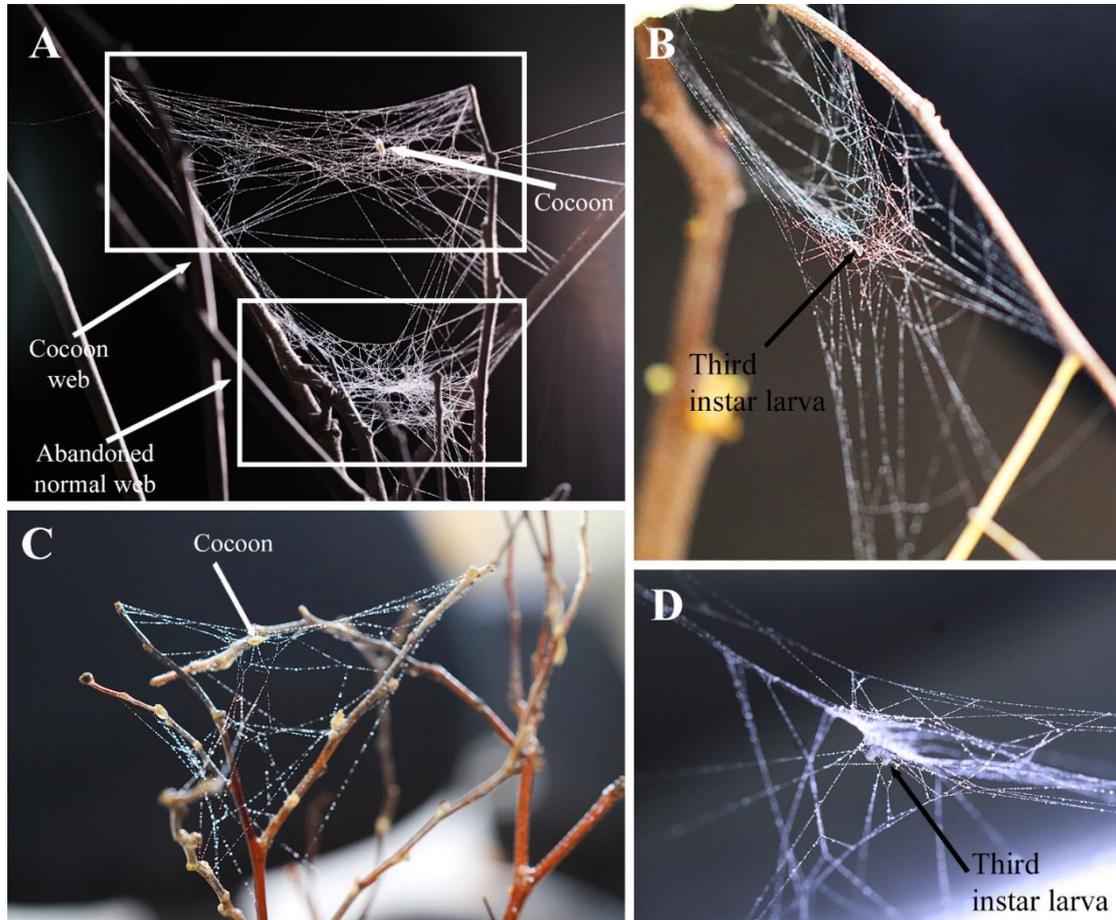


Figure S1. Incomplete cocoon webs constructed by parasitized individuals of *Eurymorion* sp.

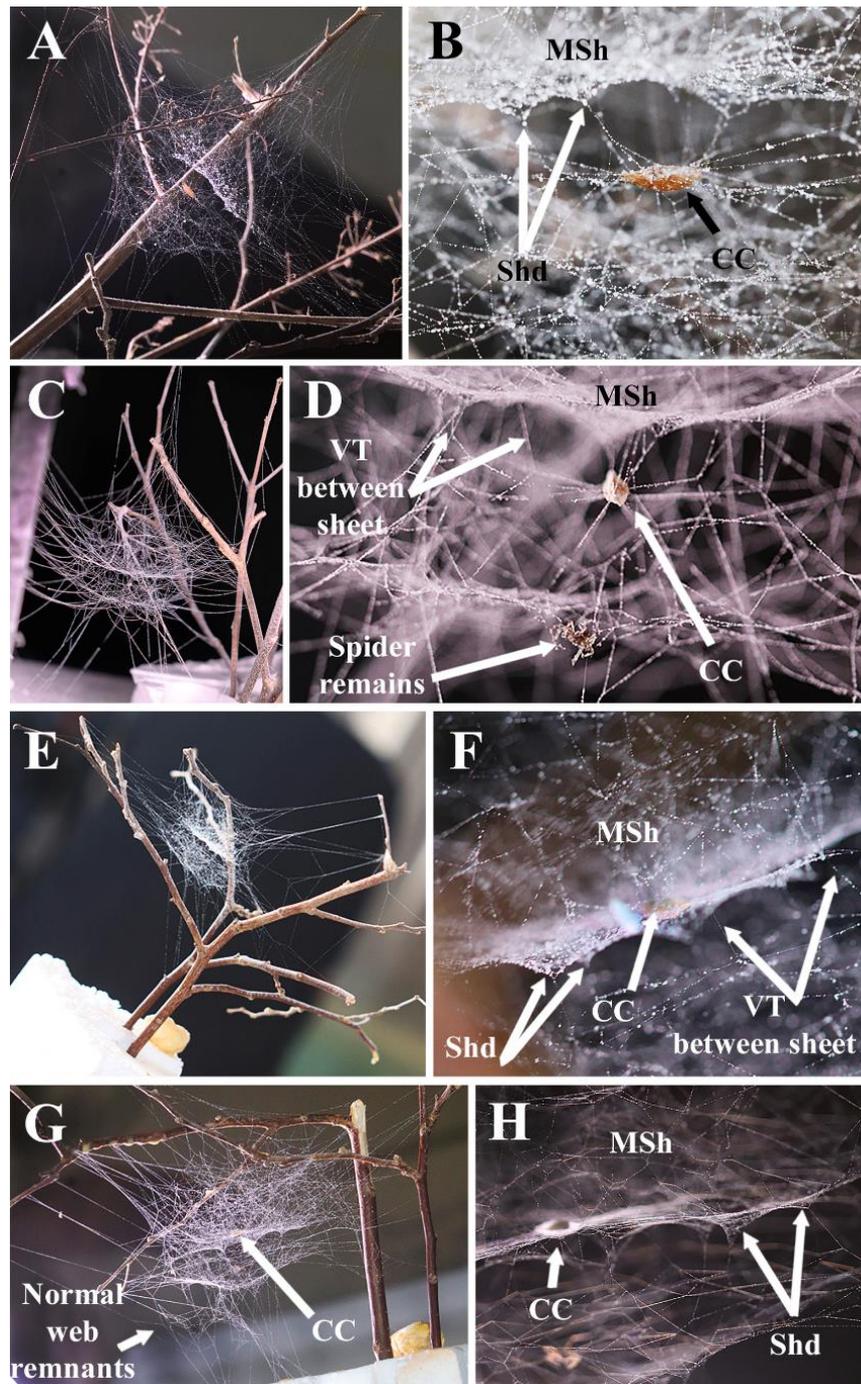


Figure S2. Webs built by individuals from *Eurymorion* sp. a few hours before being killed by larvae of the 3rd instar of *E. unilabiana* and which are similar to normal webs. A, B and C, D) Webs where the cocoons were built in the space between the two sheets and; E, F and G, H) Webs where the cocoons were built on the main sheet with many depressions. CC, Cocoon; MSh, Main sheet; VT, Vertical threads; Sh.d, sheet depressions.

3 CAPITULO 2

**HISTÓRIA NATURAL E COMPORTAMENTO DOS ESTÁGIOS IMATUROS DA
Eruga unilabiana PÁDUA & SOBCZAK, 2018 (HYMENOPTERA:
ICHNEUMONIDAE): PARASITOIDE DE *Sphecozone* sp. E DE *Eurymorion* sp.
(LINYPHIIDAE)**

***Capítulo formatado de acordo com normas da UFC**

RESUMO

As vespas do grupo de gêneros *Polysphincta* (“polysphinctines”) são atualmente as únicas vespas da subfamília Pimplinae (Ichneumonidae) conhecidas como ectoparasitóides cenobiontes solitárias de aranhas. Muitas adaptações morfológicas e comportamentais foram desenvolvidas por estas vespas para explorar diversos atributos das aranhas hospedeiras e assim garantir recursos e proteção para os seus estágios imaturos durante a fase desenvolvimento no corpo e fora do corpo das aranhas. O gênero *Eruga* é um dos gêneros dos polysphinctines, mas com pouco conhecimento da biologia e comportamento dos estágios das espécies conhecidas. Neste estudo, foram descritos o comportamento, a morfologia, o desenvolvimento dos estágios imaturos e outros aspectos da história natural da *Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, 2018 (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae), parasitoide *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp. (Araneae: Linyphidae) no nordeste de Brasil. O ovo é uma massa branca cilíndrica que é geralmente posicionada transversalmente na porção anterior do abdômen da aranha. As larvas do primeiro instar eclodem do ovo três dias depois de serem depositadas no abdômen da aranha e não apresentam segmentação no corpo nem estruturas que aparecem nos estágios posteriores. As larvas do segundo instar apresentam segmentação no corpo e induzem às aranhas a construir uma teia modificada para proteção de pupas. As larvas do terceiro instar apresentam oito pares de tubérculos dorsais retráteis com ganchos minúsculos, dois pares de protuberâncias ventrais e, antes de matarem e descartarem os restos das aranhas, invertem o posicionamento das aranhas no lençol da teia para poderem construir o casulo neste lençol. O casulo é construído no centro do lençol da teia modificada e a seda usada para formação do revestimento externo do casulo é produzida no segmento anal. A vespa adulta eclode em média 10 dias após o início da fase de pupa com liberação do mecônio. A frequência de parasitismo na população de *Sphecozone* sp. e de *Eurymorion* sp. é baixa e foi maior em indivíduos do tamanho intermediário e do sexo feminino de ambos espécimes de aranhas. Com estes resultados, descobrimos que os estágios imaturos da *E. unilabiana* apresentaram não só as mesmas características morfológicas e comportamentais básicas já conhecidas para espécies dentro do grupo *Polysphincta*, mas também outras novas ajustadas a ecologia e comportamentos das duas aranhas hospedeiras. A produção da seda no segmento anal para construção do casulo é também o primeiro registro em vespas Ichneumonidae.

Palavras-chave: aranhas; ephialtini; grupo de gêneros *Polysphincta*; pimplinae; maciço de Baturité; mata atlântica; vespas-de-Darwin.

ABSTRACTS

Wasps of the *Polysphincta* genus group (“polysphinctines”) are currently the only wasps of the Pimplinae subfamily (Ichneumonidae) known as solitary ectoparasitoids of spider cenobionts. Many morphological and behavioral adaptations were developed by these wasps to exploit several attributes of host spiders and thus ensure resources and protection for their immature stages during the in-body and out-of-body developmental phase of the spiders. The genus *Eruga* is one of the polysphinctines genera, but with little knowledge of the biology and stage behavior of known species. In this study, the behavior, morphology, development of immature stages and other aspects of the natural history of *Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, 2018 (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae), parasitoid of *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp. (Araneae: Linyphidae) in northeastern Brazil. The egg is a white cylindrical mass that is usually positioned across the anterior portion of the spider's abdomen. First-instar larvae hatch from the egg three days after being deposited in the spider's abdomen and do not have segmentation in the body or structures that appear in later stages. Second instar larvae present segmentation in the body and induce spiders to build a modified web to pupae protection. Third-instar larvae have eight pairs of retractable dorsal tubercles with tiny hooks, two pairs of ventral protuberances and, before killing and discarding the spider's remains, they invert the spider's position on the web sheet in order to build the cocoon on this sheet. The cocoon is constructed in the center of the modified web sheet and the silk used to form the cocoon's outer lining is produced in the anal segment. The adult wasp hatch on average 10 days after the beginning of the pupae stage with release of meconium. The frequency of parasitism in the population of *Sphecozone* sp. and *Eurymorion* sp., is low and was higher in intermediate size and female individuals of both spider species. With these results, we found that the immature stages of *E. unilabiana* present not only the same basic morphological and behavioral characteristics already known for species within the *Polysphinctas* group, but also new ones adjusted to the ecology and behavior of the two hosts spiders. The production of silk in the anal segment for the construction of the cocoon is also the first recorded in Ichneumonidae wasps.

Keywords: atlantic forest; darwin's wasps; ephialtini; massif de Baturité; pimplinae; *polysphincta* genera-group; spiders.

