

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Analytická chemie odhaluje diverzitu a funkci
chemických látek užívaných v komunikaci a obraně
termitích společenstev**

Mgr. Jana Krasulová

Autoreferát dizertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Školitel-konzultant: Doc. RNDr. Irena Valterová, CSc.

Praha 2015

Tato práce vznikla během mého působení ve vědeckém týmu Infochemikálie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., a je založena na výsledcích níže uvedených publikací doplněných o dosud nepublikované studie, které jsou v různých fázích publikačního procesu.

PUBLIKACE A

Hanus R., Šobotník J., **Krasulová J.**, Jiroš P., Žáček P., Kalinová B., Dolejšová K., Cvačka J., Bourguignon T., Roisin Y., Lacey M.J. & Sillam-Dussès D. 2012: Nonadecadienone, a new termite trail-following pheromone identified in *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae). *Chemical Senses* 37: 55–63.

PUBLIKACE B

Sillam-Dussès D., Hanus R., Oukasha Abd El-Latif A., Jiroš P., **Krasulová J.**, Kalinová B., Valterová I. & Šobotník J. 2011: Sex pheromone and trail pheromone of the sand termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae: Psammotermitinae). *Journal of Chemical Ecology* 37: 179–188.

PUBLIKACE C

Lacey M.J., Sémon E., **Krasulová J.**, Sillam-Dussès D., Robert A., Cornette R., Hoskovec M., Žáček P., Valterová I. & Bordereau C. 2011: Chemical communication in termites: *syn*-4,6-dimethylundecan-1-ol as trail-following pheromone, *syn*-4,6-dimethylundecanal and (5*E*)-2,6,10-trimethylundeca-5,9-dienal as the respective male and female sex pheromones in *Hodotermopsis sjoestedti* (Isoptera, Archotermopsidae). *Journal of Insect Physiology* 57: 1585–1591.

PUBLIKACE D

Dolejšová K., **Krasulová J.**, Kotalová K. & Hanus R. 2014: Chemical alarm in the termite *Termitogeton planus* (Rhinotermitidae). *Journal of Chemical Ecology* 40: 1269–1276.

PUBLIKACE E

Krasulová J., Hanus R., Kotalová K., Šobotník J., Sillam-Dussès D., Tichý M. & Valterová I. 2012: Chemistry and anatomy of the frontal gland in soldiers of the sand termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae). *Journal of Chemical Ecology* 38: 557–565.

ABSTRAKT

Analytická chemie hraje klíčovou roli při studiu chemické ekologie a jen díky sofistikovaným metodám je možné detekovat biologicky aktivní látky, které se obvykle vyskytují v nepatrných množstvích, často jako složky komplexních směsí. Má práce je zaměřena na aplikaci moderních analytických metod a instrumentace při zjišťování identity, chemické diverzity a funkce semiochemikálií a obranných látek používaných různými druhy termitů.

První část mé práce je zaměřena na identifikaci chemických látek používaných při komunikaci, tzn. feromonů. V této části jsem se zabývala studiem chemické komunikace při stopování u tří vybraných termitích druhů. Kromě nejběžnějšího termitího stopovacího feromonu, (3Z,6Z,8E)-dodeka-3,6,8-trien-1-olu, nalezeného u druhu *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae), jsem se podílela na identifikaci dvou nových struktur, (10Z,13Z)-nonadeka-10,13-dien-2-onu u druhu *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae) a *syn*-4,6-dimethylundekan-1-olu u druhu *Hodotermopsis sjoestedti* (Archotermopsidae). Podařilo se nám identifikovat také (3Z,6Z,8E)-dodeka-3,6,8-trien-1-ol jako samičí pohlavní feromon u druhu *Psammotermes hybostoma*, a *syn*-4,6-dimethylundekanal jako samčí pohlavní feromon u druhu *Hodotermopsis sjoestedti*. Identifikovala jsem také chemické složení vícesložkového poplašného feromonu produkovaného vojáky druhu *Termitogeton planus* (Rhinotermitidae) a specifickou královskou látku, dodekan-2,10-diol, u druhu *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae).

Druhá část mé práce shrnuje výsledky dvou studií chemické obrany termitů. U vojáků druhu *Psammotermes hybostoma* jsem detekovala celkem 33 obranných látek patřících převážně mezi seskviterpeny a většinu z nich plně identifikovala. Kvalitativní a kvantitativní srovnání obranných směsí mezi jednotlivými koloniemi jednoznačně rozlišilo tři rozdílné chemotypy korespondující s lokalitou výskytu. U dělníků druhu *Neocapritermes taracua* (Termitidae) jsem se podílela na popisu dříve neznámého vícesložkového obranného mechanismu spočívajícího v oxidaci hydrochinonů na benzochinony za katalýzy proteinem vázajícím měď.

Mé výsledky zdůrazňují komplexnost chemické komunikace a obrany termitích společenstev a přispívají k pochopení evoluce feromonů a obranných látek u tohoto nejstaršího společenského hmyzu.

ÚVOD

Chemická ekologie je relativně mladá vědecká disciplína spojující chemiky a biology při studiu vztahů mezi organismy a jejich prostředím. Chemické signály představují nejstarší a nejrozšířenější komunikační nástroj v říši zvířat. Hlavním cílem chemických ekologů je získat „maximum informací z minimálního množství vzorku“ [1]. Vzhledem k tomu, že semiochemikálie se často vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, v řádu mikrogramů i méně, je potřeba používat techniky pracující v mikroměřítku společně s příslušným vybavením. V některých případech mohou být využity jednoduché chemické reakce vedoucí k modifikaci původní látky, a tím k usnadnění analýzy zlepšením separace, zvýšením detekovatelnosti či odhalením konkrétní funkční skupiny na určitém místě v molekule.

CÍLE

Cílem mé práce bylo studium chemické komunikace a obrany u termitích společenstev s důrazem na málo prozkoumané druhy z fylogeneticky důležitých rodových linií. Hlavní část mé práce byla provedena v rámci projektu nazvaného „Biologie, chemická ekologie a fylogeneze klíčových rodů termitů z čeledi Rhinotermitidae a Serritermitidae“. Zabývala jsem se těmito tématy:

- stopovací feromon u druhu *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae) (Publikace A)
- stopovací feromon, pohlavní feromon a chemická obrana u druhu *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae) (Publikace B, E)
- poplašný feromon u druhu *Termitogeton planus* (Rhinotermitidae) (Publikace D)

Mimo hlavního projektu jsem se podílela na dvou dalších studiích ve spolupráci se zahraničními chemickými ekology:

- stopovací feromon a pohlavní feromon u druhu *Hodotermopsis sjoestedti* (Archotermopsidae) (Publikace C)
- chemická obrana dělníků druhu *Neocapritermes taracua* (Termitidae)

Dalším tématem našeho výzkumu je studium chemických signálů vysílaných termitím králem a královnou. V této práci se věnuji následujícímu tématu:

- identifikace těkavých látek signalizujících plodnost u druhu *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae)

MATERIÁL A INSTRUMENTACE

Biologický materiál

Kolonie druhu *Glossotermes oculatus* a *Neocapritermes taracua* byly přivezeny z Francouzské Guyany, *Psammotermes hybostoma* z Egypta, *Hodotermopsis sjoestedti* z Vietnamu a *Termitogeton planus* ze západní Papuy. *Prorhinotermes simplex* pochází z Kuby a je chován v laboratorních podmínkách od roku 1964.

Chemikálie

Činidla a syntetické standardy byly zakoupeny od firem Sigma-Aldrich a Fluka, rozpouštědla od firem Penta a Merck. Standardy stopovacích feromonů byly poskytnuty Christianem Bordereau z partnerského pracoviště ve francouzském Dijonu.

Instrumentace

Jednorozměrný GC-MS (s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem): Focus GC, Thermo Scientific DSQ II.

MS data s vysokým rozlišením: Waters GCT Premier s průletovým hmotnostním analyzátozem.

Chirální separace: plynový chromatograf HP 6850 Series (Agilent) s plamenově-ionizačním detektorem (FID).

