

Raport științific

despre activitățile derulate în cadrul proiectului **PN-III-P1-1.1-PD-2016-1272**

număr contract: 81/2018 având titlul

Imunitate individuală și socială: mecanisme de apărare la mai multe niveluri la furnicile Myrmica împotriva unei ciuperce ectoparazitice

Abstract

Sistemele gazdă-parazit oferă modele excelente pentru studii de coevoluție. Cele două organisme sunt legate intrinsec, dar interesele lor evolutive sunt diferite. Însă nu doar organismele solitare pot avea paraziți, ci și organismele care trăiesc în sisteme sociale dezvoltate ca furnicile. Astfel sistemul social al furnicilor este parazitat de foarte multe organisme și, în unele cazuri, paraziții induc schimbări în fiziologia și comportamentul gazdelor de furnici. Pentru a se apăra, furnicile au dezvoltat o varietate de adaptări împotriva paraziților, de la adaptări comportamentale, până la adaptări fiziologice și imunologice, tocmai pentru a reduce virulența și transmiterea agenților entomopatogeni. Mai mult în afară de strategii individuale, organismele sociale au o opțiune suplimentară pentru a se apăra împotriva agenților patogeni, mecanisme sociale. Această linie de apărare este cunoscut sub numele de „sistemul imunitar social”. Imunitatea socială de asemenea este manifestat prin mecanisme comportamentale care se manifestă la nivelul societății. În cadrul proiectului meu propun studiul strategiilor individuale și sociale de apărare, care ajută furnicile să controleze infecția cu ciuperca ectoparazită *Rickia wasmannii*. Voi investiga mecanismele de apărare de la nivelul individului până la nivelul societății. Obiectivele mele sunt: investigarea răspunsului imunitar al indivizilor la infecție, costurile (reducerea supraviețuirii) și eventualele beneficii colaterale (facilitare imunitară) ale acestei relații parazitice, mecanismele de apărare sociale care ar putea împiedica infiltrarea și transmiterea parazitului, și modul în care rețeaua socială se schimbă în

pragul unei epidemii parazitice. Studiul interacțiunilor furnică-ciupercă ne permite să clarificăm modul în care paraziții și agenții patogeni afectează prin indivizi sistemul social.

I. Introducere

Apariția sistemului social la anumite animale pare să fie o strategie de succes în ceea ce privește protecția față de paraziți, deoarece comportamentul igienic social poate fi foarte eficient în combaterea paraziților, a patogenilor. Cu toate acestea, animalele care trăiesc în sisteme sociale dezvoltate nu sunt lipsite de astfel de organisme antagonice. Sistemul social al furnicilor este și ea o țintă foarte atractivă pentru multe organisme parazite, deoarece reprezintă o concentrație mare de gazde potențiale, similare din punct de vedere genetic, iar frecvența mare a interacțiunilor și suprapunerea generațiilor asigură răspândirea rapidă și persistența paraziților, patogenilor. O gamă largă de organisme sunt capabile să paraziteze sistemul social al furnicilor: bacterii, ciuperci, acarieni, cestode, nematode, coleoptere, fluturi, ba chiar și alte furnici (Schmid-Hempel 1998). Între organismele mirmecoparazite ciupercile constituie una dintre cele mai diverse grupe atât în privința sistematicii cât și în ceea ce privește stilul lor de viață. Relațiile antagonice dintre ciuperci și furnici sunt multe tipuri: facultative și obligatorii, ecto- și endoparazitice, neutre și letale (Roy și colab. 2006, Vega și colab. 2009, Blackwell 2010, Hughes și colab. 2011, Csata și colab. 2013, Csata și colab. 2014, Csata și colab. 2016a, b, Csata și colab. 2018).