3.1 INTRODUÇÃO

As vespas do grupo de gêneros *Polysphincta* (sensu Gauld & Dubois 2006; “polysphinctines” de agora em diante) são atualmente as únicas vespas da subfamília Pimplinae (Hymenoptera: Ichneumonidae) conhecidas como ectoparasitóides cenobiontes solitárias de aranhas (FITTON et al., 1987,1988). Composto por 25 gêneros e aproximadamente 254 espécies descritas (GAULD; DUBOIS, 2006; MATSUMOTO, 2016; EBERHARD; GONZAGA, 2019; YU, 2021), as vespas deste grupo estão associadas a várias famílias de aranhas em todo mundo e, a história natural básica conhecida, começa com uma vespa fêmea atacando a aranha em sua teia ou refúgio para oviposição (EBERHARD, 2019; GONZAGA; SOBCZAK, 2007; KLOSS et al., 2016). Assim que a vespa consegue injetar o veneno no corpo da aranha (geralmente no cefalotórax) com ovipositor e paralisa-la temporariamente, ela inspeciona o corpo da aranha para matar ou remover qualquer ovo ou larva que tinha sido previamente depositada por outra vespa e, depois deposita um único ovo no abdômen ou cefalotórax da aranha (MATSUMOTO, 2009; TAKASUKA et al., 2009). Depois esse ovo eclode em larva, que se desenvolve consumindo a hemolinfa da aranha até a morte (EBERHARD, 2000b, WENG; BARRANTES, 2007). Momentos antes matarem a aranha e entrarem na fase de pupa, as larvas de penúltimo instar de algumas espécies induzem as suas aranhas hospedeiras a construírem uma teia modificada para suportar e proteger a pupa da vespa em seu casulo contra predadores e fatores abióticos como chuva e ventos (EBERHARD, 2000a, 2001, 2010; WENG; BARRANTES, 2007; MATSUMOTO, 2009; TAKASUKA et al., 2015; KLOSS et al., 2016; SOBCZAK et al., 2018; BARRANTES et al., 2019).

Do ataque a aranha em sua teia à construção do casulo na teia construída pela aranha, muitas adaptações morfológicas e comportamentais foram desenvolvidas por polysphinctines para explorar diversos atributos das aranhas hospedeiras e assim garantir recursos e proteção para os seus estágios imaturos durante a fase desenvolvimento no corpo e fora do corpo das aranhas (NIELSEN, 1923, 1935; EBERHARD, 2000b; GAULD; DUBOIS, 2006; MATSUMOTO, 2009, 2016; SOBCZAK, 2013; TAKASUKA et al., 2018). Uma destas adaptações é a manipulação comportamental das aranhas para garantir a proteção de suas pupas (MATSUMOTO, 2009; GONZAGA et al., 2010; KLOSS et al., 2016). Em alguns trabalhos que descreveram a morfologia e comportamento larval de algumas espécies do grupo, também foram descobertos que os estágios imaturos de vespas polysphinctines enfrentam riscos de serem removidos, mortos ou comidos pelas próprias aranhas hospedeiras que os abrigam e

também de serem atacados por diversos inimigos naturais quando estão fora do corpo das aranhas (NIELSEN, 1923, 1935; FINCKE et al., 1990; EBERHARD, 2000b, 2019; WENG; BARRANTES, 2007; MATSUMOTO; KONISHI, 2007; MATSUMOTO, 2009; SOBCZAK, 2013; FRITZÉN, 2014). Assim, para que consigam desenvolver o parasitismo com sucesso, eles exibem diversos comportamentos e estruturas específicas nos diferentes estágios larvais que lhes ajudam a escapar destes perigos (NIELSEN, 1923, 1935; FINCKE et al., 1990; EBERHARD, 2000b, 2019; WENG; BARRANTES, 2007; MATSUMOTO; KONISHI, 2007; MATSUMOTO, 2009; SOBCZAK, 2013).

Também alguns estudos vêm documentando casos de uma alta incidência de parasitismo de vespas polysphinctines num tamanho específico das aranhas hospedeiras em comparação com outros disponíveis, apesar dos polysphinctines serem parasitoides que deixam seus hospedeiros alimentarem e crescerem depois da oviposição (FINCKE et al., 1990; GONZAGA; SOBCZAK, 2007; KORENKO et al., 2011; GONZAGA et al., 2015). Deste modo, foi considerado a hipótese dos polysphinctines avaliarem o tamanho das aranhas antes da oviposição para poderem selecionar aquelas estão em condições oferecerem recursos suficientes para progênie ao mesmo tempo que oferecem menos riscos e dificuldades no momento do ataque e imobilização (FINCKE et al., 1990; GONZAGA; SOBCZAK, 2007; KORENKO et al., 2011; GONZAGA et al., 2015).

O gênero *Eruga* Towns, 1960 é um dos 25 gêneros do grupo polysphinctines, com 15 espécies descritas e que ocorrem no Neotrópico, Afrotrópico e Neártico (YU et al., 2012; SOBCZAK et al., 2018). Atualmente, apenas duas famílias de aranhas foram registradas desenvolvendo associação com espécies deste gênero, aranhas da família Linyphiidae e Tetragnathidae (MANUEL, 1974; GAULD; DUBOIS, 2006; EBERHARD, 2013; BARRANTES et al., 2017; SOBCZAK et al., 2018). No entanto, a biologia e o comportamento dos estágios imaturos das larvas das espécies dentro do gênero são pouco conhecidos. A informação mais consistente que se tem, é o formato do casulo do gênero que é fusiforme e quadrático na seção transversal, com quatro nervuras, construída na horizontal e presa entre fios da teia construída pela hospedeira, por vezes uma teia modificada (GAULD; DUBOIS, 2006; EBERHARD, 2013; BARRANTES et al., 2017; SOBCZAK et al., 2018).

Neste estudo, descrevemos a morfologia, comportamento e desenvolvimento dos estágios imaturos da vespa *Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, 2018 (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimpliinae), parasitoide de *Sphecozone* sp. e de *Eurymorion* sp. (Linyphiidae)

no nordeste do Brasil (SOBCZAK et al., 2018; capítulo 1). Também investigamos a frequência de parasitismo de *E. unilabiana* na população de *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp. e avaliamos a possível seleção do tamanho do hospedeiro no momento de oviposição. Adicionalmente, relatamos o ataque de uma fêmea adulta de *E. unilabiana* num indivíduo de *Eurymorion* sp. registrada no campo.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Área de estudo

Realizamos o estudo de campo numa floresta tropical semidecídua, localizada no município de Mulungu, Ceará, Brasil (04°19' 26.3" S, 38°56' 18.0" W, altitude de 840 m). A área faz parte de uma área de proteção ambiental - APA da Serra de Baturité, que se destaca por ser uma ilha de florestas úmidas e subúmidas no meio de um ambiente de clima semiárido e com médias anuais de temperatura e precipitação em torno de 20,8 °C e 1221.86 mm, respectivamente (ARAÚJO et al., 2007; SEMACE, 2010).

3.2.2 Táxons de estudo

A vespa *E. unilabiana* foi recentemente descrita ocorrendo em matas úmidas e subúmidas da Serra de Baturité no estado do Ceará-Brasil (Sobczak *et al.* 2018). Ela é parasitoide das aranhas *Sphecozone* sp. (anteriormente identificada como *Dubiaranea* sp., ver SOBCZAK et al., 2018) e de *Eurymorion* sp. e com suas larvas induzindo a essas aranhas a construir teias modificadas com características que potencialmente podem oferecer proteção às suas pupas contra inimigos naturais e fatores abióticos (SOBCZAK et al., 2018; ver capítulo 1).

A *Sphecozone* sp e *Eurymorion* sp. são duas aranhas da família Linyphiidae construtoras de teias de lençol. Aranhas do gênero *Sphecozone* foram registradas ocorrendo apenas no Neotrópico e Neártico (LE MOS, 2018; WORLD SPIDER CATALOG, 2021), enquanto o gênero *Eurymorion* possui somente cinco espécies descritas e restritas ao Neotrópico (RODRIGUES; OTT, 2010; WORLD SPIDER CATALOG, 2021).

3.2.3 Estágios Imaturos

Para descrever a morfologia, o comportamento e o desenvolvimento dos estágios da *E. unilabiana*, realizamos coleta de indivíduos parasitados de *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp. no campo entre agosto de 2020 a janeiro de 2021. Todas aranhas coletadas foram levadas para laboratório de Ecologia e Evolução da Universidade de Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) e colocadas em potes de plástico (80 mL), a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, regime de luz natural e umidade relativa do ar mantida por duas borrifadas diárias de água sobre os potes contendo aranhas. As aranhas foram alimentadas diariamente com moscas (*Drosophila* sp.) e com solução nutritiva de proteínas em pó dissolvidas em água (ZANATA; VASCONCELLOS-NETO, dados não publicados). Fizemos o acompanhamento do desenvolvimento larval diariamente até o surgimento do adulto e, as observações foram realizadas por meio de microscópio estereoscópico. A identificação do estágio de desenvolvimento e a terminologia das estruturas larvais segue Nielsen (1923), Eberhard (2000b) e Quicke (2015). Colocamos algumas aranhas parasitadas para construção de teias em caixa de isopor quadrada (60x60x60 cm) coberta em cima e na frente com tecido tule transparente para observar o comportamento das larvas antes e depois de matar a aranha. Também observamos o comportamento das larvas no corpo das aranhas e do processo de construção de casulo e registramos estes comportamentos com uma câmera digital Canon EOS Rebel SL2, com lente Macro EF 100mm f/2.8 Macro USM. As vespas adultas que emergiram dos casulos foram identificadas em termos de sexo e o comprimento total do corpo foi medido com um paquímetro digital. Usamos a correlação de Pearson para avaliar influência do tamanho do hospedeiro (comprimento de abdômen) no tamanho da vespa adulta (comprimento total do corpo) e comparamos o tamanho do corpo entre vespas fêmeas e machos emergentes usando o teste t, uma vez testada a normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk.

3.2.4 Frequência de parasitismo e seleção do tamanho do hospedeiro

Para avaliar a frequência de parasitismo, inspecionamos com uma lupa de mão (10x) todos os indivíduos de *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp. encontrados ao longo de cinco transectos (1,3 Km no total) demarcados no interior e nas bordas da floresta em dois períodos, (1) de outubro de 2019 a fevereiro de 2020 e (2) de setembro a dezembro de 2020. Para avaliar se as vespas fêmeas selecionam o tamanho do hospedeiro na oviposição, medimos o comprimento de abdômen de todas as aranhas inspecionadas no campo com paquímetro digital,

pois esta variável é positivamente correlacionada com o peso em ambas espécies (*Eurymorion* sp.: teste de correlação de Pearson: $r = 0.774$, $n = 54$, $p < 0.001$ e para *Sphecozone* sp., ver em SOBCZAK et al., 2018) e também porque é uma medida confiável para ser mensurada com um paquímetro em campo. A correlação entre o comprimento de abdômen e o peso em *Eurymorion* sp. foi estimada através dos primeiros 54 indivíduos não parasitados de *Eurymorion* sp. coletados no local de estudo, que foram levados para laboratório. Medimos o comprimento de abdômen das aranhas com um paquímetro digital e, o peso, com uma balança analítica digital. O peso é geralmente usado como índice de biomassa disponível para consumo da larva da vespa (GONZAGA; SOBCZAK, 2007; Gonzaga et al. 2015). Classificamos os indivíduos de duas espécies de aranhas em três classes de tamanho com base na frequência de distribuição do comprimento de abdômen registrado para cada espécie; *Sphecozone* sp.: pequeno (0,01-1,37), intermediário (1,38-2,73) e grande (2,74-4,10); *Eurymorion* sp.: pequeno (0,01-0,87), intermediário (0,88-1,73-) e grande (1,74-2,60). Depois usamos o teste G para comparar a frequência de parasitismo observada e esperada de *E. unilabiana* em três classes de tamanho dos hospedeiros. Também usamos o teste G para comparar a frequência de parasitismo observada e esperada de *E. unilabiana* em indivíduos fêmeas e machos de ambas espécies aranhas. Todas essas análises foram realizadas no software de livre uso R versão 4.0.3 (R Core Team 2020) e definimos o nível de significância em 0,05.

Registramos o comportamento de ataque de uma fêmea adulta de *E. unilabiana* num indivíduo de *Eurymorion* sp. no campo. Outras vespas fêmeas encontradas em teias de *Eurymorion* sp. e de *Sphecozone* sp. foram também observadas e fotografadas com uma câmera digital.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Estágios imaturos

3.3.1.1 Morfologia, comportamento e desenvolvimento

Foram acompanhadas no laboratório o desenvolvimento de 78 estágios imaturos de *E. unilabiana* da qual 43 (55%) resultaram em vespas adultas. O ovo (N=8) é uma massa branca cilíndrica que não possui segmentação e nem estruturas que aparecem nos estágios de desenvolvimento posteriores. Geralmente os ovos são encontrados na porção anterior do

abdômen posicionada transversalmente próximo ao pedicelo, no entanto, algumas foram encontradas na porção central do abdômen, outras na lateral e posicionadas longitudinalmente. Nenhuma foi encontrada na porção posterior do abdômen e não foi percebido nenhuma diferença entre as duas espécies de hospedeiras quanto ao local de deposição de ovos. O ovo depositado na aranha que observamos sendo atacado no campo demorou três dias para se mudar para primeiro instar (TABELA 1) (FIGURA 6A-B).