Dvourozměrný plynový chromatograf s hmotnostní detekcí (s průletovým hmotnostním analyzátozem) GC×GC/TOF-MS: Pegasus 4D, Leco Corporation, USA.

Preparativní plynový chromatograf: 6890N plynový chromatograf (Agilent) vybavený inletem s programovatelnou teplotou EPC PTV inlet (Gerstel, Mühlheim, Germany) a plamenově-ionizačním detektorem (FID). Frakce byly jímány v preparačním frakčním kolektoru (Gerstel).

Plynová chromatografie s elektroantenografickou detekcí (GC-EAD): GC-5890A Hewlett-Packard. EAD-termití tykadlo připojeno ke dvěma argent-chloridovým elektrodám napojeným do AC/DC převodníku a 10XProbe (Syntech, Hilversum, Nizozemí).

NMR spektra: Bruker Avance 500 MHz.

FTIR spektra: plynový chromatograf Agilent 6850 spojený s Nicolet 6700FT-IR spektrometrem (Thermo Scientific).

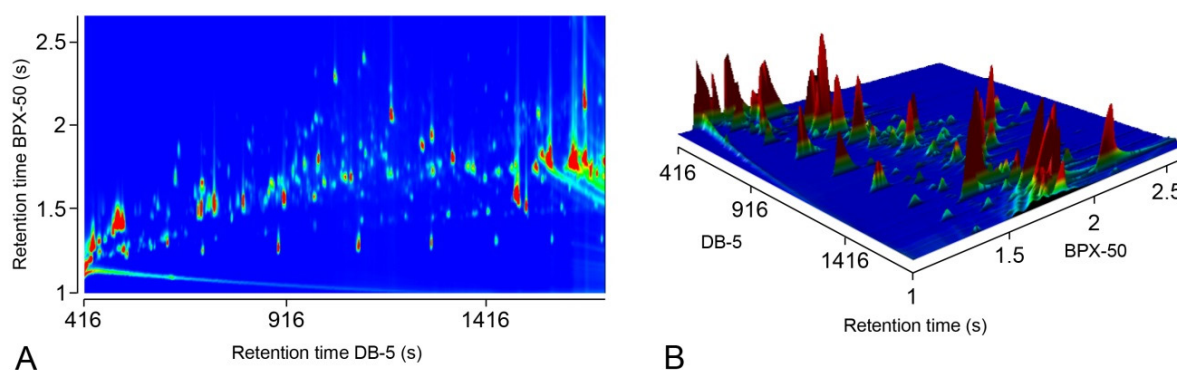
VÝSLEDKY A DISKUZE

1 Feromony

1.1 Stopovací feromon druhu *Glossotermes oculatus*

Tato kapitola shrnuje naše výsledky identifikace stopovacího feromonu u jihoamerického druhu *Glossotermes oculatus*, které byly publikovány v časopise *Chemical Senses* v roce 2011 (Publikace A).

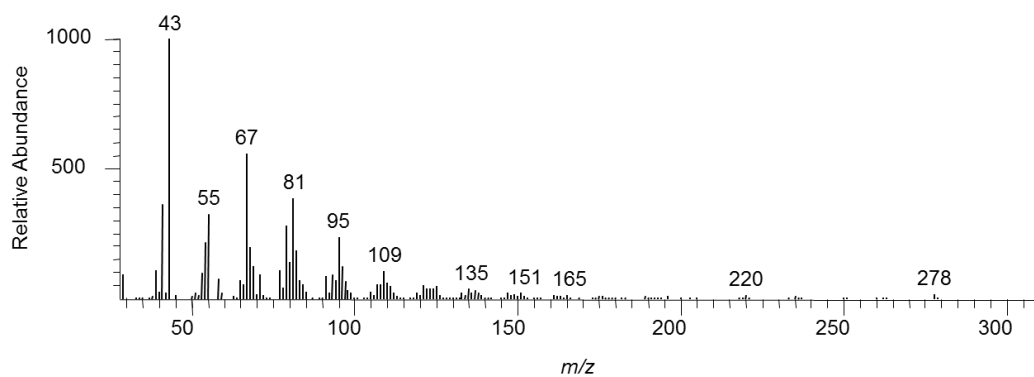
Biologicky aktivní hexanový extrakt připravený z 300 sternálních žláz dělníků druhu *Glossotermes oculatus* byl analyzován pomocí dvourozměrné plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC×GC/TOF-MS). Výsledkem byl velmi bohatý chromatogram (Obr. 1).



Obr. 1 A. 2D-chromatogram extraktu sternálních žláz dělníků *G. oculatus*

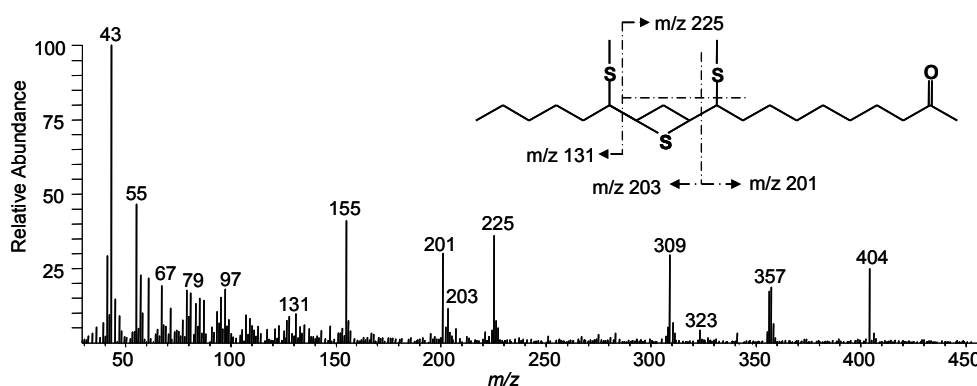
B. 3D vizualizace

Vzhledem ke komplexnosti extraktu, problémům způsobeným velkým výskytem mastných kyselin a neúspěchu při použití elektroantenografického detektoru jsme přistoupili k frakcionaci extraktu a následnému testování biologické aktivity jednotlivých frakcí. Nejprve bylo pomocí sloupcové chromatografie získáno 11 frakcí (hexan:ether od 10:0 do 0:10), z nichž dvě byly biologicky aktivní. Tyto frakce byly smíchány a následně rozděleny pomocí preparativní plynové chromatografie ve třech krocích. Z této série frakcionací vzešla jediná aktivní frakce s jedinou kandidátní látkou (KI = 2075 na DB-5) s m/z 278. Hmotnostní spektrum této látky je zobrazeno na Obr. 2.



Obr. 2 Hmotnostní spektrum kandidátní látky

Na základě hmotnostního spektra podobného v přírodě se vyskytující kyselině linolové a jejím derivátům byla navržena struktura (10*Z*,13*Z*)-nonadeka-10,13-dien-2-on (dále uváděna jako nonadekadienon). Stereochemie byla navržena v souladu s přirozenou kyselinou linolovou. Pro potvrzení naší hypotézy byla navržena struktura syntetizována z komerčně dostupného methylesteru kyseliny linolové. Porovnání chromatografického chování a hmotnostních spekter syntetického standardu a naší kandidátní látky z autentického extraktu ukázalo přesnou shodu. Přestože pozice dvojných vazeb byla navržena na základě přírodní kyseliny linolové, pro empirické potvrzení byly připraveny DMDS deriváty jak látky z extraktu, tak látky syntetické (Obr. 3), což opět ukázalo přesnou shodu.