Asocierile obligate între diferite organisme implică adaptări speciale din partea celor două părți. În cazul asocierilor parazite furnici-ciuperci aceste adaptări pot asigura supraviețuirea și dispersia ciupercii, ori și gazda poate dezvolta anumite strategii de reducere a efectelor provocate de parazit. Furnicile sunt cunoscute, în general, pentru aplicarea a mai multor strategii de combatere a agenților patogeni, de ex. producția de secreții cu efecte fungicide, creșterea frecvenței autocurățării, evitarea patogenilor. Aceste strategii individuale sunt însă completate cu strategii profilactice sociale: creșterea frecvenței allocurățării, îndepărtarea sau excluderea indivizilor infestați sau a cadavrelor infestate, chiar și auto-excluderea indivizilor infestați din societate, precum și mutarea întregii colonii (Poulsen și colab. 2002, Fernández-Marín și colab. 2006, Walker și Hughes 2009, Heinze și Walter 2010, Walker și Hughes 2011, Konrad și colab. 2012, Maák și colab. 2014).

Dealungul evoluției indivizii și sistemele sociale au dezvoltat trei mecanisme de apărare: (1) „border defence” – constă în blocarea intrării paraziților în organismul gazdei; (2) „soma defence” – înseamnă blocarea multiplicării patogenilor odată intrați în sistemul gazdei; (3) „germ line defence” – patogenii sunt preveniți să ajungă în organele reproductive, sau (în cazul sistemului social) în indivizi reproductivi, de ex. în măci la insecte sociale. Insectele au un sistem imunitar dezvoltat, care diferă de la vertebrate. Imunitatea socială constă în acele mecanisme de apărare care previn sau combat răspândirea patogenilor/paraziților între indivizi în cazul speciilor care trăiesc în sisteme sociale. Astfel de comportament este de ex. la furnici (și nu numai) îngrijirea reciprocă între indivizi. Imunitatea individuală constă în reacții celulare și umorale, și este asistat de comportament profilactic. Imunitatea celulară are două mecanisme principale: fagocitoză și încapsulare. Există două căi de semnalizare (Toll, Jak/Stat) care au rol în adaptarea imunologică a insectelor, adică în cazul apariției unor patogeni ca ciuperci sau bacterii acestea duc expresia unor gene care codează peptide antibacteriene și/sau fungicide.

Din studiile anterioare se cunoaște faptul că vârsta și o infecție acută are efect asupra imunocompetenței. În cadrul studiului nostru am început să analizăm efectul vârstei și infecției acute asupra răspunsului imunitar la furnic. Pentru a măsura imunocompetența am început să măsurăm expresia a trei gene diferite: defensina, catepsina și profenoloxidaza, despre care se cunoaște că sunt implicate în imunitatea celulară și umorală (Konrad și colab. 2016). Problematika variabilității imunocompetenței în funcție de vârstă nu a fost studiată niciodată la furnici.

Specia studiată

Specia studiată este *Myrmica scabrinodis* Nylander, 1846, care este parazitată de către ciuperca *Rickia wasmannii* (Ascomycetes: Laboulbeniales), care trăiește în mod obligatoriu pe suprafața furnicilor. Ciuperca nu are micelii, talusul se dezvoltă din doi ascospori. Din studiile anterioare se cunoaște faptul că la indivizi infestați cuticula este mai subțire decât la cele neparazitizate (Csata și colab. 2018). La indivizi infestați crește frecvența auto-curățării, iar durata de viață se reduce semnificativ (Csata și colab. 2014). În cadrul proiectului am propus

studiul relațiilor parazitice între specia *Myrmica scabrinodis* (furnica gazdă) și ciuperca parazită *Rickia wasmannii*. Propunem elucidarea adaptărilor atât din partea gazdelor, precum și din partea paraziților, respectiv mecanismele care stau la baza adaptărilor identificate (Fig 1, 2).