Foram registrados 10 casos de duplo parasitismo, seis em *Eurymorion* sp. e quatro em *Sphecozone* sp. As larvas iniciais sempre foram encontradas mortas no momento em que as aranhas foram inspecionadas. Nestes casos, as larvas iniciais estavam na porção anterior do abdômen e as segundas na porção mediana ou na lateral. Teve um caso em que a primeira larva morta foi atacada por fungo e mais tarde, os restos desta larva junto com o material do fungo, dificultou a libertação da segunda larva dos restos da aranha. Isso impediu a formação do casulo e acabou levando a morte da larva antes da pupação. Adicionalmente, uma aranha foi encontrada com restos de uma larva morta no cefalotórax e outra viva no abdômen. Não foi possível determinar se houve oviposição no cefalotórax ou se estes restos foram movidos para lá.

A larva do primeiro instar (N= 37) inicia a se diferenciar do ovo quando este começa a apresentar uma membrana branca semitransparente (o corion), e uma massa branca no centro (FIGURA 1A e B). Até começar a se mudar para segundo instar, ela começa a ficar mais alaranjado no centro. Também não possui segmentação, mas já é possível distinguir a extremidade da cabeça, que cresce geralmente em direção a porção posterior do abdômen da aranha e, a extremidade do segmento anal, mantendo-se no lugar onde o ovo foi colocado com a sela, que a mantém aderida no abdômen da aranha. Por vezes, (N= 5) a extremidade da cabeça cresce em direção à lateral do abdômen da aranha, mas no final a larva acaba virando-a para a porção posterior do abdômen. A duração desta fase apresentou uma variação quanto ao tamanho do hospedeiro. Em aranhas de tamanho intermediário e grande das duas espécies, a larva durou no máximo nove dias e, em hospedeiros de tamanho pequeno, sobretudo em aranhas imaturas, durou no máximo 40 dias (TABELA 1). Houve dois casos de larvas encontradas em dois indivíduos imaturos de *Sphecozone* sp. (um com comprimento de abdômen de 0,3 mm e outro com 0,2 mm) que passaram 40 dias no primeiro instar antes de mudar para segundo instar. Depois demoraram 10 dias no segundo instar para de seguida mudar para o terceiro instar, matar aranha e entrar na fase de pupa (FIGURA 2A-C). Houve nascimento de vespas adultas nestes

dois casos, mas não foi possível registrar o dia da emergência, pois as vespas não foram encontradas nos casulos. Também foram observadas oito ecdises das aranhas (duas em *Eurymorion* sp. e seis em *Sphecozone* sp.) sem a remoção das larvas e a maioria delas aconteceram em aranhas imaturas.

A larva do segundo instar (N= 71) apresenta 13 segmentos no corpo, coloração alaranjada e pequenas manchas brancas nos segmentos intermediários. Os três primeiros segmentos anteriores e o segmento anal apresentam coloração branca transparente (FIGURA 1C e D). A muda da larva do primeiro para segundo instar começa com o engrossamento da extremidade da cabeça, que começa a ficar mais volumosa em relação às restantes partes e, conseqüente, aparecimento da segmentação. Esse engrossamento e aparecimento de segmentação se estende depois até o segmento anal e demora alguns dias para ficar completa. Quando a larva está prestes a se mudar para o terceiro instar, há um aumento da atividade de alimentação da larva, pois começam a aparecer muitas cicatrizes de alimentação no tegumento do abdômen da aranha (FIGURA 1E). Nesta fase também ocorre a manipulação comportamental na aranha, que é induzida a abandonar a teia normal e construir uma nova teia, geralmente uma teia modificada (ver Capítulo 1). A duração máxima desta fase foi de 18 dias (TABELA 1).

A larva do terceiro e último instar (N= 56) apresenta coloração marrom escuro, oito pares de tubérculos dorsais retráteis a partir do quarto ao décimo primeiro segmento do corpo, dois pares de protuberâncias ventrais no terceiro e quarto segmento do corpo e muitas cerdas em todo corpo (FIGURA 1E-F). Os tubérculos dorsais possuem ganchos minúsculos que ajudam a larva a se pendurar nos fios da teia durante os instantes finais do consumo da hemolinfa da aranha e o descarte dos restos da aranha (Figura X). Foram acompanhados dois processos de muda da larva do segundo para terceiro instar. As aranhas hospedeiras, para esses casos, foram dois indivíduos fêmeas de *Sphecozone* sp. e um deles durou aproximadamente 20 minutos. Durante o processo, foi possível observar a cutícula que estava sendo trocada e sendo projetada em cima da superfície externa do corpo e expelida para extremidade posterior com movimentos peristálticos sequências dos segmentos do corpo e a conseqüente projeção dos tubérculos dorsais que antes não apareciam.

3.3.1.2 Inversão do posicionamento da aranha na teia

Antes de matar e descartar os restos da aranha para depois iniciar o processo de construção do casulo, a larva do terceiro ínstar realiza uma série de movimentos de empurrar o corpo da aranha para virá-la para baixo e poder alcançar e pendurar nos fios do lençol da teia construída pela aranha, geralmente uma teia modificada. O posicionamento normal da aranha no centro da sua teia acaba sendo invertido no final do processo (FIGURA 3A-F).

Inicialmente, ela desloca a sua extremidade da cabeça até a porção anterior do abdômen da aranha junto do segmento anal, que continua grudada no abdômen da aranha por meio da sela. Depois passa a fixar sua cabeça numa das porções centro-lateral do abdômen da aranha e, a partir dali, continua a sugar os fluidos internos da aranha (FIGURA 3A-B). Em seguida faz uma série de pressões e empurrões no abdômen da aranha, sobretudo na porção centro-lateral, que possui muitas cicatrizes de alimentação. Primeiramente, ela levanta a metade do corpo que contém a cabeça e a pressiona de forma sequencial contra o abdômen da aranha e arrastando-a para dentro. Neste processo, os dois pares de protuberâncias ventrais situados no terceiro e quarto segmento do corpo são usados como uma “alavanca” para virar o corpo da aranha. Esses movimentos empurram pouco a pouco o corpo da aranha fazendo com que a ponta da sua extremidade posterior ou às vezes uma das laterais do abdômen fiquem virado para cima e entram em contato direto com o lençol da teia. Com aranha parcialmente virada, os tubérculos dorsais dos segmentos intermediários do corpo da larva, com seus ganchos, também entram em contato direto com os fios do lençol da teia (FIGURA 3C-D). Os movimentos peristálticos (flexão e extensão) dos segmentos do corpo junto com a projeção dos tubérculos dorsais, permitem que os ganchos fiquem presos entre os fios do lençol da teia. Nesta altura, tanto a aranha como a larva estão em contato direto com o lençol da teia. Estes movimentos acontecem alternadamente com o consumo dos fluidos internos da aranha e as larvas foram observadas roendo também o material da sela durante estes movimentos.

Após alcançar os fios do lençol da teia construída pela aranha, a larva passa um tempo se alimentando da aranha, que vai ficando cada vez mais debilitada. O estado debilitado da aranha junto com empurrões da larva auxiliados por movimentos peristálticos dos segmentos do corpo, acabam fazendo com que as pernas da aranha soltarem do lençol da teia e assim invertendo o posicionamento dela. A larva fica pendurada no lençol da teia construída pela aranha com auxílio dos tubérculos dorsais que possuem ganchos minúsculos e, a aranha por sua vez, suspensa e ainda sendo segurada pela larva (FIGURA 3E). Após os restos da aranha serem descartadas, a larva fica sozinha pendurada embaixo do lençol da teia construída pela aranha,

que na maioria dos casos, são teias modificadas que possuem um espaço vazio tridimensional embaixo deste lençol (FIGURA 3F).

3.3.1.3 Construção de casulo

Após a larva do terceiro ínstar terminar de consumir a aranha e descartar os restos, ela repousa por aproximadamente uma hora antes de começar o processo de construção de casulo. Durante o período de repouso ocorre movimentos de contração do corpo que parece estar relacionada a produção da seda que será utilizada para construção do casulo, pois esta contração foi frequente durante boa parte do processo de construção de casulo.

Estando pendurada no lençol da teia construída pela aranha horas antes de ser morta por meio dos tubérculos dorsais e com segmento anal por vezes embrenhada nos fios do lençol, a larva começa inicialmente a puxar os fios no segmento anal e costurando-os nos fios do lençol da teia construída pela aranha. Em todos os casos de construção de casulos observados e que tinha uma teia, teia modificada ou não (N=4), os fios do lençol da teia de aranha foram usados como cobertura externa superior do casulo. Com a estrutura externa do casulo pronto, a larva passa a usar fios de seda produzidos na boca e outras soltas para fazer o revestimento interno. Movimentos peristálticos dos segmentos do corpo e os tubérculos dorsais ajudam a larva se mover entre os fios da teia de aranha e do casulo em construção. O processo foi dividido em três partes de acordo com o comportamento da larva e formato do casulo até o final do processo:

Início do processo e formação do revestimento externo do casulo (FIGURA 4A-D): A larva puxa os fios no segmento anal com a boca e prende-os nos fios do lençol da teia construída pela aranha, por meio de movimentos de esfregar a cabeça nos fios da teia. O primeiro movimento consiste em puxar um fio no segmento anal e prendê-lo num ponto muito próximo do local onde o segmento anal está colocado, e em seguida, puxa outro fio e o prende num ponto mais distante, obrigando o corpo ficar totalmente estendido. Por vezes, o segmento anal fica embrenhada entre os fios do lençol da teia enquanto a larva vai fazendo os movimentos de puxar os fios com a boca e costurá-las nos fios do lençol da teia. Os fios puxados inicialmente no segmento anal passam por baixo do corpo da larva e os fios do lençol da teia construída pela aranha, passam por cima do corpo da larva. Ocasionalmente, alguns fios soltos, aqueles que já foram puxados do segmento anal, mas que não estejam presos na estrutura em construção, também são agarrados e costurados em outros pontos. Estes movimentos iniciais acabam possibilitando a formação de um envoltório fino, mas com os limites do casulo evidente. Este

envoltório é a junção dos fios do lençol da teia e fios adicionados pela larva. Os fios do lençol da teia cobrem a porção de cima e, os fios adicionados pela larva, ficam na porção de baixo. As larvas foram observadas puxarem também fios do lençol da teia construída pela aranha para costurá-los nos fios do casulo em construção.

Revestimento interno e a formação das nervuras do casulo (FIGURA 4E-H): Depois da formação do revestimento externo do casulo, começa o processo de revestimento interno, a formação do espaço interno do casulo e criação das quatro nervuras que dão ao casulo o formato quadrático na seção transversal. Primeiramente as larvas dobram o corpo pressionando os fios por dentro para criar o espaço interno do casulo. Neste processo, o dorso da larva fica por cima e, o segmento anal junto com a cabeça da larva por baixo. Depois elas começam a adicionar os fios na região interna do casulo em construção e, a seda para esse fim, é produzido na boca. O processo de revestimento interno é feito com deslizamentos contínuo do corpo na região interna do casulo e elas trabalham a formação das nervuras de forma alternada até o final do processo. O revestimento interno é feito a partir dos fios de seda que são produzidas a partir da boca, pois a partir de um certo momento não voltou a ocorrer o comportamento de puxar os fios a partir do segmento anal ao mesmo tempo que aumentava a densidade dos fios do casulo, sugerindo que esses fios só podem ser produzidos na boca.

Final do processo (FIGURA 4I-L): No final é possível perceber já o formato do casulo típico do gênero, fusiforme e quadrado na seção transversal, sendo que a parte central tem diâmetro maior que as extremidades. E o casulo apresenta a coloração branca transparente. Após um dia da sua finalização, quando a larva já entrou na fase de pupa e o mecônio foi liberado, o casulo aparece com a coloração amarela clara e se torna mais escura com o passar do tempo.

O processo de construção de casulo durou em média 1 dia (N = 56). As larvas adaptaram muito bem situações em que não tinha uma teia completa construída pela aranha para usar na construção do casulo. Casulos foram construídos, por exemplo, num único fio horizontal de uma teia modificada incompleta (ver Capítulo 1) e outras foram construídas na vertical. Os movimentos iniciais para criação da estrutura externa, é mantida, embora com algumas diferenças em relação a situação onde existe uma teia completa.

As vespas adultas emergiram em média 10 dias (mín = 8, máx = 14, N = 43) depois da liberação do mecônio (TABELA 1). A proporção sexual das vespas adultas que emergiram

com sucesso foi tendenciosa para o sexo feminino (fêmea: macho = 1.8:1). O comprimento médio do corpo das vespas fêmeas não diferiu significativamente em relação aos machos (Student's t-test, $t = -1.1417$, d.f. = 36.343, $p = 0.2611$). O tamanho do hospedeiro (comprimento de abdômen) mostrou uma correlação positiva com o tamanho de vespas adultas que emergiram (*Sphecozone* sp.: Correlação de Pearson: $r = 0,43$, $n = 42$, $p = 0.031$) (*Eurymorion* sp.: Correlação de Pearson: $r = 0,54$, $n = 42$, $p = 0.024$). A média do comprimento de abdômen de aranhas em que as vespas fêmeas eclodiram (1.64, $n = 27$) não foi significativamente diferente em comparação com aquela em que as vespas machos eclodiram (1.49, $n = 15$) (Student's t-test, $t = 0.73642$, $df = 40$, $p = 0.4658$).