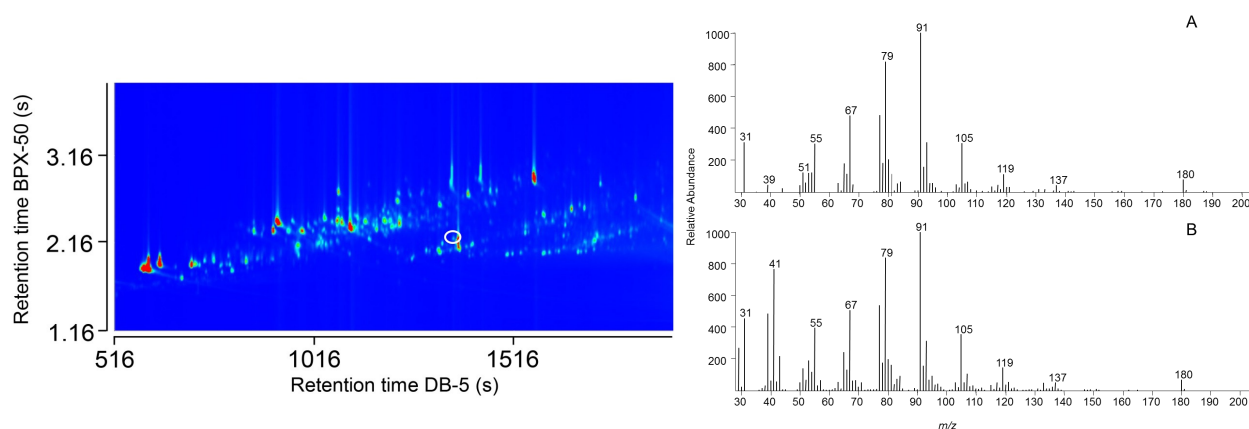
Obr. 3 DMDS nonadecadienonu

Identifikovaná struktura, (10*Z*,13*Z*)-nonadeka-10,13-dien-2-on, se dramaticky liší od nenasycených alkoholů s 12-ti uhlíkatým řetězcem vyskytujících se u všech dalších čeledí vyšších termitů a zdůrazňuje vzdálenou fylogenetickou pozici čeledi Serritermitidae.

1.2 Stopovací feromon a pohlavní feromon u druhu *Psammotermes hybostoma*

V této kapitole jsou shrnuty výsledky studie zaměřené na identifikaci stopovacího a pohlavního feromonu u termitů druhu *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae) pocházejících z Egypta, které byly publikovány v časopise *Journal of Chemical Ecology* v roce 2011 (Publikace B).

Vzhledem k nízkým koncentracím stopovacích feromonů byl pro analýzu pomocí GC×GC/TOF-MS (LECO, Pegasus 3D) využit velmi koncentrovaný vzorek připravený z 50 sternálních žláz v 1 μ l hexanu. Použití takto koncentrovaného vzorku bylo možné pouze díky nízkému obsahu mastných kyselin ve sternálních žlázách v porovnání s celotělními oplachy. Na základě retenčního indexu a typické fragmentace byl pomocí diagnostického fragmentu m/z 91 nalezen nejznámější termití stopovací feromon (3*Z*,6*Z*,8*E*)-dodeka-3,6,8-trien-1-ol (dále uváděn jako dodekatrienol; m/z 180, KI=1525 na DB-5). Porovnání se standardem je zobrazeno na Obr. 4.

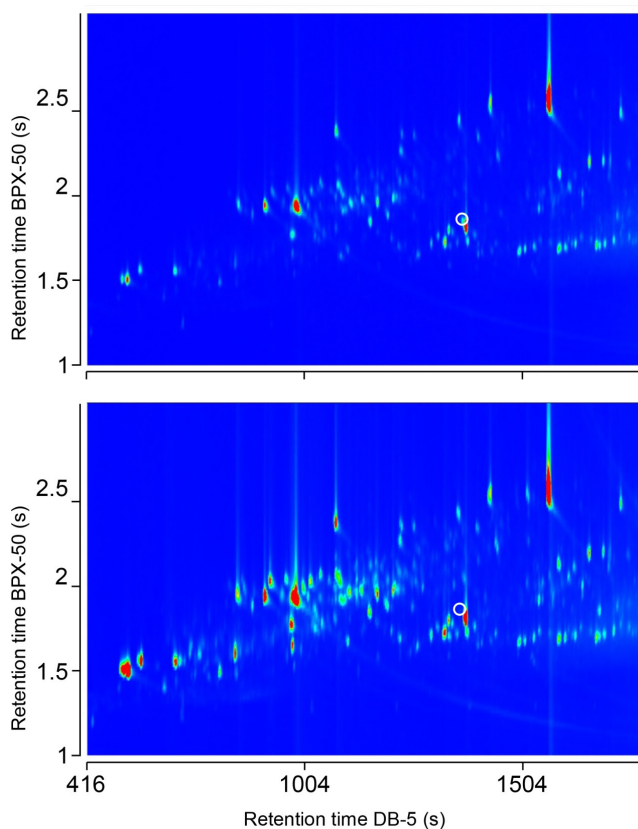


Obr. 4 Vlevo: GC×GC chromatogram extraktu sternálních žláz dělníků *P. hybostoma*, bílý ovál znázorňuje polohu dodekatrienolu. Vpravo: Hmotnostní spektra (3*Z*,6*Z*,8*E*)-dodeka-3,6,8-trien-1-olu A - extrakt sternálních žláz, B - syntetický standard

Ačkoli detekce dodekatrienolu není překvapivá z fylogenetického pohledu, jelikož je to nejčastější stopovací feromon, jeho detekce pomocí chromatografických metod je obtížná vzhledem k velmi nízkým koncentracím nutným pro vyvolání aktivity a tím pádem stopovým množstvím ve žláze. Tato studie je důkazem efektivnosti moderních analytických metod, jelikož se nám poprvé podařilo potvrdit přítomnost dodekatrienolu v extraktu pomocí chromatografické metody.

Druhá část této studie byla zaměřena na identifikaci samičího pohlavního feromonu druhu *Psammotermes hybostoma*, produkovaného v tergálních a sternálních žlázách rojících se samiček. Nejprve byly pomocí GC-MS s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem porovnány

profily kutikulárních uhlovodíků samic ze všech lokalit sběru, aby se potvrdilo, že všechny vzorky patří k jednomu druhu. Následně byly analyzovány hexanové extrakty sternálních a tergálních žláz (25 žláz/1 μ l) pomocí GC \times GC/TOF-MS. V obou typech extraktů byl opět detekován dodekatrienol (Obr. 5).



Obr. 5 GC \times GC chromatogramy extraktů tergálních a sternálních žláz

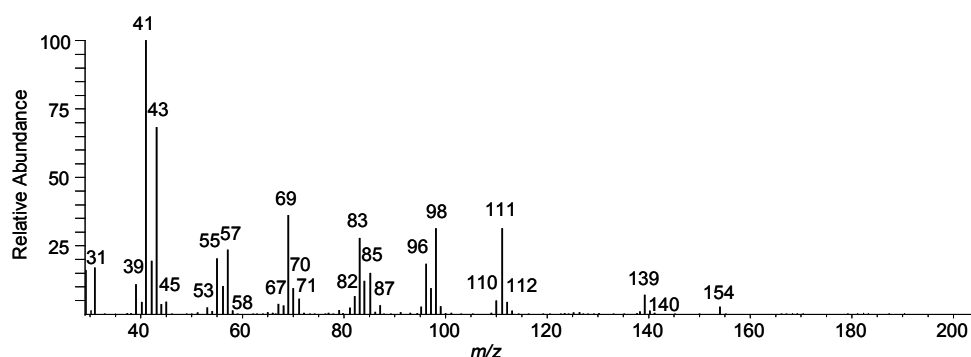
Identifikovali jsme (3Z,6Z,8E)-dodeka-3,6,8-trien-1-ol jako stopovací a zároveň pohlavní feromon u druhu *Psammotermes hybostoma*. Vzhledem k nepřesnosti kvantifikace této látky způsobené rozmýváním při dvourozměrné chromatografii bylo množství dodekatrienolu určeno pomocí elektroantenografie na 1 – 10 pg ve sternální žláze dělníků a 1 pg ve sternální a 10 pg v tergální žláze samic.

1.3 Stopovací feromon a pohlavní feromon u druhu *Hodotermopsis sjoestedti*

Tato kapitola shrnuje výsledky studie zaměřené na identifikaci stopovacího a pohlavního feromonu u termitů druhu *Hodotermopsis sjoestedti* (Archotermopsidae), na které jsem měla možnost spolupracovat s vědci z Austrálie, Francie a Japonska. Získané výsledky byly publikovány v časopise *Journal of Insect Physiology* v roce 2011 (Publikace C).

Pro obě části studie byly použity extrakty připravené třením příslušných žláz na povrchu těla termitů pomocí SPME vlákna (PDMS/DVB). Pro studium stopovacího feromonu bylo extrahováno 20 – 50 sternálních žláz dělníků, pro studium pohlavního feromonu 10 – 20 reprodukčních jedinců.

