



DEPARTMENT OF SCIENCE

DOCTORAL SCHOOL

MOLECULAR, CELLULAR AND ENVIRONMENTAL BIOLOGY

XXXII CYCLE

A.A 2018/2019

**Integrative approach to the study of functional morphology and  
parasitic strategies of myrmecophilous hoverflies**

**Approccio integrativo allo studio della morfologia funzionale e  
delle strategie parassitarie dei sirfidi mirmecofili**

Ph.D. Student: Giulia Scarparo

Advisor: Prof. Andrea Di Giulio

## INDEX

RIASSUNTO IN ITALIANO.....	1
ABSTRACT.....	4
INTRODUCTION.....	6
-Social insects: the ants.....	6
-Myrmecophilous strategies.....	7
-Myrmecophilous flies: <i>Microdon</i> spp.....	10
-Aims and objectives.....	13
-References.....	14
CHAPTER 1 – Detailed morphological descriptions of the immature stages of the ant parasite <i>Microdon mutabilis</i> (Diptera: Syrphidae: Microdontinae) and a discussion of its functional morphology, behaviour and host specificity.....	21
CHAPTER 2 – Comparative morphology of myrmecophilous immature stages of European <i>Microdon</i> species (Diptera, syrphidae, Microdontinae): updated identification key and new diagnostic characters.....	43
CHAPTER 3 – Chemical deception and structural adaptation in <i>Microdon</i> (Diptera, Syrphidae, Microdontinae), a genus of hoverflies parasitic on social insects.....	66
CHAPTER 4 – First screening of microbial communities of <i>Microdon myrmicae</i> and its ant host: do microbes facilitate the invasion of ant colonies by social parasites?.....	79
DISCUSSION.....	94
CONCLUSIONS.....	99
-References.....	100

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### *Appendix A:* additional material to Chapter 1

- Supplementary file 1 (<http://www.eje.cz/2017/071/S01.mp4>). Locomotion of third instar larvae of *Microdon mutabilis*. Movements in the ventral surface observed through the transparent bottom of a Petri dish.
- Supplementary file 2 (<http://www.eje.cz/2017/071/S02.mov>).

Second instar larva of *Microdon mutabilis* feeding on a larva of *Formica cunicularia*.

### *Appendix B:* additional material to Chapter 2

- Supplementary Material 1. Locomotion of first instar larva of *Microdon myrmicae*.
- Supplementary Material 2. Locomotion of first instar larva of *Microdon analis*.

### *Appendix C:* additional material to Chapter 3

- Supplementary Material 1. Histogram of the percentage of contribution for each CHCs detected. Here contribution of CHCs to Dimension 1(A) and Dimension 2 (B) of the correspondence analysis is shown.
- Movie 1. Third instar *M. analis* larva with workers and larvae of *L. distinguendus* (*M. devius* 'host).