3.3.2 Ataque e oviposição de vespas adultas

Registramos no campo quatro casos de fêmeas de *E. unilabiana* em teias de *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp. e numa delas foi observado o comportamento de ataque, oviposição e infanticídio (FIGURA 6A-C). Neste caso que a vespa conseguiu ovipositar, a hospedeira foi uma fêmea adulta de *Eurymorion* sp., que já estava carregando uma larva do primeiro ínstar na porção anterior do abdômen antes de ser atacada (FIGURA 6A-B). Inicialmente, a vespa fêmea foi encontrada na teia de aranha, entre os fios de interceptação movendo em direção a aranha que estava no lençol principal da teia. A aranha estava invertidamente pendurada no lençol principal da teia, como era normal, e a vespa atacou-a em cima do lençol principal. A vespa estava na superfície superior do lençol principal e a aranha na inferior. O lençol principal não apresentou nenhum obstáculo para a vespa entrar em contato com aranha. Houve a paralização temporária da aranha, embora não foi possível captar o momento exato em que a vespa injetou o veneno no corpo da aranha. Depois a vespa realizou uma série de movimentos no corpo da aranha que terminaram no infanticídio e deposição de um ovo na porção anterolateral do abdômen muito próximo da larva do primeiro instar que já estava lá. Essa larva inicial estava posicionada transversalmente na porção anterior do abdômen (Figura 6B). Não foi capturado o momento exato do infanticídio e da oviposição, mas a vespa percorreu a região ventral e dorsal assim que a aranha ficou paralisada e foi possível observar a larva inicial ainda viva no estágio de primeiro ínstar. A recuperação da aranha foi de aproximadamente de dois minutos e a vespa por seu turno, voou para longe assim que conseguiu libertar-se da teia de aranha. Esse ataque durou aproximadamente 5 minutos, do contato da vespa com a aranha na teia, infanticídio, oviposição até o momento em que a vespa deixou a aranha. Em três casos, incluindo o caso de ataque com sucesso, não houve qualquer reação da

aranha quanto à presença de um potencial presa. As vespas estavam entre os fios de interceptação a poucos centímetros da posição onde a aranha se encontrava (FIGURA 6C). Em alguns momentos no campo, foram vistas vespas forrageando na vegetação procurando suas hospedeiras.

3.3.3 Frequência de parasitismo e a seleção do tamanho do hospedeiro

Dos 1114 indivíduos de *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp. inspecionados em campo quanto à presença de ovo ou a larva de *E. unilabiana*, 128 (11.5 %) estavam parasitados. Nos dois períodos de coleta, a *Sphecozone* sp. foi mais abundante que a *Eurymorion* sp. e com maior número de casos de parasitismo (TABELA 2). Essas duas hospedeiras de *E. unilabiana*, apresentaram diferenças no tamanho do corpo e em algumas características ecológicas como área de ocorrência no local de estudo, a altura preferida para construção das teias e períodos de maior abundância (TABELA 2).

A proporção sexual foi tendenciosa para o sexo feminino na população de *Sphecozone* sp. (fêmea: macho = 3:1, N= 356) (Pearson's Chi-squared test: $X^2 = 48.69$, $df = 1$, $p < 0.0001$) e na população de *Eurymorion* sp. (fêmea: macho= 1.5:1; N = 250) (Pearson's Chi-squared test: $X^2 = 6.36$, $df = 1$, $p = 0.01169$).

Houve uma frequência de parasitismo desproporcional de *E. unilabiana* em três classes dos hospedeiros. Em *Sphecozone* sp. foram registrados maior frequência de parasitismo em hospedeiros de tamanho pequeno ($n = 52$) e intermediário ($n = 46$), mas essa diferença não foi significativa ($G = 3.4899$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0.1747$) (FIGURA 7). Em *Eurymorion* sp., por outro lado, hospedeiros de tamanho intermediário ($n = 21$) foram mais parasitados quando comparados com aqueles de tamanho pequeno e grande (*Eurymorion* sp.: $G = 8.1835$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0.01671$) (FIGURA 7). A média de comprimento de abdômen de hospedeiros parasitados foi 1.45 mm (min = 0.2 mm, máx = 3.2, DP = 0.60, N = 128).

A frequência de parasitismo foi mais alta em fêmeas do que em machos de *Sphecozone* sp. (*Sphecozone* sp.: $G = 4.5082$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.03373$), mas essa diferença de frequência de parasitismo não foi significativa em *Eurymorion* sp. (*Eurymorion* sp.: $G = 1.6487$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.1991$) (FIGURA 8). Apenas 12 machos foram parasitados no total de 91 aranhas subadultas e adultas das duas espécies parasitadas e, os 37 restantes, são aranhas jovens. O comprimento do abdômen foi significativamente maior em fêmeas em relação aos machos

na população de ambas hospedeiras (*Sphecozone* sp.: Wilcoxon rank sum test, $W = 17310$, $p < 0.0001$; *Eurymorion* sp.: Wilcoxon rank sum test, $W = 31375$, $p < 0.0001$).

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Estágios imaturos

Descobrimos que os estágios imaturos da *E. unilabiana* apresentaram não só as mesmas características morfológicas e comportamentais básicas já conhecidas para espécies de outros gêneros dos polysphinctines, mas também outras novas ajustadas a ecologia e comportamentos das duas hospedeiras.

Eles exibiram estruturas e comportamentos que lhes permitem fixar no abdômen da aranha com segurança e assim evitar a remoção que pode surgir tanto pelos movimentos das pernas das aranhas como do processo de ecdise (NIELSEN, 1923, 1935, FINCKE et al., 1990; EBERHARD, 2000b, 2019; WENG; BARRANTES, 2007; SOBCZAK, 2013; KLOSS et al., 2016). A remoção dos restos da aranha é muito rápida e similar aos comportamentos descritos para *Zatypota petronae* Gauld, 1991 (WENG; BARRANTES, 2007) e para *Hymenoepimecis bicolor* (Brullé, 1846) (SOBCZAK, 2013) com movimentos peristálticos dos segmentos do corpo, pressão abdômen e empurrões dos restos da aranha com a cabeça para afastá-lo junto do segmento anal. A diferença foi apenas no comportamento da larva de roer o material da sela antes de matar a aranha e que se revelou muito crucial para se libertar dos restos da aranha. Também induziram as aranhas a construir teias modificadas com características mais protetoras e estáveis que as teias de captura de presa, podendo assim garantir a proteção para as larvas durante a fase de pupa como acontece em muitos casos já relatados (MATSUMOTO, 2009; SOBCZAK, 2013; KLOSS et al., 2016).

Os comportamentos que não foram descritas para espécies de outros gêneros dentro do grupo, são a inversão do posicionamento das aranhas em relação ao lençol da teia modificada (às vezes não modificada), a contração do corpo durante o processo de construção de casulo e a produção da seda a partir do segmento anal para formação do revestimento externo do casulo. Adicionalmente tem os dois pares de protuberâncias ventrais no terceiro e quarto segmento do corpo, próximo da cabeça e que são usadas no processo de inversão do posicionamento da aranha na teia.

A inversão é uma adaptação ao comportamento das duas espécies de aranhas. As duas espécies, juntamente com muitas outras espécies de aranhas da família Linyphiidae que constroem teias de lençol, possuem o hábito de estarem sempre no centro do lençol principal numa posição invertida para capturar presas que caem na superfície deste lençol (JANETOS, 1982; BENJAMIN; ZSCHOKKE, 2004). Para larvas do terceiro ínstar da *E. unilabiana*, essa inversão permite que elas alcancem este lençol para construir os seus casulos e aproveitar a proteção que essa estrutura oferece. No laboratório, algumas larvas caíram para baixo quando tentaram realizar esta inversão e construíram o casulo no espaço vazio ou na estrutura tridimensional abaixo do lençol da teia modificada casulo. Outras conseguiram inverter a posição da aranha e alcançaram o lençol da teia construída pela aranha, mas por algum motivo, desprenderam dali também. Assim, experimentos de campo são necessários para testar a sobrevivência das pupas que possuem casulos construídos abaixo do lençol da teia modificada e também identificar os possíveis inimigos naturais, pois no laboratório as vespas adultas emergiram com sucesso. No campo, por outro lado, as duas aranhas hospedeiras sofrem a invasão de aranhas cleptoparasitas, como a *Argyrodes* sp. (Theridiidae) em suas teias e podem ser potenciais inimigos naturais para as larvas e as pupas da *E. unilabiana*, embora a natureza exata do cleptoparasitismo permanece ainda desconhecida.

A contração do corpo durante o processo de construção de casulo é outro comportamento que não foi relatado em outras espécies estudadas e está fortemente relacionada ao processo de produção de seda a partir do segmento anal para a formação do revestimento externo do casulo. A função de fazer chegar os fios de seda para cantos onde a cabeça da larva não alcança, foi a única função até agora relatada para segmento anal em relação ao processo de construção de casulo nos polysphinctines (NIELSEN, 1923), apesar dessas observações precisarem de mais confirmações. A produção da seda da larva de *E. unilabiana* a partir do segmento anal para construção do casulo é um caso novo em larvas de Ichneumonidae, no entanto precisa de mais análises para compreensão de como se dá o processo. Na maioria dos himenópteros, a seda usada por larvas para formação do casulo é produzida na glândula labial (SEHNAL; AKAI, 1990; CRAIG 1997; SEHNAL; CRAIG, 2009; QUICKE, 2015) e só em algumas vespas Chalcidoidea foi relatado o uso de secreções anais para formação do casulo (FLANDERS, 1938). No entanto, em outros ordens de insetos como Coleoptera, Ephemeroptera e Neuroptera, as larvas produzem seda para a construção do casulo a partir dos túbulos de Malpighi, que constituem o principal sistema de excreção em artrópodes (KENCHINGTON, 1983; CRAIG, 1997; SEHNAL; CRAIG, 2009).

Não foi possível observar estas projeções ventrais quando as larvas estavam no segundo ínstar e as larvas do terceiro ínstar não possuíam nenhuma projeção ventral nos segmentos que estavam em contato com a sela. Os dois pares de protuberâncias ventrais em larvas do terceiro instar da *E. unilabiana* situados na região ventral do terceiro e quarto segmento do corpo também constitui até agora o único caso relatado em vespas polysphinctines e são usados pela larva para virar a aranha e alcançar o lençol da teia onde o casulo é construído. Nos gêneros *Hymenoepimecis* Viereck, 1912, *Zatypota* Föster, 1869 e *Reclinervellus* He & Ye, 1998 também foram relatados dois pares de protuberâncias ventrais, mas elas foram observadas no oitavo e nono segmento do corpo das larvas (NIELSEN 1923; EBERHARD, 2000b; MATSUMOTO; KONISHI, 2007; WENG; BARRANTES, 2007; SOBCZAK, 2013). Na descrição inicial de Nielsen (1923), essas protuberâncias ventrais são os que ajudam as larvas a continuarem presas no corpo das aranhas mesmo quando as aranhas trocam suas cutículas, pois se situam nos segmentos que estão em cima da sela. Mais tarde foi confirmado por Eberhard (2000b) e por Weng e Barrantes (2007) que observaram evidências de inserção destas protuberâncias ventrais no material da sela em larvas de *H. argyraphaga* e *Z. petronae*, respectivamente. Entretanto, foram observadas quatro pares protuberâncias ventrais do oitavo ao décimo primeiro segmento do corpo em larvas *Schizopyga podagrica* Gravenhorst, 1829 (NIELSEN, 1935) e três pares foram observados em larvas *Polysphincta tuberosa* Gravenhorst, 1829, do sétimo ao nono segmento do corpo (NIELSEN, 1923). As possíveis funções destas protuberâncias a mais nestes dois últimos gêneros comparada a outros ainda não foram descobertas. Em nossas observações não foi possível encontrar estas protuberâncias ventrais em larvas do segundo instar e nem se existe outras nos segmentos da larva que estão em cima sela como ocorre nos generos *Hymenoepimecis*, *Zatypota* e *Reclinervellus*. Assim mais estudos serão necessários para esclarecer esse problema.

