

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Mgr. Jan Křivánek

**Reprodukční strategie termita *Silvestritermes minutus* a její důsledky
pro životní cyklus a ekologický úspěch**

Reproductive strategy of the termite *Silvestritermes minutus* and its
consequences for the life history and ecological success

Rigorózní práce

Školitel: Mgr. Robert Hanus, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 1. 2020

Podpis:

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval veškerým mým spolupracovníkům z ÚOCHB AV ČR - ze seniorské výzkumné skupiny Roberta Hanuse i dalších, díky jejichž práci a specializacím vůbec bylo možné objasnit mnohé taje ze života termitů (Kláře Dolejšové, Marii Pangrácové, Pavlíně Kyjakové, Janě Brabcové, Janě Havlíčkové, Jarmile Titzenthalerové, Ondřeji Lukšanovi, Barboře Szákové, Natanu Horáčkovi, Aleši Macharovi i mnohým dalším). Zejména však děkuji samotnému Robertovi Hanusovi, s nímž jsme společně strávili nejednu krušnou chvíli v rovníkovém pralese, při laboratorní práci nebo při zpracovávání dat do publikací. Našim belgickým kolegům z Université Libre de Bruxelles, kteří se s námi pravidelně vydávají na společné expedice (Simon Hellemans, Nicolas Kaczmarek a Yves Roisin) velmi děkuji za pomoc při vyhledávání a sběru termitích kolonií. Významný dík pak patří kolegům na partnerském pracovišti Université Paris-Est Créteil, (Virginie Roy, Romain Fougeyrollas a David Sillam-Dussès) za provedení genetických analýz. Jen těžko bychom mohli náš výzkum vykonávat, nebýt podpory vedení (Philippe Cerdan i.m., Régis Vigouroux) i personálu terénní stanice HYDRECO u přehrady Petit Saut ve Francouzské Guyaně. Především díky té nám bylo umožněno provádět velkou část pozorování či experimentů přímo v přírodních podmínkách. V neposlední řadě děkuji své ženě Miroslavě Křivánkové, která má mimořádné pochopení pro moje časté pracovní cesty a expedice a je mi stálou morální oporou. Právě tak děkuji své nejlepší kamarádce Denise Bovškové, která se ochotně chopila korektur a svým dalším přátelům a celé své rodině za to, že ve mně neztratili víru. Grantové Agentuře Univerzity Karlovy (projektu č. 358815) děkuji za finanční prostředky pro výzkum a Katedře ekologie za to, že i po dokončení magisterského studia mi zůstala stále otevřenou.

Abstrakt

Smíšené reprodukční strategie jsou unikátním způsobem, jak pomocí střídání pohlavně a nepohlavně vzniklých generací potomstva získat výhody z obou mechanismů. U termitů byla taková strategie poprvé popsána v roce 2009 a pojmenována Asexual Queen Succession (AQS). Rozmnožování většiny termitích druhů je založeno na přítomnosti jediného páru dlouhověkých pohlavních jedinců, primárního krále a královny, kteří ve striktní monogamii produkují všechny ostatní členy kolonie klasickým sexuálním procesem. U několika málo druhů však bylo pozorováno, že královna zakladatelka je v určité fázi nahrazena harémem neotenických královen, které vznikají z neoplozených vajíček s pomocí thelytokní partenogeneze a rozmnožují se s původním králem. Zatímco dělníci, vojáci a okřídlení králové a královny jsou i nadále produkováni pohlavní cestou, další generace neotenických královen opět vznikají partenogeneticky a doplňují přítomný harém. Dokud žije původní král, zůstává genetická struktura většiny potomstva v kolonii stejná, jako by byla královna zakladatelka stále přítomna. Díky velkému počtu královen však stoupá celková plodnost kolonie, kontinuální obnova harému partenogenů zároveň nabízí teoreticky neomezené prodloužení plodného života kolonie.