## RIASSUNTO IN ITALIANO

Le formiche sono tra gli organismi di maggior successo di tutto il regno animale, e devono questo loro enorme successo all'evoluzione del comportamento eusociale. Nell'eusocialità, gli adulti di una stessa colonia appartengono a due o più generazioni sovrapposte, si occupano in modo cooperativo della covata e sono divisi in caste riproduttive (regine e maschi) e non riproduttive (operaie). Questa organizzazione gli ha permesso di costruire in un tempo limitato colonie di grandi dimensioni e ben difese, diventando così il taxa dominante sulla Terra in termini di biomassa e ambienti colonizzati. Per pianificare la vita all'interno della colonia e difendere il nido dagli intrusi, le formiche hanno evoluto un complesso sistema di comunicazione basato sul riconoscimento degli idrocarburi cuticolari (CHCs). Questi sono dei lipidi che ricoprono la cuticola di tutti gli artropodi e hanno molteplici funzioni nella vita degli insetti, come, ad esempio, fornire una barriera contro la disidratazione e protezione contro le infezioni. Inoltre, molti studi hanno dimostrato il ruolo primario dei CHCs nella discriminazione tra compagni di nido e nemici (*nestmate recognition*). All'interno di una specie, le singole colonie condividono generalmente la stessa miscela di idrocarburi, ma l'abbondanza relativa di ciascun composto varia. Inoltre, sono visibili differenze nel profilo chimico delle singole caste di uno stesso nido. Le differenze tra l'odore della colonia e la miscela di idrocarburi dell'organismo sottoposto all'ispezione delle operaie consentono il riconoscimento dei nemici. Tuttavia, nonostante questo sofisticato sistema di riconoscimento, moltissimi organismi, principalmente artropodi, conosciuti con il nome di "mirmecofili", sono in grado di sfruttare le risorse della colonia e interagire con le formiche almeno per una fase del loro ciclo vitale. Tutte le circa 100.000 specie di mirmecofili finora conosciute hanno sviluppato una straordinaria diversità di strategie per sfruttare i loro ospiti. La maggior parte dei mirmecofili sono commensali o mutualisti, ma circa 10.000 specie sono parassiti sociali che si nutrono degli stadi immaturi di formiche o ingannano le operaie per rubare loro il cibo. Tra questi, uno dei più sorprendenti esempi sono i ditteri del genere *Microdon* Meigen (Diptera; Syrphidae; Microdontinae). Ad oggi sono conosciute circa 300 specie distribuite in tutto il mondo, specialmente nella fascia neotropicale, mentre solo 6 sono le specie presenti in Europa: *M. analis* (Macquart 1842), *M. major* Andries 1912, *M. devius* (Linnaeus 1761), *M. miki* Doczkal & Schmid 1999, *M. mutabilis* (Linnaeus 1758) and *M. myrmicae* Schönrogge et al. 2002. Le larve di questi sirfidi vivono durante tutto il loro periodo di sviluppo all'interno dei nidi formiche predando un gran numero di larve e pupe ospiti. Gli adulti invece sono a vita libera.

Questa tesi di dottorato ha lo scopo di esaminare in dettaglio le strategie parassitarie di questi sirfidi mirmecofili obbligati e di aumentare le conoscenze, ad oggi molto limitate, su questo interessante gruppo. Sebbene il progetto si sia