Stopovací feromon byl detekován na základě srovnání látek nalezených na povrchu sternálních žláz a kontrolní oblasti, zadní části zadečku. Tento experiment ukázal přítomnost látky specifické pro sternální žlázy s $KI = 1468$ na nepolární koloně DB-5 a $KI = 1937$ na polární koloně DB-WAX. Hmotnostní spektrum této látky je zobrazeno na Obr. 6.



Obr. 6 EI spektrum stopovacího feromonu druhu *H. sjoestedti*

Na základě fragmentace, FT-IC spektronomie a srovnání s publikovanými daty [2] byla navržena struktura 4,6-dimethylundekan-1-ol. Následnou syntézou byla připravena směs *syn* a *anti* diastereomerů. Pro identifikaci správného diastereomeru užívaného termity byly porovnány chromatogramy syntetického standardu a přírodního extraktu. Na základě tohoto srovnání bylo zjištěno, že stopovacím feromonem druhu *H. sjoestedti* je *syn*-4,6-dimethylundekan-1-ol. Vzhledem k tomu, že *syn*-4,6-dimethylundekan-1-ol má dva chirální uhlíky existují dvě možnosti pro finální strukturu (Obr. 7).

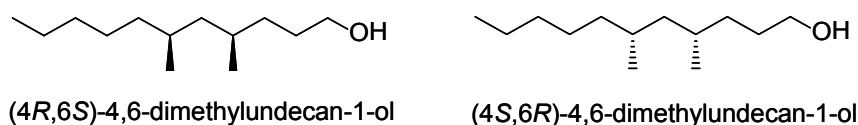
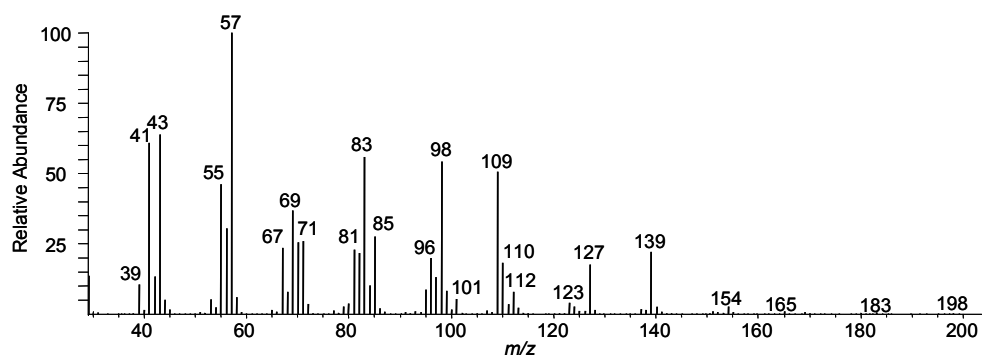


Fig. 7 Finální struktury *syn*-4,6-dimethylundekan-1-olu

Obdobně jako v případě studie stopovacího feromonu, pohlavní feromon druhu *H. sjoestedti* byl studován pomocí extraktu získaného přímou extrakcí z povrchu sternálních a tergálních žláz reprodukčních jedinců. Na povrchu sternálních žláz samců byla nalezena specifická látka s KI = 1406 na koloně DB-5 a KI = 1668 na koloně DB-WAX. Hmotnostní spektrum této látky je zobrazeno na Obr. 8.



Obr. 8 EI spektrum samčí specifické látky

Na základě porovnání hmotnostního spektra samčí látky s příbuzným druhem *Zootermopsis nevadensis*, jehož samčím pohlavním feromonem je *syn*-4,6-dimethyldodekanal [2], byla navržena struktura *syn*-4,6-dimethylundekanal. Tato látka byla připravena oxidací dříve připraveného stopovacího feromonu, 4,6-dimethylundekan-1-olu. Stejně jako v případě stopovacího feromonu existují dvě varianty finální struktury (Obr. 9).

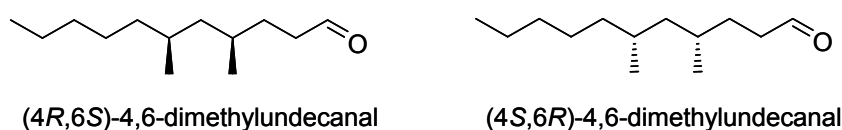


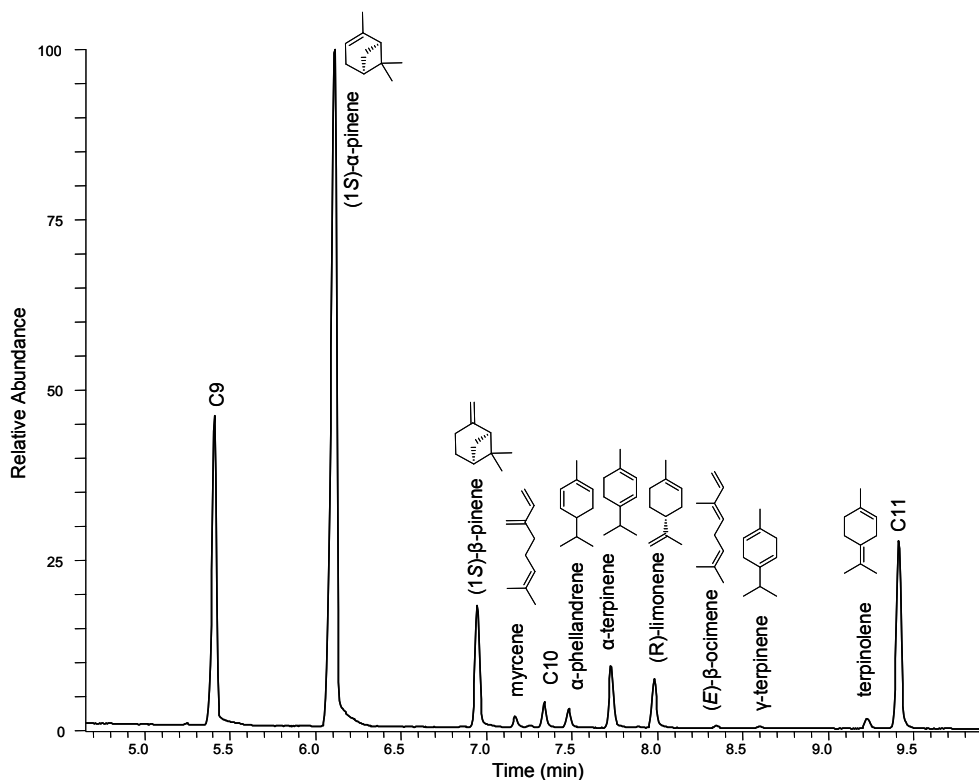
Fig. 9 Finální struktury *syn*-4,6-dimethylundekanal

Situace u samičího pohlavního feromonu se ukázala mnohem jednodušší, neboť specifická samičí látka odpovídala (5*E*)-2,6,10-trimethylundeka-5,9-dienalu, nalezenému u druhu *Zootermopsis nevadensis*. Jelikož rozdílné pohlavní feromony u samců a samic byly dosud popsány pouze u rodu *Zootermopsis*, naše výsledky potvrzují příbuznost rodů *Hodotermopsis* a *Zootermopsis*, jež byly nedávno zařazeny jako sesterské rody do čeledi Archotermopsidae [3] a odděleny od ostatních linií.

1.4 Poplašný feromon druhu *Termitogeton planus*

Tato kapitola shrnuje náš výzkum chemického složení obranné sekrece vojáků málo prostudovaného druhu *Termitogeton planus* (Isoptera: Rhinotermitidae) ze Západní Papuy a biologické role této sekrece při vyvolávání poplašného chování. Naše výsledky byly publikovány v časopise *Journal of Chemical Ecology* v roce 2014 (Publikace D).