Ve své práci jsem se podílel na popisu AQS u neotropického termita *Silvestritermes minutus* a zajímal se o vliv AQS na biologii tohoto druhu. Zjistili jsme, že *S. minutus* tuto neobvyklou strategii nevyužívá k prodloužení života kolonie, ale právě naopak k co největšímu zrychlení životního cyklu a maximální investici do potomstva díky vysokému počtu královen během tří let života kolonie. V posledním roce života kolonií dojde k jedinému masivnímu rojení a následně jejich zániku. Disperze okřídlených jedinců a zakládání nových kolonií je zprostředkováno pomocí pohlavního feromonu vylučovaného budoucí královnou. Ten jsme s pomocí chemické analýzy extraktu feromonových žláz, v kombinaci s elektrofyziologií a behaviorálními pokusy, identifikovali jako směs dvou těkavých dvanáctiuhlíkatých nenasycených alkoholů. Studium populační genetiky na rozloze 5 km² nebyla zjištěna významná genetická strukturace, což prokázalo značnou schopnost disperze okřídlených jedinců i na větší vzdálenosti. Zároveň jsme tak potvrdili biparentální sociální strukturu většiny kolonií s pouze několika odchylkami, které poukázaly na méně obvyklou reprodukční strukturu u zanikajících kolonií po jejich vyrojení.

Klíčová slova: společenský hmyz, termiti, Termitidae, reprodukční strategie, Asexual Queen Succession, partenogeneze, pohlavní feromon, populační genetik

Abstract

Mixed reproductive strategies are unique modes of reproduction, in which the organisms alternate sexual and asexual offspring production to benefit from both processes. In termites, such a strategy was first described in 2009 and dubbed Asexual Queen Succession (AQS). Reproduction in most termite species is based on a presence of one pair of long-lived reproductives, the primary king and queen, producing in a lifelong strict monogamy all other colony members using classical sexual processes. In a few rare species, the primary queen has been observed to be replaced at some stage of colony development by a harem of neotenic queens. These arise from unfertilized eggs via thelytokous parthenogenesis and reproduce with the founding king. While the workers, soldiers and winged dispersing reproductives remain to be produced sexually, new generations of parthenogenetic neotenic queens appear in the colony to supplement the harem. As long as the founding king is alive, the genetic constitution of most offspring remains identical as if the founding queen would still be alive, while the overall fecundity of the colony increases thanks to the large number of queens. At the same time, the continuous renewal of the harem by new parthenogens offers a virtually unlimited lifespan extension to the colony.

In my work, I contributed to the description of AQS in the neotropical termite *Silvestritermes minutus* and studied the impact of AQS on its biology. We found that *S. minutus* does not use this unusual strategy to extend the colony lifespan; instead, AQS serves as a way how to accelerate the colony life cycle and maximize the investment into the offspring within a three-year colony lifespan thanks to the presence of multiple queens. During the third year, a massive dispersal of winged reproductives takes place, followed by a decline of the colony. Dispersal of winged kings and queens and foundation of new colonies is mediated by a sex pheromone secreted by the future queen. We identified this pheromone in *S. minutus* using chemical analyses of pheromone gland extracts, behavioral assays and electrophysiology, as a blend of two volatile unsaturated alcohols with twelve carbon atoms. In a population genetics study on an area of 5 km², we did not observe any significant genetic structuration, which suggests significant dispersal abilities of winged dispersers. In the same study, we confirmed the biparental social structure in most studied colonies, with only a few exceptions, indicating unusual breeding structures in declining colonies after the dispersal.

Keywords: social insects, termites, Termitidae, reproductive strategies, Asexual Queen Succession, parthenogenesis, sexual pheromone, population genetics

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. SEZNAM PUBLIKACÍ	10
2.1. Magisterská diplomová práce	10
2.2. Články v mezinárodních časopisech s impaktním faktorem	10
3. AUTORSKÝ PODÍL.....	11
4. VLASTNÍ PUBLIKACE	12
4.1. Asexual queen succession mediates an accelerated colony life cycle in the termite <i>Silvestritermes minutus</i>	12
4.2. Dispersal and mating strategies in two neotropical soil-feeding termites, <i>Embiratermes neotenicus</i> and <i>Silvestritermes minutus</i> (Termitidae, Syntermitinae)	28
4.3. Sex-pairing pheromones in three sympatric neotropical termite species (Termitidae: Syntermitinae)	42
5. ZÁVĚR.....	57
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58

1. ÚVOD

Pro většinu mnohobuněčných organismů je klíčovým mechanismem šíření genů pohlavní rozmnožování. Přestože však má mnoho dobře známých výhod, naráží na četná omezení, jako jsou například nákladnost a rizikovost samotného procesu nebo snížení genetického vkladu jedince do dalších generací. Proto se u mnoha organismů uplatňuje i rozmnožování nepohlavní, ať už jako jediný způsob rozmnožování nebo v kombinaci s pohlavním procesem.