concentrato solo sulle sei specie europee, questo gruppo consente di affrontare molte questioni evolutive alla luce di diversi campi di ricerca, che possono essere generalizzate a tutte le specie di *Microdon* e, anche, ad altri mirmecofili. Per raggiungere questo scopo diverse tecniche, dalla microscopia elettronica, alla chimica, passando per lo studio del microbioma, sono state adottate e integrate. Per ampliare le conoscenze sugli stadi immaturi dei *Microdon* abbiamo iniziato studiando la morfologia esterna e l'anatomia di quattro specie (*M. analis*, *M. devius*, *M. mutabilis* e *M. myrmicae*), combinando la microscopia ottica e a fluorescenza con la microscopia elettronica a scansione e a fascio ionico (FIB \ SEM). Durante il loro sviluppo, gli stadi immaturi di *Microdon* affrontano enormi cambiamenti strutturali che rivelano un profondo polimorfismo larvale. Le larve di *Microdon* sviluppano una struttura protettiva, caratterizzata da una cuticola spessa e multistratificata, una testa retrattile, un dorso a forma di cupola e un "piede" piatto e fortemente adesivo (ventre) che rende praticamente inattaccabile il parassita. Inoltre, le larve mostrano numerose strutture peculiari come la banda marginale, la reticolazione dorsale e i *flower-like* sensilla, che variano moltissimo da specie a specie consentendone l'identificazione tassonomica. Inoltre, attraverso un'attenta e dettagliata descrizione e osservazione delle larve, abbiamo fornito nuovi caratteri che facilitano la distinzione tra le due specie criptiche, *M. mutabilis* e *M. myrmicae* e supportano la validità di quest'ultima. Inoltre, per comprendere quale strategia chimica questi parassiti abbiano evoluto per eludere il sistema di comunicazione e identificazione chimica della colonia di formiche, gli idrocarburi cuticolari (CHCs) delle larve di *Microdon* (*M. analis*, *M. devius*, *M. mutabilis*) e delle loro formiche ospiti (operaie e larve) sono stati analizzati con gas cromatografia-spettrometria di massa. I nostri studi di ecologia chimica ci hanno permesso di definire e confrontare i profili chimici degli stadi immaturi di *Microdon* e quelli delle formiche ospiti. Le larve di *Microdon* mostrano una miscela di idrocarburi cuticolare molto semplice, composta principalmente da alcani lineari, quasi totalmente condivisa con quella delle larve ospiti, suggerendo la presenza di un mimetismo chimico con quest'ultime. Esperimenti di isolamento hanno rilevato che la biosintesi attiva degli idrocarburi sembra essere la strategia adottata da queste mosche, anche se un camuffamento chimico (acquisizione passiva dei CHCs con la dieta o il contatto con il nido e / o le formiche) potrebbe essere usato come strategia aggiuntiva, specialmente in *M. analis* e *M. devius*. A differenza delle larve di *M. mutabilis*, che sono quasi interamente lisce con reticolazione limitata a una stretta banda dorsolaterale, *M. analis* e *M. devius* mostrano una reticolazione dorsale fortemente sviluppata, composta di lunghi ciuffi cuticolari, che in queste due specie ricoprono completamente il dorso della larva. Per questo, ipotizziamo che *M. analis* e *M. devius* possano usare la loro reticolazione dorsale come una spugna, acquisendo tutti quegli idrocarburi più complessi che non riescono a sintetizzare da sole, aumentando la similarità con il profilo chimico dell'ospite. Al fine di capire se alcuni batteri simbiotici rivestano

un qualche ruolo nell'interazione ospite-parassita tra formiche e *Microdon*, abbiamo condotto un'analisi preliminare mediante sequenziamento di ampliconi 16S, per caratterizzare le comunità batteriche associate alle larve di terzo stadio di *M. myrmicae* e alle larve e operaie dell'ospite, *Myrmica scabrinodis* in due popolazioni diverse. Inoltre, sia per l'ospite che per il parassita, abbiamo analizzato separatamente il microbioma della superficie esterna della cuticola e il microbioma interno del corpo (emolinfa e intestino). I risultati mostrano chiaramente che il microbioma di *M. myrmicae* è significativamente diverso da quello del suo ospite, (sia larve di formiche che operaie). Inoltre, mentre le comunità batteriche delle formiche non variano tra le due popolazioni, sono state osservate differenze significative nel microbioma del parassita, segno che i gruppi dominanti di batteri presenti in *M. myrmicae* sono influenzati dall'ambiente circostante piuttosto che da una trasmissione orizzontale tra ospite / parassita. Il microbioma di *Myrmica* è caratterizzato principalmente dalle famiglie delle Streptococcaceae, Carnobacteriaceae e Rizzobiaceae e il genere *Spiroplasma* è preponderante nelle operaie delle formiche. Il microbioma delle larve di *M. myrmicae* ospita, invece, un'elevata quantità di Anaplasmataceae, di cui *Wolbachia* è il genere predominante. Inoltre, abbiamo riscontrato la presenza di *Serratia* spp. sia nelle larve di *Microdon* che di *Myrmica*. Questo batterio produce una famiglia di pirazine comunemente coinvolte nella comunicazione tra formiche che potrebbe potenzialmente avere un ruolo significativo nell'associazione formica-parassita. Ulteriori analisi sono necessarie per capire se alcuni batteri ospitati dalle larve di *M. myrmicae* possano favorire la sua sopravvivenza all'interno dei nidi di formiche.