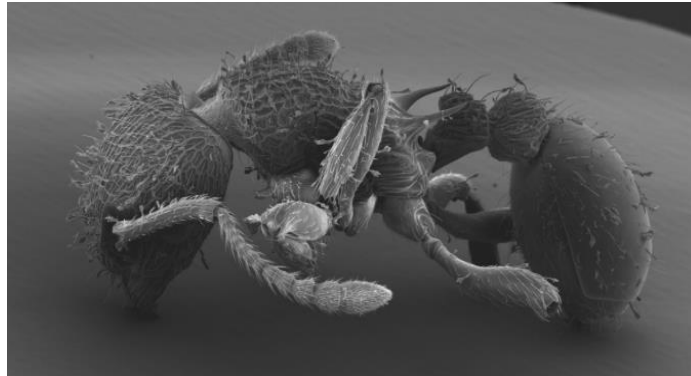


Fig. 1. *Myrmica scabrinodis* infestat cu *Rickia wasmannii* de la populația de la Luna de Jos, jud. Cluj (fotografie SEM).

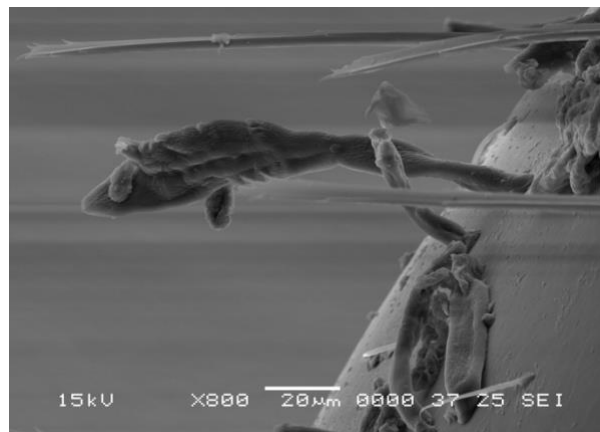


Fig. 2. Ciuperca ectoparaziță *R. wasmannii* pe abdomenul gazdei *Myrmica scabrinodis*.

În prima etapă, după planificarea inițială, am început activitățile de cercetare pentru atingerea următoarelor obiective:

- (1) Identificarea schimbărilor produse de infecție la nivelul imunocompetenței.
- (2) Identificarea relația între cost (reducerea duratei de viață) și beneficii potențiale (răspuns imunitar facilitat).

II. Întrebări și ipoteze

Un patogen virulent poate cauza reducerea semnificativă a imunocompetenței unui individ, însă o infecție de nivel scăzut poate stimula sistemul imunitar al individului, în același timp pregătind individul și pentru un atac al unui alt patogen.

În cadrul cercetării am vrut să aflăm relația între cost (reducerea duratei de viață) și beneficii potențiale (răspuns imunitar facilitat) în ceea ce privește relația dintre *M. scabrinodis* și ciuperca ectoparasită *R. wasmannii*. Am vrut să obținem răspunsuri pentru următoarele întrebări: oare infecția afectează răspunsul imunitar al indivizilor, respectiv dacă imunocompetența variază și în funcție de vârstă (între lucrătoare tinere și vârstnice). Aceste probleme nu au fost studiate niciodată în cazul acestui sistem.

III. Materiale și metode

În această etapă am efectuat planificarea activităților în cadrul proiectului. Activitățile din această etapă se s-au concentrat asupra 2 obiective majore. În cazul a tuturor obiective o activitate comună era colectarea pe teren a materialului viu, respectiv managementul datelor și analize exploratorii.

Activitatea 1. Colectări pe teren. Colectările au fost efectuate în cazul speciei *Myrmica scabrinodis* parazitată de ciuperca *Rickia wasmannii* dintr-o singură populație din județul Cluj la Borșa Cătun, unde coloniile infestate și neinfestate sunt prezente concomitent. Indivizii au fost colectați în mod aleator din colonie în cadrul lunii aprilie, mai. Indivizii pentru studii comportamentale și cele destinate altor studii au fost colectate din aceleași colonii, astfel asigurându-se posibilitatea ca rezultatele obținute din fiecare activitate să poate fi conectate și astfel să ne dea șansa formulării unor concluzii complexe. Indivizii folosiți în studii comportamentale au fost aduse în laborator și erau ținute în colonii artificiale în condiții standard respectând normele eticii de cercetare, iar cele destinate pentru alte studii au fost păstrate în lichid de preservare.