Střídáním pohlavních a nepohlavních mechanismů v životním cyklu organismů vznikají rozmanité smíšené reprodukční strategie, které propojují výhody obou procesů. V posledním desetiletí byly takové smíšené strategie objeveny také u několika druhů termitů. U druhu *Reticulitermes speratus* (Rhinotermitidae) byla v roce 2009 popsána strategie, při níž královna zakladatelka velmi záhy po založení kolonie umírá a je nahrazena harémem až několika stovek neotenických královen, které vznikají nepohlavně z neoplozených vajíček pomocí thelytokní partenogeneze¹. Tyto královny se páří s králem zakladatelem a dávají vznik ostatním členům kolonie - dělníkům, vojákům a budoucím okřídleným králům a královnám - pohlavní cestou. Partenogenetické královny produkují další generace partenogenetických dcer. Harém tak s časem roste, nicméně genetická struktura kolonie jako celku zůstává stejná, jako by byla primární královna stále přítomna. Tato originální smíšená reprodukční strategie byla nazvána *Asexual Queen Succession* (AQS) a následně objevena u dalších dvou druhů téhož rodu, což po jistou dobu vedlo k názoru, že AQS je jedinečným fenoménem omezeným právě na rod *Reticulitermes*^{2,3}. Využití této strategie bylo ale později objeveno i u dalších druhů termitů, přičemž se jeho podoba značně liší na fylogenetické, genetické i ontogenetické úrovni a má rozmanité důsledky pro jejich ekologii. Dva roky před mým příchodem do výzkumné skupiny Mgr. Roberta Hanuse Ph.D. *Chemie společenského hmyzu* na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (ÚOCHB AVČR), objevili kolegové strategii AQS u dvou vzájemně si nepříbuzných druhů jihoamerických termitů čeledi Termitidae, tj. *Cavitermes tuberosus* (Termitidae: Termitinae)⁴ a *Embiratermes neotenicus* (Termitidae: Syntermitinae)⁵, což naznačovalo opakovaný evolučně nezávislý vznik této strategie. Během terénních výprav do lesů Francouzské Guyany několikrát pozorovali primárního krále ve společnosti harému neotenických královen také u dalšího druhu podčeledi Syntermitinae, *Silvestritermes minutus*. Tento druh se proto stal předmětem mého magisterského studia a navazujícího bádání.

2. SEZNAM PUBLIKACÍ

2.1. Magisterská diplomová práce

Křivánek, J. (2016). Nový případ smíšené reprodukční strategie a její adaptivní význam u neotropického termita *Silvestritermes minutus* (Termitidae: Syntermitinae). Magisterská diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra ekologie

2.2. Články v mezinárodních časopisech s impaktním faktorem

A. Fougeyrollas, R.†, **Křivánek, J.**†, Roy, V., Dolejšová, K., Frechault, S., Roisin, Y., Hanus, R., & Sillam-Dussès, D. (2017). Asexual queen succession mediates an accelerated colony life cycle in the termite *Silvestritermes minutus*. *Molecular Ecology* **26**: 3295-3308. IF = 6,131 (†, sdílené prvoautorství). <http://dx.doi.org/10.1111/mec.14095>

B. Fougeyrollas, R., Dolejšová, K., **Křivánek, J.**, Sillam-Dussès, D., Roisin, Y., Hanus, R., & Roy, V. (2018). Dispersal and mating strategies in two neotropical soil-feeding termites, *Embiratermes neotenicus* and *Silvestritermes minutus* (Termitidae, Syntermitinae). *Insectes Sociaux* **65**: 251-262. IF= 1,412. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-018-0606-y>

C. Dolejšová, K., **Křivánek, J.**, Kalinová, B., Hadravová, R., Kyjaková, P., & Hanus, R. (2018). Sex-pairing pheromones in three sympatric neotropical termite species (Termitidae: Syntermitinae). *Journal of Chemical Ecology* **44**: 534-546. IF= 2,447. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-018-0965-x>