Lo studio di questi parassiti sociali integrando diverse tecniche esplorative potrebbe aiutare a chiarire l'evoluzione delle strategie parassitarie, nonché la loro tassonomia incerta, causata dalla presenza di numerose specie criptiche, e a comprendere meglio il loro ciclo di vita ancora parzialmente oscuro.

## ABSTRACT

Although ants are very aggressive against intruders, numerous ant parasites live within the colony, exploiting the resources of the nest. Among the most striking examples of these parasites are the larvae of *Microdon* hoverflies (Diptera; Syrphidae; Microdontinae), which can feed undisturbed upon ant brood. We studied the sophisticated structural and chemical parasitic strategies evolved by the European species of *Microdon* and their associations with bacteria. Study of these myrmecophiles is challenging since they are rare, extremely localized in small patches of wetland areas, increasingly degraded and endangered, and live in concealed environments (the ant nests). To improve our knowledge of the scarcely known immature stages of *Microdon*, we analysed the functional morphology and anatomy of four species (*M. analis*, *M. devius*, *M. mutabilis* and *M. myrmicae*), integrating optical and fluorescence microscopy with focused ion beam-scanning electron microscopy (FIB/SEM). During their development, *Microdon* immature stages undergo major structural changes showing a deep larval polymorphism. *Microdon* larvae develop a protective structure, characterized by a thick and multi-layered cuticle, retractile head, dome-shaped dorsum, and a flat and strongly adhesive "foot" (venter). Furthermore, the larval body has numerous peculiar structures such as the marginal band, the dorsal reticulation, and the "flower-like" sensilla. We document newly discovered morphological features which support the specific validity of *M. myrmicae*, formerly a cryptic species of *M. mutabilis*. In addition, we analyzed the cuticular hydrocarbons (CHCs, the primary recognition cues in the nestmate recognition) of *Microdon* larvae (*M. analis*, *M. devius*, *M. mutabilis*) and their host ants (workers and larvae) with gas chromatography-mass spectrometry, in order to discover which chemical strategy these parasites have evolved to break the chemical communication and identification system of ant colony. Chemical ecology studies allowed us to define and compare the chemical profiles of *Microdon* immature stages and those of the host ants. *Microdon* larvae show a very simple cuticular hydrocarbon blend, mainly composed of linear alkanes, almost totally shared with that of the host larvae, suggesting the presence of a chemical mimicry. The active biosynthesis of these hydrocarbons seems to be the strategy adopted by these fascinating flies, even though a chemical camouflage, acquired with the diet or the contact with the nest and/or the ants, could be used as an additional strategy. To determine if some bacteria might play a role in the host-parasite interaction between ants and *Microdon*, we provide the first microbiome survey of microbial communities of two populations of third instar larvae of *M. myrmicae* and larvae and workers of its host, *Myrmica scabrinodis*, using high throughput 16S amplicon sequencing. Furthermore, for both the host and the parasite we analysed the microbiome of the external surface of the cuticle

and the internal microbiome of the body separately. The results clearly show that the microbiome of the *M. myrmicae* is significantly different from that of its host, both ant larvae and workers. Moreover, while the bacterial community of the ants does not change in the two populations, significant differences were observed in the external microbiome of the parasite. This would mean that the dominant groups of bacteria within *M. myrmicae* are acquired by the surrounding environment rather than by a horizontal transmission between host/parasite. Families Streptococcaceae, Carnobacteriaceae, and Rizhobiaceae are dominant in *Myrmica* microbiome, and *Spiroplasma* genus is preponderant in ant workers. The microbiome of *M. myrmicae* larvae is mainly characterized by the high quantity of species in the family Anaplasmataceae, of whom *Wolbachia* is the predominant genus. We detected *Serratia* spp. within *Microdon* and *Myrmica* larvae. This bacterium produces a family of pyrazines commonly involved in ant communication and could potentially have a significant role in ant-parasite association. Further analyses are necessary to investigate whether some bacteria harboured by *M. myrmicae* larvae could promote its survival inside the ant nests.