Pomocí GC-MS s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (DSQ II) a nepolární kolonou ZB-5MS bylo nejprve analyzováno 24 vzorků obranné sekrece vojáků druhu *T. planus* z devíti různých kolonií. Pro tyto analýzy byly připraveny dva typy extraktů. Jeden typ byl připraven extrakcí 40 – 120 hlav vojáků přímo v terénu, druhým typem byly extrakty hlav jedinců připravené v laboratoři v Praze. Všechny extrakty byly připraveny stejnou procedurou, kdy bylo použito 10 μ l destilovaného hexanu na jedince a extrakce probíhala 12 hodin při 4°C. Pro účely kvantifikace byl použit vnitřní standard 1-bromdekan (40 ng/ μ l), který byl nastříkovan společně se vzorkem. Pro jednoznačné určení specifických obranných látek vojáků (Obr. 10; Tab. 1) byly z každé kolonie analyzovány také celotělní oplachy dělníků.



Obr. 10 GC chromatogram obranné sekrece vojáků druhu *Termitogeton planus*

Tab. 1 shrnuje identitu a relativní zastoupení obranných látek vojáků ze všech studovaných kolonií.

	RI	TP-1	TP-2	TP-3	TP-4	TP-5	TP-6	TP-7	TP-8	TP-9	TP-10	TP-11	ng/ind.
Nonan	900	9.4	14.9	11.2	11.1	7.9	6.8	7.4	10.3	6.5	18.1	15.8	/
(1S)-(-)-α-Pinen	940	71.1	66.0	70.5	72.8	75.3	78.3	74.2	75.5	75.3	51.4	35.5	3300
(1S)-(-)-β-Pinen	986	11.1	12.1	11.5	10.0	10.2	9.9	11.1	11.3	10.2	7.5	6.5	500
Myrcen	991	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	<0.5%	ND	0.6	0.7	0.9	65
Dekan	1000	<0.5%	ND	ND	ND	ND	ND	<0.5%	<0.5%	<0.5%	1.4	2.7	/
α-Phellandren	1011	1.4	1.3	2.0	1.4	1.4	1.0	1.4	0.9	1.2	1.0	1.5	83
α-Terpinen	1022	2.5	1.6	2.9	1.5	1.8	1.5	2.8	0.9	1.9	4.0	4.9	250
(R)-limonen	1036	2.7	1.8	1.5	1.9	2.3	1.7	2.3	0.7	2.5	2.9	4.2	198
(E)-β-Ocimen	1048	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<0.5%	<0.5%	15
γ-Terpinen	1062	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<0.5%	<0.5%	10
Teprinolen	1092	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<0.5%	0.8	1.5	50
Undekan	1100	1.2	2.3	<0.5%	1.3	1.2	0.8	0.6	<0.5%	1.3	12.0	26.2	/

Pro přesnější separaci a identifikaci byly některé vzorky analyzovány také pomocí dvourozměrné plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC \times GC/TOF-MS; Leco, Pegasus III). Separace v druhé dimenzi odhalila také stopové množství undecenu. Celkově byly identifikovány 4 nasycené či nenasycené uhlovodíky společně s osmi monoterpeny, které byly identifikovány na základě srovnání retenčních indexů a fragmentace s literaturou [4] a s komerčně dostupnými standardy. Vzhledem k tomu, že enantiomerická čistota může být klíčová pro vyvolání poplašného chování [5, 6], byly některé vzorky analyzované také na GC-FID (HP 6850 Series) s chirální kolonou HP-CHIRAL-20B a porovnány s komerčními standardy.

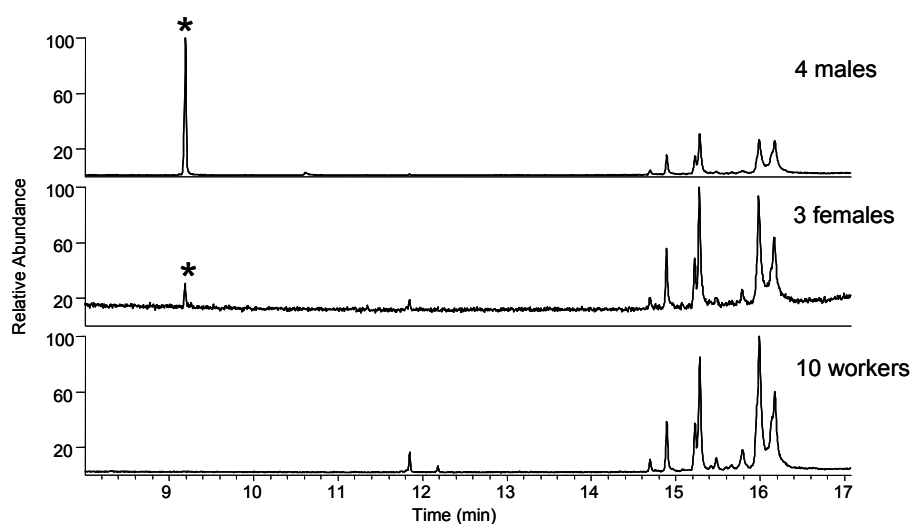
V dalším kroku bylo smícháno 8 komerčních standardů monoterpenů v relativním zastoupení odpovídajícím autentickému extraktu. Tato směs byla použita pro biotesty a jelikož vyvolávala stejnou poplašnou reakci jako přírodní extrakt, pokračovali jsme v hledání látek odpovědných za toto chování. Vzhledem k omezenému počtu testovacích jedinců nebylo možné testovat všechny možné kombinace monoterpenů, a proto byla připravena směs 4 dominantních monoterpenů a 4 minoritních monoterpenů. Testy byly provedeny také s nejvíce zastoupeným monoterpenem, (1S)- α -pinenem. Přestože reakce termitů na směs 4 dominantních monoterpenů a (1S)- α -pinen byla silnější, směs minoritních monoterpenů byla také aktivní.

Na základě těchto výsledků jsme došli k závěru, že poplašný feromon druhu *T. planus* je vícesložkovým signálem kombinujícím majoritní i minoritní složky obranné sekrece vojáků. Tento typ vícesložkového chemického signálu je u různých druhů hmyzu i jiných zvířat preferován nad jednosložkovým signálem [7] a představuje takzvaný chemický jazyk [8].

1.5 Signály plodnosti druhu *Prorhinotermes simplex*

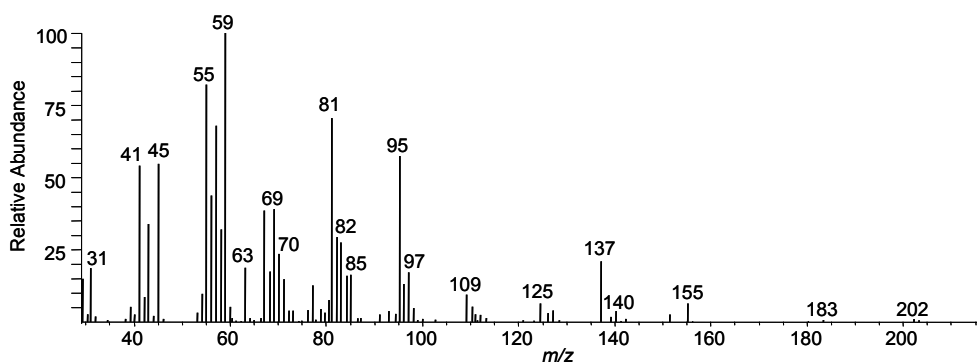
Tato kapitola shrnuje naši studii chemických látek produkovaných pohlavními jedinci termitů druhu *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae), jež by měly hrát roli při jejich rozpoznávání. Na základě předchozího výzkumu kolegů jsme se zaměřili na nízkomolekulární těkavé látky, pravděpodobně polárního charakteru, které by měly být vázány na protein vylučovaný povrchem těla králů a královen.

Mým prvním úkolem bylo vyvinout vhodnou extrakční metodu kompatibilní s GC. Ze všech pokusů se nejefektivnější ukázala extrakce dichlormethanem po dobu 16 hodin v mrazáku. Obr. 11 ukazuje srovnání 1D chromatogramů extraktů samců, samic a dělníků připravených výše popsanou procedurou. Specifická látka pro pohlavní jedince je označena hvězdičkou.