3. AUTORSKÝ PODÍL

V září 2014 jsem se v rámci svého magisterského studia zapojil do projektu o výskytu a významu smíšených reprodukčních strategií u jihoamerických vyšších termitů podčeledi Syntermitinae. Projekt byl společným úsilím laboratoře na ÚOCHB AVČR a spolupracující laboratoře na Université Paris-Est Créteil (UPEC) ve Francii pod vedením Dr. Virginie Roy. Pražská skupina byla zodpovědná za terénní práci, sběr materiálu a studium sociálního složení kolonií, poměru pohlaví a dalších aspektů ekologie studovaného druhu, včetně chemické ekologie a studia identity pohlavních feromonů. Pařížská partnerská skupina naopak prováděla genetické analýzy a modelování v populačně genetických studiích. Mým úkolem v rámci zodpovědnosti mojí domovské laboratoře byla veškerá terénní práce a laboratorní práce s druhem *S. minutus*. Výsledky shromážděné během sedmi terénních výprav do lesů Francouzské Guyany v letech 2014-18, následně zpracované a analyzované v pražské laboratoři, jsem použil ve své magisterské diplomové práci a podílel se na jejich publikování v podobě tří článků v mezinárodních vědeckých periodikách.

Magisterská diplomová práce obhájená roku 2016 na Katedře ekologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a z ní přímo čerpající první publikace (Článek A) se zabývá popisem unikátní rozmnožovací strategie AQS a jejím významem v životním cyklu a ekologickém úspěchu termita druhu *S. minutus*. Mým příspěvkem byl sběr 164 kolonií a jejich biometrických a ekologických parametrů přímo v terénu. V laboratorní části pak určování sociální struktury, morfometrické analýzy, krátkodobé i dlouhodobé pokusy s vývojem nymf, studium poměru pohlaví okřídlených dospělců a investice do potomstva v koloniích, chystajících se na rojení, pitvy a rozboru plodnosti králů a královen a interpretace všech těchto získaných poznatků pro ekologii druhu.

Druhá publikace (Článek B) mapuje populační genetickou architekturu a genetickou strukturu kolonií dvou druhů podčeledi Syntermitinae využívajících AQS strategii. Mým úkolem bylo rozšíření vzorkování kolonií *S. minutus* nad rámec původních sběrů použitých pro diplomovou práci a první publikaci, sběr biometrických dat 41 kolonií na třech lokalitách potřebných pro určení genetické struktury, a následná interpretace genetických analýz z hlediska sociální struktury kolonií.

Třetím výstupem (Článek C) našeho dlouhodobého studia a sběru *S. minutus* byla identifikace pohlavních feromonů. Během dvou expedic probíhajících v období rojení zde byl mým příspěvkem sběr, převoz a separace okřídlených pohlavních jedinců, vytváření extraktů a pitvy feromonových žláz. Všechny tři publikace obsahují afiliaci Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Pro financování dílčích částí prvních dvou článků bylo využito prostředků Grantové Agentury Univerzity Karlovy – projektu č. 358815, které jsou uvedené v poděkování.

4. VLASTNÍ PUBLIKACE

4.1. Článek A:

**Asexual queen succession mediates an accelerated colony life cycle
in the termite *Silvestritermes minutus***

Plná verze článku dostupná v tištěné verzi

4.2. Článek B:

Dispersal and mating strategies in two neotropical soil-feeding termites, *Embiratermes neotenicus* and *Silvestritermes minutus* (Termitidae, Syntermitinae)

Plná verze článku dostupná v tištěné verzi

4.3. Článek C:

**Sex-pairing pheromones in three sympatric neotropical termite species
(Termitidae: Syntermitinae)**

Plná verze článku dostupná v tištěné verzi

5. ZÁVĚR

V magisterské diplomové práci jsem testoval hypotézu o přítomnosti strategie AQS u neotropického termita druhu *Silvestritermes minutus* a pokusil se podat co nejucelenější obraz jeho důsledků pro life-histories. V navazujícím článku (Článek A) jsme poznatky zúročili a ještě rozšířili o kompletní genetické, morfometrické a ontogenetické analýzy původu královen. Díky tomu jsme mohli potvrdit použití strategie AQS u dalšího, v pořadí třetího druhu u nejodvozenější čeledi Termitinae. Zevrubné studium ekologie tohoto druhu nám navíc odhalilo odlišný adaptivní význam této strategie než u dříve popsaných AQS druhů. Namísto využití sledu několika generací neotenických královen k prodloužení života kolonie, používá *S. minutus* tuto strategii k efektivní reprodukci v rámci neobvykle krátkého životního cyklu. Dochází totiž k velmi časnému nahrazení královny primární desítkami královen neotenických, které následně prudce zvýší reprodukční potenciál kolonií. Tento téměř obligátní tříletý cyklus kolonie završuje jediné vyrojení maximálního počtu pohlavně produkovaných okřídlených králů a královen v třetím roce jejího života a je zakončen pomalým zánikem kolonie.

V publikaci následující po dokončení magisterského studia (Článek B) jsme se zaměřili na analýzu genetické struktury tentokrát na populační úrovni. Na úrovni populací jsme na vzdálenosti 10 km nezjistili významnou genetickou variabilitu, což poukázalo na značnou schopnost disperze okřídlených jedinců i na delší vzdálenosti. Dále naše výsledky nezávisle potvrdily biparentální outbreední genetickou strukturu u většiny kolonií, která je typická pro AQS systém. Zároveň však také poukázaly na několik méně běžných situací v reprodukční struktuře, které předchází bádání nepostihlo. Mezi ty patřily inbreední struktury vzniklé pravděpodobně v důsledku nahrazení jednoho z rodičů jeho sexuálně produkovaným potomkem (v 7% případech) nebo geneticky smíšené kolonie, které mohly pravděpodobně vzniknout fúzí se zanikajícími vyrojenými koloniemi (10%).

Disperzní let okřídlených dospělců a založení nových hnízd je klíčovým momentem v životním cyklu termitů a důležitou úlohu v něm hraje tvorba budoucích královských párů s pomocí pohlavních feromonů, produkovaných královnou. Díky našim cíleným terénním výpravám v období předcházejícím rojení *S. minutus* jsme získali dostatečné množství vzácného materiálu v podobě živých kolonií s okřídlenými dospělci krátce před odletem, což nám umožnilo studovat chemickou identitu pohlavního feromonu (Článek C). Produkci feromonu jsme lokalizovali na osmém až desátém tergálním článku, pod nimiž vyúsťují tergální žlázy. Jako aktivní složky feromonu jsme u *S. minutus* kombinací plynové chromatografie, elektrofyziologických a etologických pokusů identifikovali dva dvanáctiuhlíkaté alkoholy (3Z,6Z)-dodecadien-1-ol (300 pg na samici) a (3Z)-dodecen-1-ol (50 pg). Zatímco oba tyto alkoholy jsou u termitů jako složky pohlavního feromonu poměrně časté, druhové specifity feromonu je dosaženo s pomocí kvantitativních poměrů obou složek a jeho celkového množství. Uvedená pozorování podle mého názoru splňují cíl, který jsme si vytkli na počátku mého magisterského studia a následné výzkumné činnosti, tedy podat komplexní pohled na biologii výjimečného druhu *Silvestritermes minutus* s důrazem na jeho strategie rozmnožování.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

¹ Matsuura, K., Vargo, E. L., Kawatsu, K., Lebadie, P. E., Nakano, H., Yashiro, T., Tsuji, K. (2009). Queen succession through asexual reproduction in termites. *Science* **323**: 1687-1687.

² Vargo, E. L., Labadie, P. E., & Matsuura, K. (2011). Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **279**: 813-819.

³ Luchetti, A., Velonà, A., Mueller, M., & Mantovani, B. (2013). Breeding systems and reproductive strategies in Italian *Reticulitermes* colonies (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux*, **60**, 203-211.

⁴ Fournier, D., Hellemans, S., Hanus, R., & Roisin, Y. (2016). Facultative asexual reproduction and genetic diversity of populations in the humivorous termite *Cavitermes tuberosus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **283**, 20160196.

⁵ Fougeyrollas, R., Dolejšová, K., Sillam-Dussès, D., Roy, V., Poteaux, C., Hanus, R., & Roisin, Y. (2015). Asexual queen succession in the higher termite *Embiratermes neotenicus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **282**, 20150260.