3.4.2 Frequência de parasitismo e seleção do tamanho do hospedeiro

Observamos uma baixa frequência de parasitismo de *E. unilabiana* na população de *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp. durante os dois períodos de estudos. Níveis de parasitismo variados tem sido observado em populações de aranhas hospedeiras de vespas polysphinctines e vão de extremamente baixa (WENG; BARRANTES, 2007; KORENKO et al., 2011) a níveis mais altos (FINCKE et al., 1990; EBERHARD 2000b; GONZAGA; SOBCZAK, 2007). O conhecimento do real impacto destes parasitoides na população de suas hospedeiras é extremamente difícil tendo em conta que o espectro de hospedeiros para muitas espécies

permanece ainda desconhecido (GONZAGA et al., 2017; EBERHARD; GONZAGA, 2019). Adicionalmente os nossos resultados confirmam a nossas hipóteses de que aranhas fêmeas e indivíduos de tamanho intermediário foram as mais frequentemente parasitadas pela fêmea de *E. unilabiana*. Nos censos mensais dos dois períodos de coleta, indivíduos do sexo feminino e de tamanho intermediário sempre foram as mais abundantes em comparação com os machos e de outras faixas do tamanho (pequeno e grande), respectivamente. A única exceção aconteceu em setembro e outubro de 2020 onde foi registrado maior abundância de indivíduos de tamanho pequeno, mas mesmo assim o tamanho intermediário foi mais parasitado pela fêmea da *E. unilabiana*. Preferência por hospedeiros de tamanho intermediário foi observada também em *H. robertsae* sobre *T. clavipes* no Panamá (FINCKE et al., 1990) e em *Zatypota percontatoria* (Müller, 1776) sobre aranhas de família Theridiidae na República Tcheca (KORENKO et al., 2011). Mas está longe de ser padrão geral nos polysphinctines, pois Gonzaga et al. (2015) observaram uma maior preferência por hospedeiros grandes na interação de *H. jordanensis* Loffredo & Pentead-Dias, 2009 com *Leucauge volupis* (Keyserling, 1893) e Gonzaga e Sobczak (2007) observaram indivíduos pequenos de *Araneus omnicolor* (Keyserling, 1893) sendo mais parasitados por *H. veranii* Loffredo & Pentead-Dias, 2009, ambos estudos no Brasil. Embora não foi possível a realização de censos mensais contínuos durante um ano completo, nossas observações de campo sugerem uma mudança na preferência de espécie de hospedeira de acordo com as diferenças observadas no período de maior abundância nas populações dessas duas espécies de aranhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, Francisca S. et al. Efeito da variação topoclimática na composição e riqueza da flora fanerogâmica da serra de Baturité, Ceará. Pp. 140- 162. In: T.S. Oliveira & F.S. Araújo (eds.). **Diversidade e conservação da biota na serra de Baturité, Ceará**. Fortaleza: Edições UFC, COELCE, 2006. p. 3-15.

BARRANTES, Gilbert; SANDOVAL, Luis; HANSON, Paul. Cocoon web induced by *Eruga telljohanni* (Ichneumonidae: Pimplinae) in *Leucauge* sp. (Tetragnathidae). **Arachnology** [S.I], v. 17, n. 5, p. 245-247, 2017.

BARRANTES, Gilbert et al. *Messua* sp. (Salticidae), the host spider of the polysphinctine *Inbioia pivai* (Ichneumonidae: Pimplinae). **Arachnology** [S.I], v. 18, n. 1, p. 28-31, 2019.

BENJAMIN, Suresh P.; ZSCHOKKE, Samuel. Homology, behaviour and spider webs: web construction behaviour of *Linyphia hortensis* and *L. triangularis* (Araneae: Linyphiidae) and its evolutionary significance. **Journal of Evolutionary Biology** [S.I], v. 17, n. 1, p. 120-130, 2004.

CRAIG, Catherine L. Evolution of arthropod silks. **Annual review of entomology** [S.I], v. 42, n. 1, p. 231-267, 1997.

EBERHARD, William G. Spider manipulation by a wasp larva. **Nature** [S.I], v. 406, n. 6793, p. 255-256, 2000a.

EBERHARD, William G. The natural history and behavior of *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera: Ichneumonidae) a parasitoid of *Plesiometa argyra* (Araneae: Tetragnathidae). **Journal of Hymenoptera Research** [S.I], v. 9, n. 2, p. 220-240, 2000b.

EBERHARD, William G. Under the influence: webs and building behavior of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae) when parasitized by *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera, Ichneumonidae). **The Journal of Arachnology** [S.I], v. 29, n. 3, p. 354-366, 2001.

EBERHARD, William G. New types of behavioral manipulation of host spiders by a parasitoid wasp. **Psyche** [S.I], v. 2010, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/950614>

EBERHARD, William G. The polysphinctine wasps *Acrotaphus tibialis*, *Eruga* ca. *gutfreundi*, and *Hymenoepimecis tedfordi* (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) induce their host spiders to build modified webs. **Annals of the Entomological Society of America** [S.I], v. 106, n. 5, p. 652-660, 2013.

EBERHARD, William G. Hunting behavior of the wasp *Polysphincta gutfreundi* and related polysphinctine wasps (Hymenoptera, Ichneumonidae). **Journal of the Kansas Entomological Society** [S.I], v. 91, n. 3, p. 177-191, 2019.

EBERHARD, William G.; GONZAGA, Marcelo O. Evidence that *Polysphincta-group* wasps (Hymenoptera: Ichneumonidae) use ecdysteroids to manipulate the web-construction

behaviour of their spider hosts. **Biological Journal of the Linnean Society** [S.I], v. 127, n. 2, p. 429-471, 2019.

FINCKE, Ola M.; HIGGINS, Linden; ROJAS, Edgar. Parasitism of *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae) by an ichneumonid (Hymenoptera, Polysphinctini) in Panama. **Journal of Arachnology** [S.I], p. 321-329, 1990.

FITTON, M. G.; SHAW, Mark R.; AUSTIN, A. D. The Hymenoptera associated with spiders in Europe. **Zoological Journal of the Linnean Society** [S.I], v. 90, n. 1, p. 65-93, 1987.

FITTON, Michael G. et al. Pimpline ichneumon-flies. Hymenoptera, Ichneumonidae (Pimplinae). **Pimpline ichneumon-flies. Hymenoptera, Ichneumonidae (Pimplinae).**, v. 7, n. 1, 1988.

FLANDERS, Stanley E. Cocoon Formation in Endoparasitic Chalcidoid. **Annals of the Entomological Society of America** [S.I], v. 31, n. 2, p. 167-180, 1938.

FRITZÉN, Niclas R.; FJELLBERG, Arne. Natural history of *Oxyrrhexis zephyrus* sp. n. (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of *Enoplognatha serratosignata* (Araneae: Theridiidae), with notes on taxonomy and other host species of *Oxyrrhexis*. **Arthropoda Selecta** [S.I], v. 23, n. 2, p. 135-144, 2014.

GAULD, Ian D.; DUBOIS, Jacques. Phylogeny of the *Polysphincta* group of genera (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae): a taxonomic revision of spider ectoparasitoids. **Systematic Entomology** [S.I], v. 31, n. 3, p. 529-564, 2006.

GONZAGA, Marcelo O.; SOBCZAK, Jober F. Parasitoid-induced mortality of *Araneus omnicolor* (Araneae, Araneidae) by *Hymenoepimecis* sp. (Hymenoptera, Ichneumonidae) in southeastern Brazil. **Naturwissenschaften** [S.I], v. 94, n. 3, p. 223-227, 2007.

GONZAGA, M. O. et al. Modification of *Nephila clavipes* (Araneae Nephilidae) webs induced by the parasitoids *Hymenoepimecis bicolor* and *H. robertsae* (Hymenoptera Ichneumonidae). **Ethology Ecology & Evolution** [S.I], v. 22, n. 2, p. 151-165, 2010.

GONZAGA, Marcelo Oliveira et al. Changes to web architecture of *Leucauge volupis* (Araneae: Tetragnathidae) induced by the parasitoid *Hymenoepimecis jordanensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Behaviour** [S.I], v. 152, n. 2, p. 181-193, 2015.

GONZAGA, Marcelo O.; KLOSS, Thiago G.; SOBCZAK, Jober F. Host behavioural manipulation of spiders by ichneumonid wasps. In: **Behaviour and Ecology of Spiders**. Springer, Cham, 2017. p. 417-437.

JANETOS, Anthony C. Foraging tactics of two guilds of web-spinning spiders. **Behavioral Ecology and Sociobiology** [S.I], v. 10, n. 1, p. 19-27, 1982.

KENCHINGTON, W. The larval silk of *Hypera* spp. (Coleoptera: Curculionidae). A new example of the cross- β protein conformation in an insect silk. **Journal of Insect Physiology** [S.I], v. 29, n. 4, p. 355-361, 1983.

KORENKO, Stanislav et al. Host specificity and temporal and seasonal shifts in host preference of a web-spider parasitoid *Zatypota percontatoria*. **Journal of Insect Science** [S.I.], v. 11, n. 1, p. 101, 2011.

KLOSS, Thiago G. et al. Attack behavior of two wasp species of the *Polysphincta* genus group (Hymenoptera, Ichneumonidae) on their orb-weaver spider hosts (Araneae, Araneidae). **Journal of Insect Behavior** [S.I.], v. 29, n. 3, p. 315-324, 2016.

KLOSS, Thiago G. et al. Host behavioural manipulation of two orb-weaver spiders by parasitoid wasps. **Animal Behaviour**[S.I.], v. 111, p. 289-296, 2016.

LEMOS, Rafael Yuji. **Revisão e análise cladística das espécies do gênero *Sphecozone* OP-Cambridge, 1870 (Araneae, Linyphiidae, Erigoninae)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia) — Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41133/tde-20082018-142657/publico/Rafael_Lemos_CORRIG.pdf. Acesso em: 30 Nov. 2021.

MANUEL, Raymond Lewis. **The biology of *Frontinella pyramitela* (Walckenaer, 1841) (Arachnida: Linyphiidae) with special reference to predation**. M.Sc. thesis, Department of Entomology, University of Montreal, Canada 1974.

MATSUMOTO, Rikio; KONISHI, Kazuhiko. Life histories of two ichneumonid parasitoids of *Cyclosa octotuberculata* (Araneae): *Reclinervellus tuberculatus* (Uchida) and its new sympatric congener (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae). **Entomological Science** [S.I.], v. 10, n. 3, p. 267-278, 2007.

MATSUMOTO, Rikio. “Veils” against predators: modified web structure of a host spider induced by an ichneumonid parasitoid, *Brachyzapus nikkoensis* (Uchida) (Hymenoptera). **Journal of Insect Behavior** [S.I.], v. 22, n. 1, p. 39, 2009.

MATSUMOTO, Rikio. Molecular phylogeny and systematics of the *Polysphincta* group of genera (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae). **Systematic Entomology** [S.I.], v. 41, n. 4, p. 854-864, 2016.

NIELSEN, Edvard. Contributions to the life history of the Pimpline spider parasites (*Polysphincta*, *Zaglyptus*, *Tromatobia*) (Hym. Ichneum.). **Entomologiske Meddelelser** [S.I.], v. 14, p. 137-205, 1923.

NIELSEN, Edvard. A third supplementary note upon the life histories of the *Polysphinctas* (Hym. Ichneum.). **Entomologiske Meddelelser** [S.I.], v. 19, p. 191-215, 1935.

QUICKE, Donald LJ. **The braconid and ichneumonid parasitoid wasps: biology, systematics, evolution and ecology**. John Wiley & Sons, 2015.

RODRIGUES, Everton Nei Lopes; OTT, Ricardo. On the Neotropical spider genus *Eurymorion* (Araneae: Linyphiidae). **Zoologia (Curitiba)**, v. 27, n. 4, p. 649-659, 2010.

SEHNAL, František; AKAI, Hiromu. Insect silk glands: their types, development and function, and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them.

International Journal of Insect Morphology and Embryology [S.I], v. 19, n. 2, p. 79-132, 1990.

SEHNAL, František; CRAIG, Catherine. Silk production. In: **Encyclopedia of Insects**. Academic Press, 2009. p. 921-924.

SOBCZAK, Jobert Fernando. **Estudos biológicos e ecológicos da interação entre *Nephila clavipes* (Araneae, Nephilidae) e o parasitoide *Hymenoepimecis bicolor* (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae)**. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brazil, 2013.

SOBCZAK, Jobert F. et al. The parasitoid wasp *Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, sp. nov. (Hymenoptera: Ichneumonidae) induces behavioral modification in its spider host. **Entomological Science** [S.I], v. 21, n. 1, p. 59-65, 2018.

SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE DO CEARÁ - SEMACE. **Área de Proteção Ambiental da Serra de Baturité**. Disponível em: <https://www.semace.ce.gov.br/2010/12/08/apa-da-serra-de-baturite/>. Acesso em: 15 Jul. 2021.

TAKASUKA, Keizo; MATSUMOTO, Rikio; OHBAYASHI, Nobuo. Oviposition behavior of *Zatypota albicoxa* (Hymenoptera, Ichneumonidae), an ectoparasitoid of *Achaearanea tepidariorum* (Araneae, Theridiidae). **Entomological Science** [S.I], v. 12, n. 3, p. 232-237, 2009.

TAKASUKA, Keizo et al. Host manipulation by an ichneumonid spider ectoparasitoid that takes advantage of preprogrammed web-building behaviour for its cocoon protection. **The Journal of experimental biology** [S.I], v. 218, n. 15, p. 2326-2332, 2015.

TAKASUKA, Keizo et al. The changing use of the ovipositor in host shifts by ichneumonid ectoparasitoids of spiders (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae). **Parasite** [S.I], v. 25, 2018.

WENG, Ju L.; BARRANTES, Gilbert. Natural history and larval behavior of the parasitoid *Zatypota petronae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Journal of Hymenoptera Research** [S.I], v. 16, n. 2, p. 326-335, 2007.