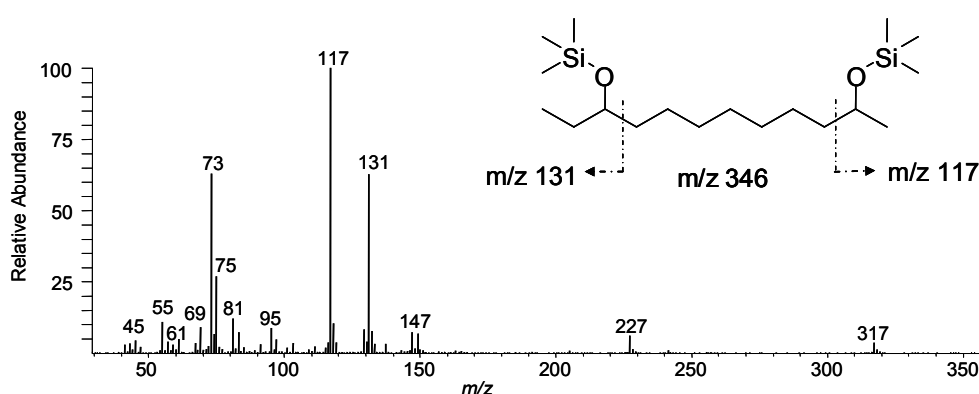
Obr. 11 GC chromatogramy pohlavních jedinců a dělníků

Dalším krokem byla identifikace kandidátní látky, jejíž hmotnostní spektrum je zobrazeno na Obr. 12.



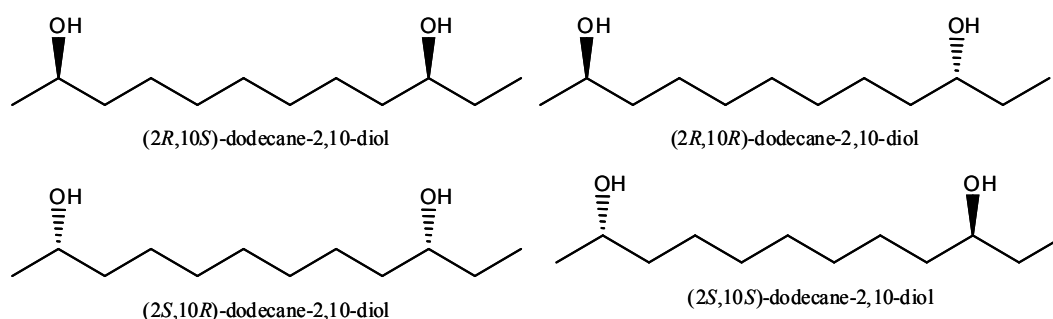
Obr. 12 EI spektrum kandidátní látky

Analýza na přístroji Q-TOF (Waters) určila molekulovou hmotnost neznámé látky m/z 220 s prvkovým složením $C_{12}H_{26}O_2$. Výrazný fragment m/z 31 typický pro alkoholy společně s výsledky z IČ spektroskopie ukazovaly na látku s dvěma hydroxyskupinami. Ke zjištění polohy hydroxyskupin byla použita derivatizace pomocí TMSI. Pro představu o větvení molekuly byl připraven také silylovaný derivát komerčního standardu dodekan-1,12-diolu. Posun v retenčním čase oproti derivátu naší kandidátní látky naznačil větvení. Jelikož v EI spektru derivátu naší látky dominovaly fragmenty m/z 117 a 131 (Obr. 13), byla navržena struktura dodekan-2,10-diol.



Obr. 13 EI spektrum kandidátní látky po silylaci

Navržená struktura, dodekan-2,10-diol byla připravena synteticky a porovnána s přírodním extraktem pomocí GC×GC/MS a GC-IČ. Obě tyto metody ukázaly přesnou shodu stejně jako porovnání silylovaných derivátů. Dalším krokem tohoto výzkumu bude selektivní syntéza 4 možných izomerů dodekan-2,10-diolu (Obr. 14) a tvorba vhodného biotestu ke zjištění biologické role této látky v termitích koloniích.



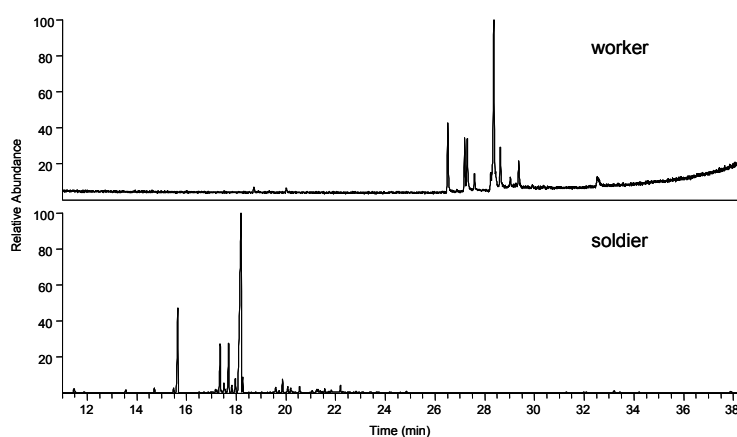
Obr. 14 Izomery dodekan-2,10-diolu

2 Obranné chemické látky

2.1 Obranné látky vojáků druhu *Psammotermes hybostoma*

Tato kapitola shrnuje naši studii obranných chemických látek termitů druhu *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae), publikované v časopise *Journal of Chemical Ecology* v roce 2012 (Publikace E).

V rámci této studie byla analyzována sekrece frontální žlázy vojáků z devíti různých kolonií z pěti lokalit v povodí Nilu a Západní pouště v Egyptě. Vedle identifikace obranných chemických látek byla studována také vnitrokoloniální, mezikoloniální a geografická chemická diverzita. Nejprve byly porovnány extrakty dělníků a vojáků pro nalezení látek specifických pro vojáky (Obr. 15).



Obr. 15 Srovnání chromatogramů dělníků a vojáků

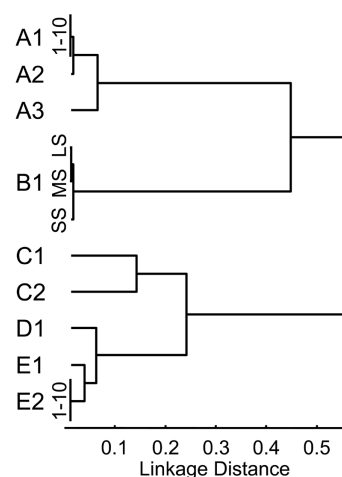
Celkem bylo detekováno 33 látek specifických pro kastu vojáků patřících převážně mezi seskviterpeny a jejich oxidované deriváty. Vzhledem k tomu, že standardy seskviterpenů většinou nejsou komerčně dostupné, probíhala identifikace převážně na základě srovnání s literaturou [4, 9], jen v několika případech bylo finální potvrzení provedeno pomocí přírodního nebo syntetického standardu. Tabulka 2, jež je zjednodušenou verzí tabulky uvedené přímo v Publikaci E, ukazuje všechny látky specifické pro vojáky, jejichž zastoupení v extraktu bylo více než 1%. Už při prvním pohledu na tabulku je možné jednoduše rozlišit tři odlišné chemotypy obsažené v našich vzorcích. Látky typické pro jednotlivé chemotypy byly β -elemen, valencen a (*E*)- γ -bisabolen.