Activitatea 2. Experimente. În total am colectat 10 colonii (5 infestat, 5 neinfestat), care am împărțit între 20 de cuiburi artificiale (10 infestate și 10 neinfestate), și am ținut în cameră climatică. Fiecare cuib a conținut o regină, 50 de lucrătoare în vârstă, 20 de lucrătoare tinere, 20 de pupe și 10 larve. Furniciile au primit o hrană standard (amestec special de zahăr și proteine) de trei ori pe săptămână (luni, miercuri, vineri). La apariția primelor lucrătoare noi am marcat pe acești indivizi și am urmărit activitatea lor timp de 16 săptămâni (pentru ciuperca *R. wasmannii* aproximativ 2 săptămâni trebuie ca să se dezvolte). Am urmarit șanselor de

supraviețuire a indivizilor infestați și neinfestați. Am conservat indivizii cu azot lichid și le am păstrat la -80°C până la transportarea lor la Universitatea din Regensburg.

Fiecare colonie artificială se compune din două compartimente: unul mare ($5,5 \times 5,5$ cm) și unul mai mic ($2,5 \times 2,5$ cm). Între cele două camere am realizat un coridor (6,5 cm) (Fig.4). Furnicile colectate au fost puse în compartimente special amenajate. Primele experimente prezentate în cadrul planului de cercetare (efectul parazitului asupra longevității) au fost deja efectuate cu succes. Astfel analiza rezultatelor dovedește clar că prezența ciupercii reduce considerabil șansele de supraviețuire a indivizilor infestați (Fig. 3. GLMM, $z = 3,48$, $p < 0,0001$, $n = 1138$).

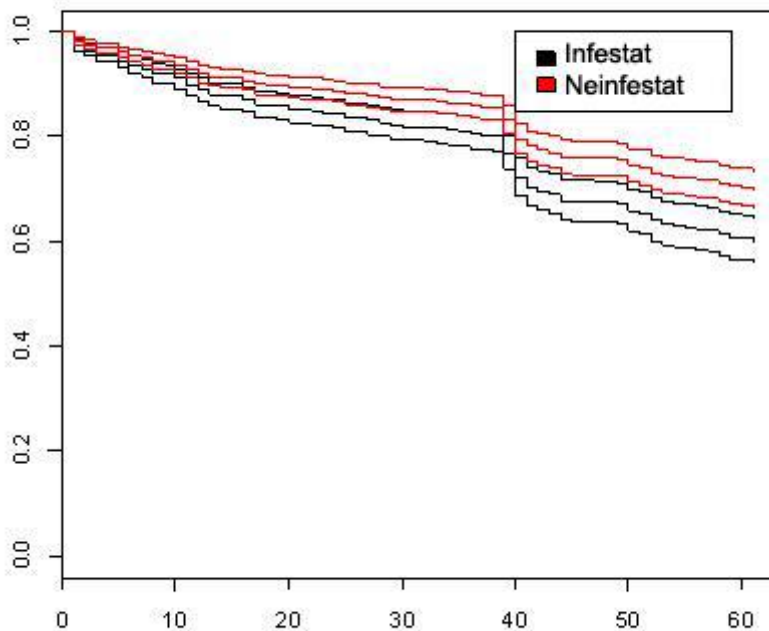


Fig. 3. Diagrama supraviețuirii indivizilor *Myrmica scabrinodis* infestate și neinfestate

Activitatea 3a. Studii imunologie: Analiza expresiei genelor. Am început analizarea expresia a trei gene diferite: Defensina 1 (Def1), Catepsina (Cath), Profenoxidaza (PPO) cu real-time qPCR la indivizi infestate și sănătoase. Trei căi de semnalizare au rol în lupta împotriva patogenilor: PO/PPO calea de semnalizare are rol în vindecarea rănilor, și în apărarea împotriva fungilor; defensin 1 și catepsin au rol împotriva bacteriilor și fungilor. În studiul asta am folosit indivizi marcați în Activitatea 2 și am început analizarea expresia genelor imune în Universitatea din Regensburg (Departamentul de Zoologie și Biologie Evolutivă al

Universității din Regensburg, Germania, condus de prof. dr. Jürgen Heinze (318 publicații, H-index 48, 7730 citări, Scopus).