WORLD SPIDER CATALOG. **World Spider Catalog Version 20.0**. Natural History Museum Bern. Disponível em: <http://wsc.nmbe.ch>. Acesso em: 08 Ago. 2021.

Yu DSK. **Taxapad Ichneumonoidea (version May 2009)**. In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2016 Annual Checklist (Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Flann C., Bailly N., Kirk P., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., eds). Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2016. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X. 2021. Acesso em: 15 Jul. 2021.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Duração dos estágios de desenvolvimento de *E. unilabiana* em condições de laboratório (em dias).

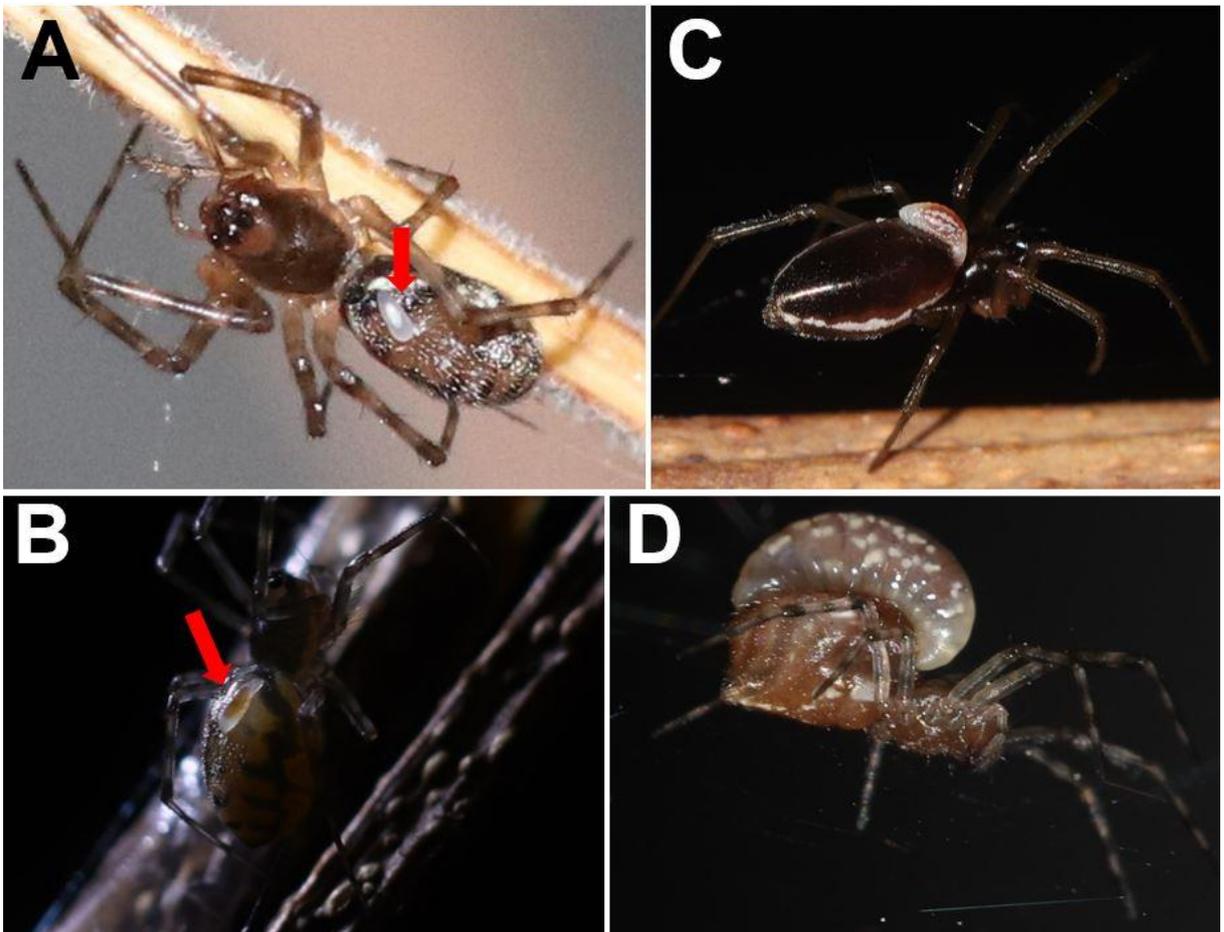
Estágio	(mín/máx)	Duração
Ovo		3*
Instar 1		(3/40)
Instar 2		(3/18)
Instar 3		(1/2)
Pupa		(8/14)

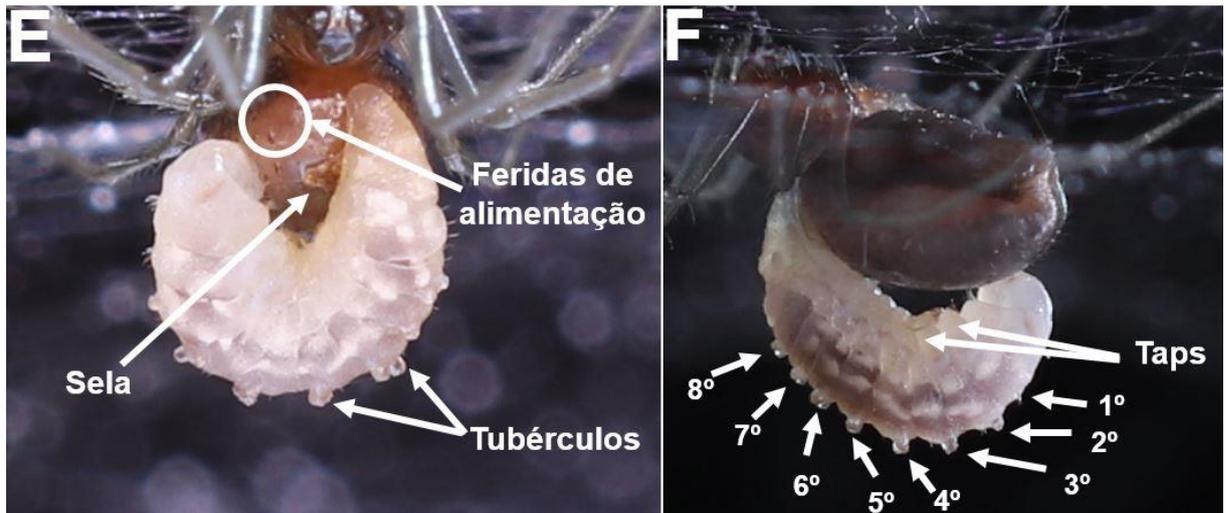
* Baseado na única amostra com o dia da colocação do ovo no abdômen da aranha conhecido (o caso de ataque e oviposição registrado no campo).

Tabela 2. Incidência de parasitismo e as características ecológicas das duas hospedeiras de *E. unilabiana* (*Eurymorion* sp. e *Sphecozone* sp.) nos períodos de estudo em Mulungu, Ceará, Brasil. **N** - Número de indivíduos inspecionados quanto a presença de ovo ou larva de *E. unilabiana*; **n (%)** - número de casos e porcentagem de parasitismo e; **tamanho (mm)** - comprimento médio e máximo do abdômen das aranhas e; **características ecológicas** (baseada em observações de campo).

Hospedeiro			Tamanho (mm)	Características ecológicas		
				Áreas de ocorrência	Altura preferida para construção de teias	Período de maior abundância
<i>Eurymorion</i> sp.	7	7 (7%)	1.1 e 2.6	Interior da floresta	Próximo ao solo	Fevereiro
<i>Sphecozone</i> sp.	27	01 (13.9%)	1.3 e 4.1	Interior e borda da floresta	Desde o solo até 3 metros de altura	Outubro e novembro

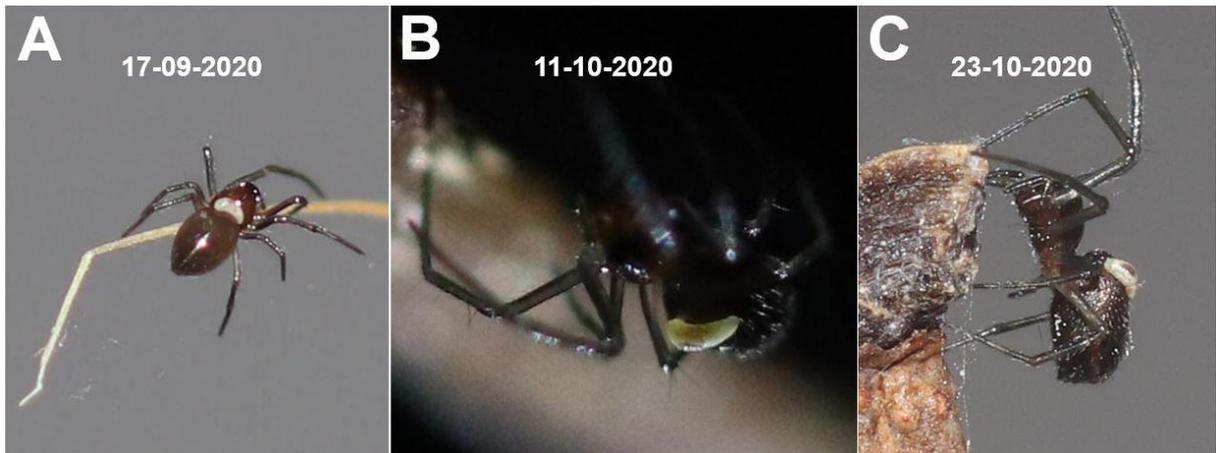
Figura 1. Aranhas hospedeiras com estágios imaturos de *E. unilabiana*. **A)** Larva no final do processo de transição de estágio de ovo para primeiro instar e longitudinalmente na porção anterior de um indivíduo de *Eurymorion* sp.; **B)** Larva do primeiro instar em transição para segundo instar e longitudinalmente na porção anterior de um indivíduo de *Eurymorion* sp.; **C** e **D)** Larva do segundo instar no abdômen de um indivíduo de *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp., respectivamente; **E)** Larva do terceiro instar num indivíduo de *Sphecozone* sp., com tubérculos dorsais, cicatrizes de alimentação no abdômen da aranha e a sela destacadas e **F)** Larva do terceiro instar com os oito pares de tubérculos dorsais no quarto e décimo primeiro segmento do corpo e os dois pares de protuberâncias ventrais (Taps) no terceiro e quarto segmento do corpo.





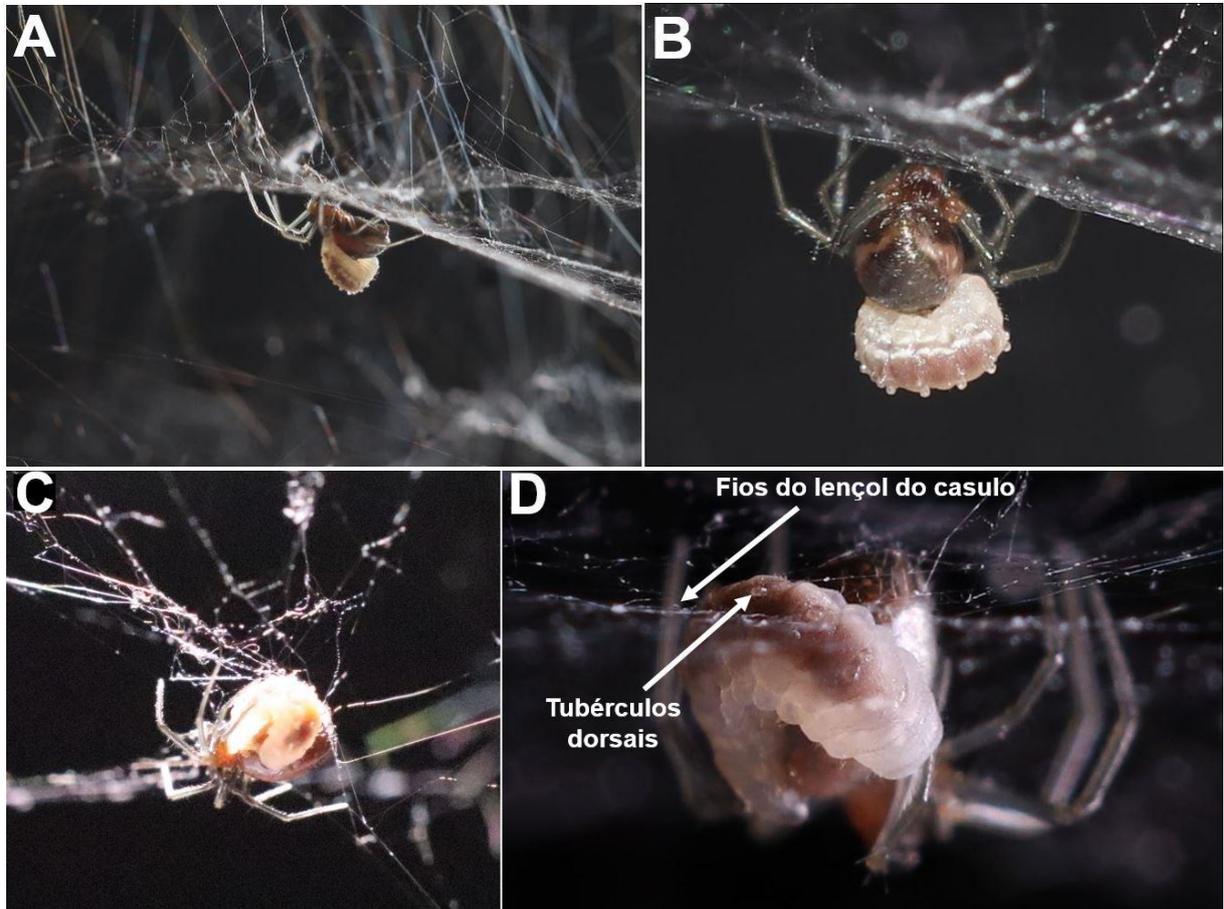
Fonte: Elaborada pelo autor.