Tab. 2 Seznam obranných látek druhu *P. hybostoma*

RI	Název	Chem. třída	A1	A2	A3	B1 LS	B1 MS	B1 SS	C1	C2	D1	E1	E2
1188	<i>p</i> -methylacetophenon	<i>keton</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
1394	iso- β -elemen	<i>sesquiterpen</i>	-	-	-	2	3	3	2	-	-	-	-
1402	β -elemen	<i>sesquiterpen</i>	11	8	25	64	62	58	34	15	15	14	25
1451	2-methylene-5-(1-methylvinyl)- 8-methylbicyclo[5.3.0]dekan	<i>sesquiterpen</i>	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1464	α -helmiscapen	<i>sesquiterpen</i>	18	16	8	5	5	7	4	5	-	-	-
1488	<i>cis</i> -eudesma-6,11-dien	<i>sesquiterpen</i>	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1495	selina-4,11-dien	<i>sesquiterpen</i>	-	-	-	-	-	-	7	5	8	-	-
1497	aristolochen	<i>sesquiterpen</i>	5	4	3	2	2	2	-	-	-	-	-
1504	valencen	<i>sesquiterpen</i>	58	65	54	22	21	26	19	31	6	3	6
1515	β -bisabolen	<i>sesquiterpen</i>	-	-	-	-	-	-	4	7	15	9	6
1532	7-epi- α -selinen	<i>sesquiterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	2
1541	(<i>E</i>)- γ -bisabolen	<i>sesquiterpen</i>	-	-	-	-	-	-	25	24	34	46	49
1549	(<i>E</i>)- α -bisabolen	<i>sesquiterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	-
1648	gossonorol	<i>ox. sesquiterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4	-
1690	neidentifikován	<i>ox. sesquiterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	-
1796	neidentifikován	<i>ox. sesquiterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-

Pro srovnání variability mezi jednotlivými koloniemi byly připraveny hexanové extrakty 10 vojáků z každé kolonie. Pro stanovení variability v rámci kolonie bylo separátně extrahováno 10 velkých vojáků z kolonie E2 a 10 malých vojáků z kolonie A1. Pro určení rozdílů mezi různými velikostmi vojáků byly z kolonie B1 analyzovány tři velikostní kategorie (malí, střední, velcí). Výsledky těchto porovnání jsou znázorněny na Obr. 16.

V rámci jednotlivých kolonií a mezi různými velikostmi vojáků nebyly pozorovány rozdíly. Naproti tomu mezi jednotlivými koloniemi byly detekovány tak výrazné kvantitativní a kvalitativní rozdíly, že bylo možné rozlišit tři různé chemotypy odpovídající lokalitě původu. Tato zjištění prokazují možnost využití obranné chemie termitů jako nástroj pro studium fylogeografie.



Obr. 16 Shlukový diagram

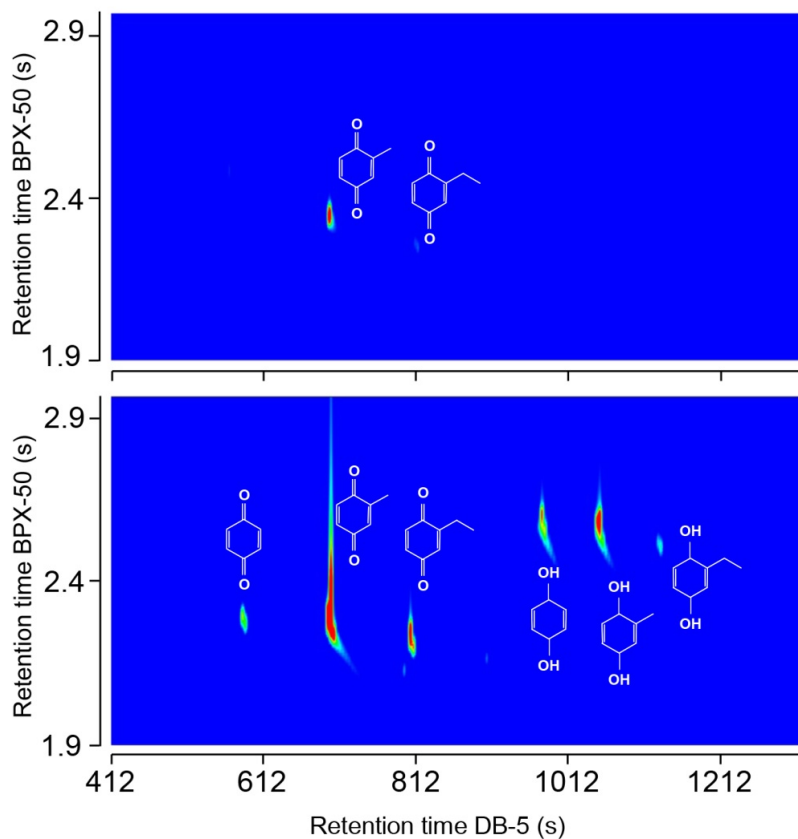
2.2 Obranné chemické látky druhu *Neocapritermes taracua*

Tato kapitola shrnuje náš výzkum obranných chemických látek a obranného mechanismu dělníků neotropických termitů *Neocapritermes taracua* (Termitidae). Tento výzkum je rozšířením naší předchozí studie zaměřené na obranu tohoto druhu z pohledu anatomie a chování [10] a bude součástí připravované publikace zabývající se velmi neobvyklou obrannou strategií druhu *N. taracua* z chemického pohledu.

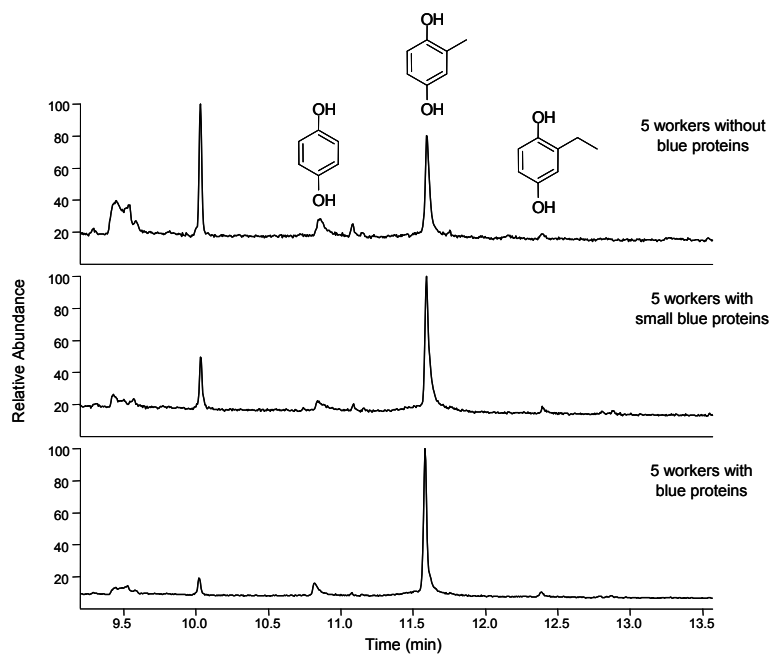
Dělníci druhu *N. taracua* používají unikátní dvousložkovou obranu. S přibývajícím věkem ve dvou kapsách na zadní části těla postupně kumulují pár modrých struktur připomínajících krystaly (dále nazývány modré krystaly). Pokud dojde k útoku, dělníkům praskne tkáň mezi modrými krystaly a slinnými žlázami. Smícháním obsahu slinných žláz a modrých krystalů v hemolymfě vznikne žlutá lepkavá kapalina, která je toxická pro ostatní termity. Spolupracující biochemici určili, že modré krystaly jsou proteiny vázající měď a množství mědi v jednom krystalu bylo určeno pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) na 9 ± 2 ng [10]. Funkční mechanismus obrany z chemického pohledu však zůstával neznámý.

Jelikož extrakce v organických rozpouštědlech se ukázala velmi komplikovaná vzhledem k nerozpustnosti modrých krystalů, rozhodla jsem se použít SPME pro studium těkavých látek vylučovaných toxickou kapalinou. První experimenty byly provedeny se skupinou 10 starých dělníků s modrými krystaly a skupinou 10 mladých dělníků bez těchto krystalů. Zatímco u mladých dělníků byly detekovány pouze nízké koncentrace methyl- a ethylbenzochinonu, u starých dělníků byly nalezeny vysoké koncentrace benzochinonu a jeho methyl- a ethyl- derivátů stejně jako hydrochinonu a jeho methyl- a ethyl- derivátů (Obr. 17).

Dále byly analyzovány methanolové vzorky 5 slinných žláz dělníků ze tří kategorií (bez modrých krystalů, s malými krystaly a s velkými krystaly), což ukázalo přítomnost hydrochinonu a jeho derivátů, které byly nalezeny při headspace analýze. Přestože tyto látky byly nalezeny u všech tří studovaných kategorií, byl pozorován výrazný nárůst kvantity se zvětšující se velikostí modrého krystalu, a tím pádem s věkem dělníků (Obr. 18).