Activitatea 3b. Studii de imunologie: encapsulație. Infecția cu ciuperci poate avea efecte negative asupra sistemului imunitar al gazdei în cazul unei infecții puternice, iar o infecție ușoară poate avea efecte pozitive, punând în alertă sistemul imunitar. Această temă nu a fost studiată în cazul asocierilor obligate furnici-ciuperci, numai la ciuperci generaliste entomopatogene (Konrad și colab. 2012), dar în aceste cazuri nici-o adaptare specifică nu este așteptată, față de cele provocate de organisme mirmecoparazite obligate. În cazul speciei *Myrmica scabrinodis* am efectuat teste pilot de encapsulație, metodă eficientă pentru caracterizarea imunocompetenței gazdei. Această metodă este folosită în mod standard în cazul furnicilor (Vainio et al. 2004). Testele au fost efectuate în laboratorul de la UBB.

Activitate 4. Analiza datelor. Datele obținute au fost introduse în fișiere Excel, am identificat metodele statistice care sunt adecvate pentru analiza lor și s-a început analiza exploratorie a datelor în R.

IV. Rezultate etapei

În această etapă am obținut următoarele rezultate:

(1) În urma analizelor am aflat că ciuperca *Rickia wasmannii* Cavara, 1899 are un efect negativ asupra *Myrmica scabrinodis*. Ciuperca *Rickia wasmannii* a redus supraviețuirea indivizilor infestate.

(2) Am început testarea metodele de analiză a imunocompetenței la *M. scabrinodis* (Universitate de Regensburg).

(3) La momentul actual am predat deja un prim articol (director de proiect este prim-autor):

Csata, E*., Billen, J., Barbu L., Markó, B. 2019. Inside Pandora's box: development of the lethal myrmecopathogenic fungus *Pandora formicae* within its ant host. *Subm. International Journal of Parasitology*. **IF 3.85**

(4) Am participat trei conferințe internaționale: Franța, Germania, Austria (2 prezentare, 3 co-prezentare):

1. **Csata E.**, Ecuadero, A.P. & Dussutour A. 2019. Ants' nutrition: who is pulling the strings?. Central European Workshop of Myrmecology (CEWM), 27-29 September, Regensburg, Germany (talk).
2. **Csata E.**, Lévesque T., Bach A., Blanchet J., Ferrante J., Fournier F., Ponthieu R. & Dussutour A. 2019. Collective abilities in ants facing complex nutritional challenge. Central European Meeting of IUSSI, March 19-22, Vienna, Austria (talk).

Co-authored talks

1. Markó B*, Fazakas, Zs., Csiki, Zs. & **Csata E.** 2019. Could division of labour be influenced by a parasitic fungus in ants?. Central European Meeting of IUSSI, March 19-22, Vienna, Austria.
2. **Csata, E.**, Billen, J., Barbu, L. & Markó, B*. 2019. Inside Pandora's box: development of the lethal myrmecopathogenic fungus *Pandora formicae* within its ant host. Central European Workshop of Myrmecology (CEWM), 27-29 September, Regensburg, Germany.
3. Sanmartín-Villar, I*, **Csata, E.** & Jeanson, R. 2019. Do ant castes differ in behavioural variability? 19ème Colloque de Biologie de l'Insecte, 26-28 June, Albi, France.