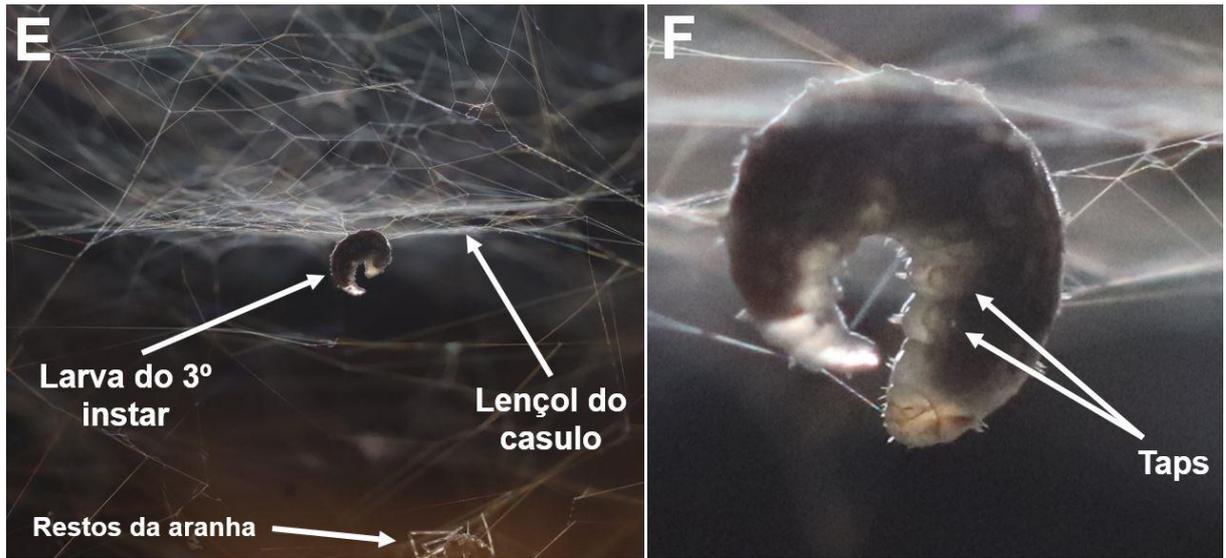
Figura 2. Indivíduo imaturo de *Sphecozone* sp. parasitado com a larva que passou 40 dias no primeiro instar e mais 10 dias para matar aranha e entrar na fase de pupa. **A)** Larva do primeiro instar quando o comprimento de abdômen aranha era igual a 0,3 mm; **B)** Larva do primeiro instar 30 dias depois a coleta e; **C)** Larva mudando para segundo instar com aparecimento da segmentação no corpo e com comprimento de abdômen da aranha igual a 0,9 mm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

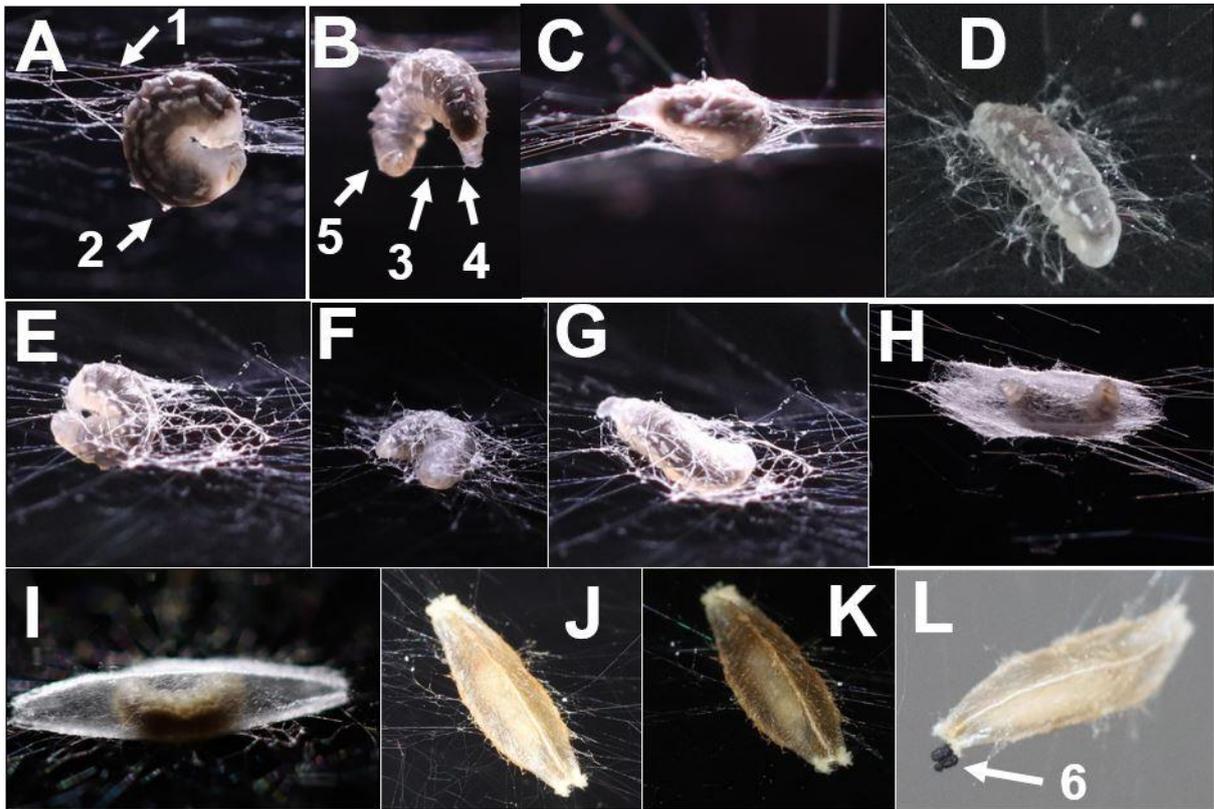
Figura 3. Comportamento de inversão do posicionamento da aranha. **A)** Larva do terceiro instar posicionada longitudinalmente no abdômen de um indivíduo de *Sphecozone* sp. momentos após a muda, **B)** Cabeça da larva junto a porção anterior do abdômen da aranha, **C)** Tubérculos dorsais da larva e uma porção lateral do abdômen da aranha em contato direto com os fios do lençol da teia; **D)** Tubérculos dorsais da larva e a ponta da porção posterior do abdômen da aranha em contato direto com fios do lençol da teia; **E)** Larva do terceiro instar pendurada nos fios de uma teia incompleta e no processo de descarte dos restos da aranha; **F)** Larva do terceiro instar pendurada embaixo do lençol de uma teia modificada após o descarte dos restos aranha e iniciando a construção de casulo e; **G)** Larva do terceiro instar pendurada embaixo do lençol de uma teia modificada e com dois pares protuberancias ventrais (Taps) identificadas.





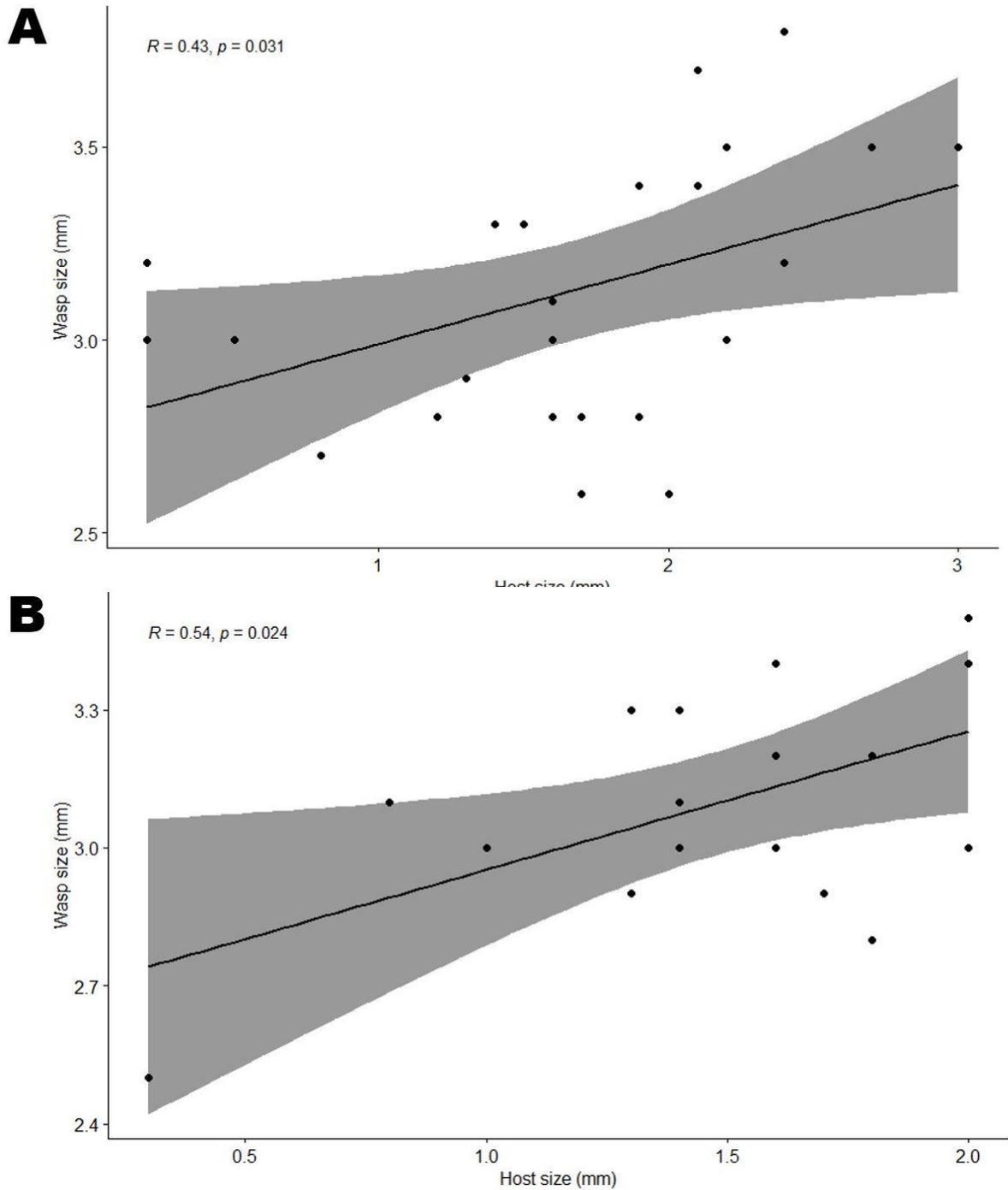
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4. Processo de construção de casulo da larva do terceiro instar da *E. unilabiana*. **A-D)** Etapa inicial e a formação do envoltório externo do casulo; **E-H)** Revestimento interno e formação das quatro nervuras do casulo e; **I-L)** Etapa final do processo, com casulo pronto e liberação de mecônio um dia depois. **1**, fios do lençol do casulo; **2**, Tubérculos dorsais; **3**, Fios de seda produzida no segmento anal; **4**, apêndice anal; **5**, cabeça da larva; **6**, mecônio.