V. Bibliografie selectivă

- Csata E, Billen J, Bernadou A, Heinze J, Markó B 2018 Infection-related variation in cuticle thickness in the ant *Myrmica scabrinodis* (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Soc*, 1–4.
- Csata E*, Timuş N*, Witek M*, Casacci L.P, Luca C, Bagnères AG, Sztencel-Jabłonka A, Barbero F, Bonelli S, Rákósy L, Markó B 2017. Lock-picks: fungal infection facilitates the intrusion of strangers into ant colonies. *Sci Rep*, 7, 46323.
- Csata E, Bernadou A, Rákósy-Tican E, Heinze J, Markó B 2017 The effects of fungal infection and physiological condition on the locomotory behaviour of the ant *Myrmica scabrinodis*. *J Ins Physiol*, 98: 167–172.
- Csata E, Czeker Zs, Erős K, Németh E, Hughes M, Csósz S, Markó B 2013 Comprehensive survey of Romanian myrmecoparasitic fungi: new species, biology and distribution. *North-West J Zool* 9(1): 23–29.

- Csata E, Erős K, Markó B 2014 Effects of the ectoparasitic fungus *Rickia wasmannii* on its ant host *Myrmica scabrinodis*: changes in host mortality and behavior. *Insect Soc* 61: 247–252.
- Espadaler X, Santamaria S 2012 Ecto- and endoparasitic fungi on ants from the Holarctic region. *Psyche* doi:10.1155/2012/168478.
- Fernández-Marín H et al. 2006 Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proc Soc B* 273: 1689–1695.
- Heinze J, Walter B 2010 Moribund ants leave their nests to die in social isolation. *Curr Biol* 20: 249–252.
- Hughes DP et al. 2011 Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. *BMC Ecol* 11: 13.
- Konrad M et al. 2012 Social transfer of pathogenic fungus promotes active immunisation in ant colonies. *PLoS Biology* 10(4):e1001300.
- Konrad M et al. 2014 Anti-pathogen protection versus survival costs mediated by an ectosymbiont in an ant host. *Proc Roy Soc B* 282: 1471–2954.
- Lapeva-Gjonova A, Santamaria S 2011 First records of Laboulbeniales (Ascomycota) on ants (Hymenoptera: Formicidae) in Bulgaria. *ZooNotes* 22: 1–6.
- Maák I, Markó B, Erős K, Babik H, Ślipiński P, Czechowski W 2014 Cues or meaningless objects? Differential responses of the ant *Formica cinerea* to corpses of competitors and enslavers. *Anim Behav* 91: 53–59.
- Markó B, Erős K, Németh E, Csata E, Hughes M, Czekes Zs, Rózsa L 2014 Prevalence of the myrmecoparasitic fungus *Rickia wasmannii* Cavara (Ascomycetes: Laboulbeniales) on different levels: from host individuals to populations (in prep.)
- Martin SJ et al. 2009 Polygyny reduces rather than increases nestmate discrimination cue diversity in *Formica exsecta* ants. *Insect Soc* 56(4): 375–383.
- Poulsen M et al. 2002 Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behav Ecol Sociobiol* 52: 151–157.
- Roy HE et al. 2006 Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu Rev Entomol* 51: 331–357.
- Schmid-Hempel P 1998 *Parasites in social insects*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Vainio L et al. 2004. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*; effects of the nest, body size and sex. *Evol Ecol* 18: 75–84.

- Vega FE et al. 2009 Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fung Ecol* 2: 149–159.
- Walker TN, Hughes WOH 2009 Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. *Biol Lett* 5: 446–448.
- Walker TN, Hughes WOH 2011 Arboreality and the evolution of disease resistance in ants. *Ecol Entomol* 36: 588–595.
- Witek M, Barbero F, Markó B 2014 *Myrmica* ants host highly diverse parasitic communities: from social parasites to microbes. *Insect Soc* 61: 307–323.

Director proiect

Universitatea Babeş-Bolyai
Facultatea de Biologie și Geologie

02.12.2019

dr. Csata Enikő