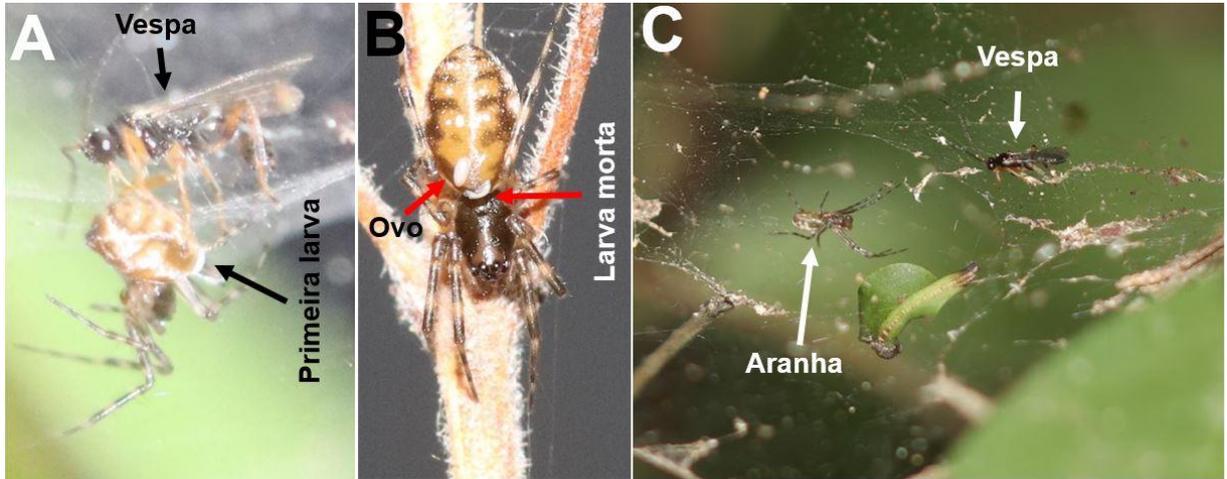
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 5. Resultado do coeficiente de correlação de Pearson entre o tamanho do hospedeiro (comprimento de abdomen) e o tamanho da vespa adulta (comprimento total do corpo) em: **A)** *Shpecozone* sp. e **B)** *Eurymorion* sp..A área em cinza indica o intervalo de confiança de 95%.



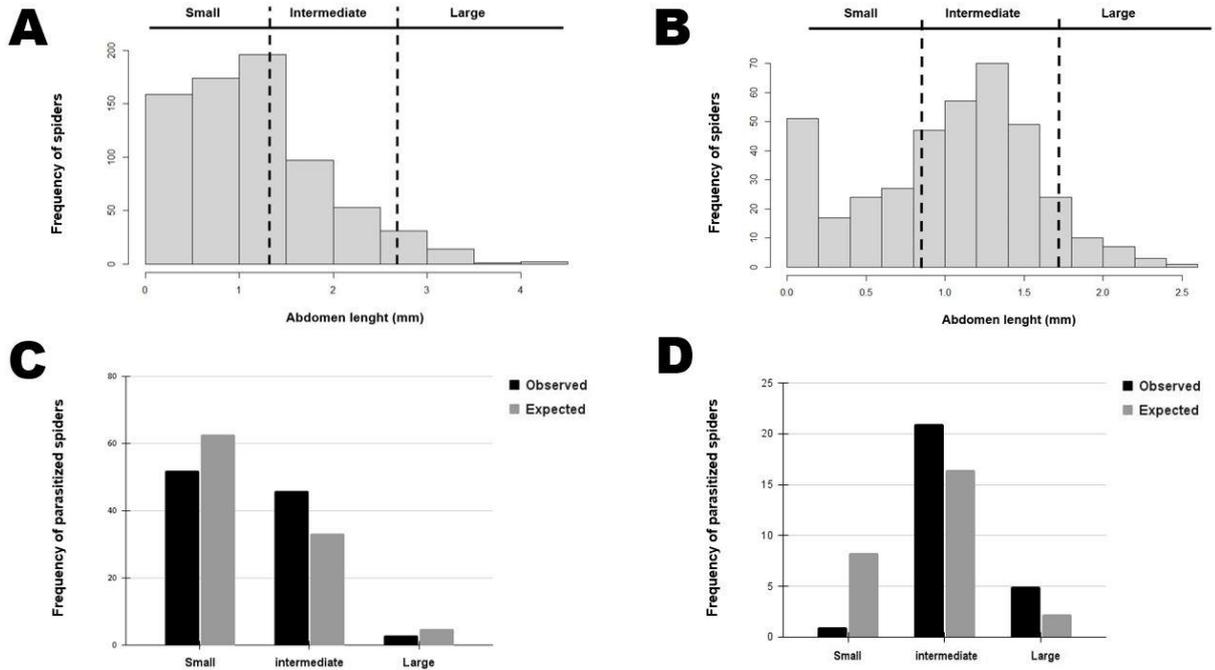
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 6. Fêmeas de *E. unilabiana* encontradas no campo em teias de *Eurymorion* sp. e *Sphecozone* sp. e na vegetação. **A-B)** Caso do ataque que resultou em oviposição e infanticídio; **C)** uma vespa fêmea parada no lençol de um indivíduo de *Eurymorion* sp. e esperando um momento oportuno para o ataque.



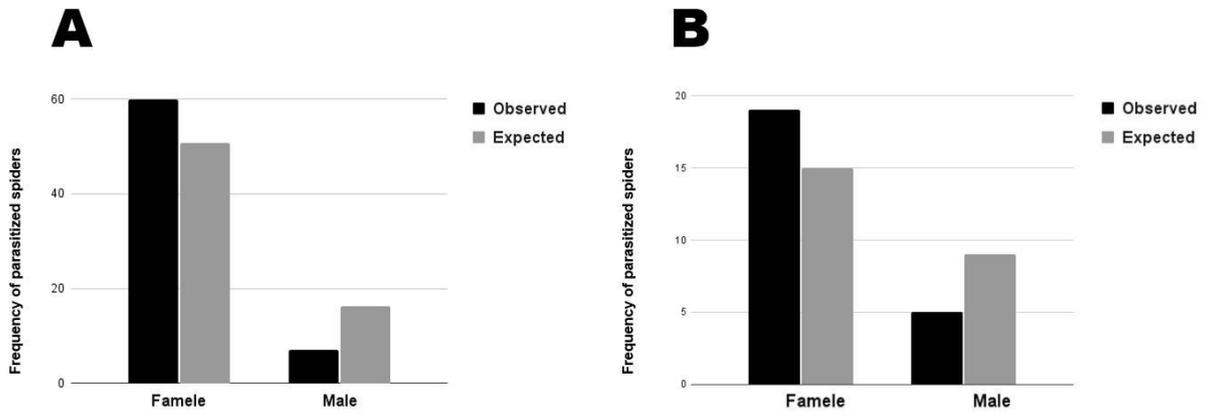
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 7. Indivíduos de *Sphecozone* sp. e de *Eurymorion* sp. inspecionados no campo. Frequência e faixa de comprimento de abdômen de indivíduos de (A) *Sphecozone* sp. e de (B) *Eurymorion* sp. Frequência de parasitismo observada e esperada em três classes de tamanho de abdômen em (C) *Sphecozone* sp. e em (D) *Eurymorion* sp..



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 8. Frequência de parasitismo observada e esperada em fêmeas e machos de **(A)** *Sphecozone* sp. e de **(B)** *Eurymorion* sp.



Fonte: elaborada pelo autor.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho estudamos a história natural da interação entre a vespa parasitoide *E. unilabiana* e suas aranhas hospedeiras *Sphecozone* sp. e *Eurymorion* sp., na Serra de Baturité, Ceará, Brasil. Registramos a manipulação em *Eurymorion* sp. induzido pelas larvas do penúltimo ínstar de *E. unilabiana*. Mostramos que indivíduos parasitados de *Eurymorion* sp. e de *Sphecozone* sp. são induzidos a abandonarem suas teias normais e construírem teias modificadas do zero. As estruturas envolvidas na captura de presa foram significativamente reduzidas e com características projetadas para oferecer proteção a pupa deste parasitoide contra inimigos naturais e fatores abióticos. Também descobrimos que os estágios imaturos da *E. unilabiana* apresentaram não só as mesmas características morfológicas e comportamentais básicas já conhecidas para espécies de outros gêneros dentro do grupo *Polysphincta*, mas também outras novas ajustadas a ecologia e comportamentos das duas hospedeiras. A frequência de parasitismo de *E. unilabiana* na população de *Sphecozone* sp. e de *Eurymorion* sp. é baixa e foi maior em indivíduos do sexo feminino e do tamanho intermediário de ambas espécies de aranhas. Desta forma, consideramos que são necessários mais estudos para:

- Identificar os mecanismos usados pelas larvas do penúltimo ínstar de *E. unilabiana* para manipular o comportamento destas aranhas;
- Saber se a teia modificada induzida pela *E. unilabiana* é semelhante a teia de muda dessas aranhas.
- Avaliar os benefícios conferidos pelas teias modificadas construídas por essas aranhas na proteção das pupas de *E. unilabiana* contra inimigos naturais e fatores abióticos; e
- Conhecer mais detalhes dos outros aspectos da história natural da *E. unilabiana* descritos e discutidos neste trabalho, por exemplo, a produção de seda no segmentom anal para o revestimento externo do casulo, as estratégias de ataque e oviposição da vespa fêmea de *E. unilabiana* em suas hospedeiras, entre outras.

REFERÊNCIAS

- DOUTT, Richard L. The biology of parasitic Hymenoptera. **Annual review of entomology** [S.I.], v. 4, n. 1, p. 161-182, 1959.
- EBERHARD, William G. Spider manipulation by a wasp larva. **Nature** [S.I.], v. 406, n. 6793, p. 255-256, 2000.
- EBERHARD, W. G. The natural history and behavior of *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera: Ichneumonidae) a parasitoid of *Plesiometa argyra* (Araneae: Tetragnathidae). **Journal of Hymenoptera Research** [S.I.], v. 9, n. 2, p. 220-240, 2000.
- EBERHARD, William G. Under the influence: webs and building behavior of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae) when parasitized by *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera, Ichneumonidae). **The Journal of Arachnology** [S.I.], v. 29, n. 3, p. 354-366, 2001.
- EBERHARD, William G.; GONZAGA, Marcelo O. Evidence that *Polysphincta*-group wasps (Hymenoptera: Ichneumonidae) use ecdysteroids to manipulate the web-construction behaviour of their spider hosts. **Biological Journal of the Linnean Society** [S.I.], v. 127, n. 2, p. 429-471, 2019.
- FITTON, M. G.; SHAW, Mark R.; AUSTIN, A. D. The Hymenoptera associated with spiders in Europe. **Zoological Journal of the Linnean Society** [S.I.], v. 90, n. 1, p. 65-93, 1987.
- FITTON, Michael Geoffrey. Pimpline ichneumon-flies. Hymenoptera, Ichneumonidae (Pimplinae). **Pimpline ichneumon-flies. Hymenoptera, Ichneumonidae (Pimplinae).**, v. 7, n. 1, 1988.
- FINCKE, Ola M.; HIGGINS, Linden; ROJAS, Edgar. Parasitism of *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnathidae) by an ichneumonid (Hymenoptera, Polysphinctini) in Panama. **Journal of Arachnology** [S.I.], p. 321-329, 1990.
- GAULD, IAN D. Evolutionary patterns of host utilization by ichneumonoid parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae and Braconidae). **Biological Journal of the Linnean Society** [S.I.], v. 35, n. 4, p. 351-377, 1988.
- GAULD, Ian D.; WAHL, David B.; BROAD, Gavin R. The suprageneric groups of the Pimplinae (Hymenoptera: Ichneumonidae): a cladistic re-evaluation and evolutionary biological study. **Zoological Journal of the Linnean Society** [S.I.], v. 136, n. 3, p. 421-485, 2002.
- GAULD, Ian D.; DUBOIS, Jacques. Phylogeny of the *Polysphincta* group of genera (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae): a taxonomic revision of spider ectoparasitoids. **Systematic Entomology** [S.I.], v. 31, n. 3, p. 529-564, 2006.

GONZAGA, Marcelo O.; KLOSS, Thiago G.; SOBCZAK, Jober F. Host behavioural manipulation of spiders by ichneumonid wasps. In: **Behaviour and Ecology of Spiders**. Springer, Cham, 2017. p. 417-437.

HASSELL, M. P.; WAAGE, J. K. Host-parasitoid population interactions. **Annual review of entomology** [S.I], v. 29, n. 1, p. 89-114, 1984.

MATSUMOTO, Rikio. “Veils” against predators: modified web structure of a host spider induced by an ichneumonid parasitoid, *Brachyzapus nikkoensis* (Uchida)(Hymenoptera). **Journal of Insect Behavior** [S.I], v. 22, n. 1, p. 39, 2009.

MATSUMOTO, Rikio. Molecular phylogeny and systematics of the *Polysphincta* group of genera (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae). **Systematic Entomology** [S.I], v. 41, n. 4, p. 854-864, 2016.

NIELSEN, Edvard. Contributions to the life history of the Pimpline spider parasites (*Polysphincta*, *Zaglyptus*, *Tromatobia*) (Hym. Ichneum.). **Entomologiske Meddelelser** [S.I], v. 14, p. 137-205, 1923.

QUICKE, Donald LJ. **The braconid and ichneumonid parasitoid wasps: biology, systematics, evolution and ecology**. John Wiley & Sons, 2015.

TOWNES, Henry; TOWNES, Marjorie. Ichneumon-Flies of America North of Mexico Pt. 2: Subfamilies Ephialtinae, Xoridinae, and Acaenitinae. **Bulletin of the United States National Museum**, 1960.

WAJNBERG, Eric; BERNSTEIN, Carlos; VAN ALPHEN, Jacques (Ed.). **Behavioral ecology of insect parasitoids: from theoretical approaches to field applications**. John Wiley & Sons, 2008.

WEINERSMITH, Kelly L. What’s gotten into you?: A review of recent research on parasitoid manipulation of host behavior. **Current opinion in insect science** [S.I], v. 33, p. 37-42, 2019.