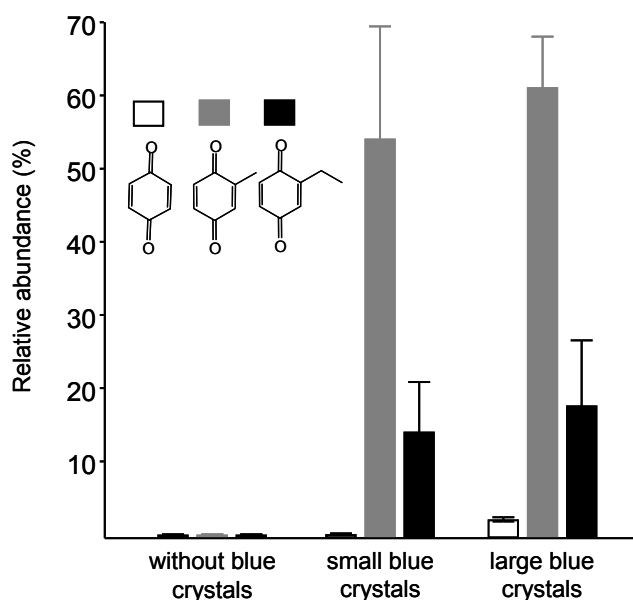


Obr. 17 Headspace analýza dělníků bez/s modrými krystaly



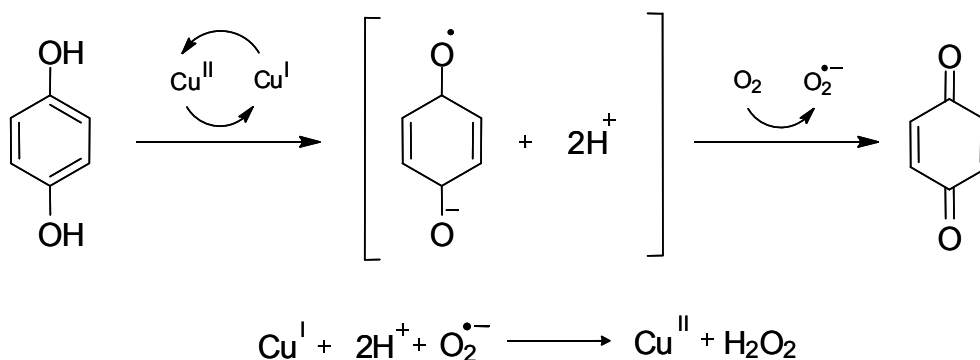
Obr. 18 Zvyšující se množství hydrochinonu a jeho derivátů s věkem dělníků

Dále jsme studovali relativní množství benzochinonu a jeho derivátů ve vznikající kapalině u různě starých jednotlivců pomocí headspace SPME a následné GC×GC/MS analýzy (Obr. 19).



Obr. 19 Relativní množství benzochinonu a jeho derivátů ve vznikající kapalině

Navzdory obtížnosti kvantifikace výstupů z dvourozměrné plynové chromatografie jsme zaznamenali stejný trend ve zvyšování množství s věkem jako v případě hydrochinonu a jeho derivátů ve slinných žlázách. Tato zjištění nás přivedla k hypotéze, že obranný mechanismus tohoto druhu spočívá v oxidaci hydrochinonu a jeho derivátů pocházejících ze slinných žláz na toxický benzochinon a jeho deriváty za katalýzy modrých krystalem tvořeným proteinem vázajícím měď (Obr. 20).



Obr. 20 Oxidace hydrochinonu proteinem vázajícím měď [11]

Naše zjištění jsou v souladu s dříve publikovanými daty, kde byla popsána role měďnatých iontů při zvyšování cytotoxicity hydrochinonu [11, 12]. Nicméně zdroj mědi a další aspekty této unikátní obranné strategie zůstávají neznámé.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo přispět ke znalosti chemické komunikace a obrany u vybraných důležitých a málo prostudovaných rodů termitů s důrazem na chemickou identitu a funkci semiochemikálií a obranných látek a jejich chemickou diverzitu ve fylogenetickém kontextu.

V rámci projektu zaměřeného na klíčové termití rody z čeledi Rhinotermitidae a Serritermitidae jsem se podílela na identifikaci nového stopovacího feromonu termitů druhu *Glossotermes oculatus*. Identifikovaná struktura, (10Z,13Z)-nonadeka-10,13-dien-2-on, se výrazně liší od nenasycených alkoholů s 12 uhlíky, které byly detekovány u všech ostatních druhů příbuzných čeledí, a tím podtrhuje oddělenou fylogenetickou pozici čeledi Serritermitidae.

Dále jsem spolupracovala na identifikaci stopovacího a pohlavního feromonu druhu *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae). Přestože byl v obou případech identifikován nejčastější termití feromon, (3Z,6Z,8E)-dodeka-3,6,8-trien-1-ol, bylo to poprvé co se nám podařilo detekovat tuto látku pomocí chromatografických metod. U druhu *Psammotermes hybostoma* jsem studovala také obrannou sekreci vojáků. Dohromady jsem detekovala 33 obranných látek, z nichž většina byla plně identifikována. Kvalitativní a kvantitativní srovnání obranných směsí jednoznačně odlišilo tři různé chemotypy, které odpovídaly lokalitě původu. V rámci stejného projektu jsem také identifikovala chemické složení poplašného feromonu vojáků druhu *Termitogeton planus* (Rhinotermitidae). Ukázalo se, že poplašný signál je vícesložkový a kombinuje majoritní i minoritní monoterpeny z obranné sekrece.

Ve spolupráci se zahraničními pracovišti byly u zástupce primitivních termitů *Hodotermopsis sjoestedti* identifikovány dva nové feromony: *syn*-4,6-dimethylundekan-1-ol jako stopovací feromon a *syn*-4,6-dimethylundekanal jako samčí pohlavní feromon. Naše výsledky podtrhují fylogenetickou příbuznost rodů *Hodotermopsis* a *Zootermopsis* patřící k čeledi Archotermopsidae.

U dělníků neotropických termitů *Neocapritermes taracua* (Termitidae) jsem se podílela na popisu dvousložkového obranného mechanismu, který spočívá v oxidaci hydrochinonu a jeho derivátů na toxický benzochinon a příslušné deriváty za katalýzy proteinem vázajícím měď. Nakonec jsem identifikovala dodekan-2,10-diol jako signál plodnosti u druhu *Prorbhinotermes simplex* (Rhinotermitidae) a hypotetický primer feromon.

CITOVANÁ LITERATURA

1. MILLAR J.G. & HAYNES K.F. **1998**. Methods in chemical ecology: Chemical Methods. Springer, New York.
2. BORDEREAU C., LACEY M.J., SÉMON E., BRAEKMAN J.-C., GHOSTIN J., ROBERT A., SHERMAN J.S. & SILLAM-DUSSÈS D. **2010**. Sex pheromones and trail-pheromones in the basal termites *Zootermopsis nevadensis* (Hagen) and *Z. augusticollis* (Hagen) (Isoptera: Termopsidae: Termopsinae). *Biol. J. Linn. Soc.* **100**: 519-530.
3. ENGEL M.S., GRIMALDI D.A. & KRISHNA K. **2009**. Termites (Isoptera): Their Phylogeny, Classification, and Rise to Ecological Dominance. *Am. Mus. Novit.* **3650**: 1-27.
4. ADAMS R.P. **2007**. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition. Allured Publishing Corporation, USA.
5. LINDSTRÖM M., NORIN T., VALTEROVÁ I. & VRKOČ J. **1990**. Chirality of the monoterpene alarm pheromones of termites. *Naturwissenschaften* **77**: 134-135.
6. ROISIN Y., EVERAERTS C., PASTEELS J.M. & BONNARD O. **1990**. Caste-dependent reactions to soldier defensive secretion and chiral alarm/recruitment pheromone in *Nasutitermes princeps*. *J. Chem. Ecol.* **16**: 2865-2875.
7. ROWE C. **1999**. Receiver psychology and the evolution of multicomponent signals. *Anim. Behav.* **58**: 921-931.
8. BELL W.J. & CARDÉ R.T. **1984**. Chemical ecology of insects. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
9. JOULAIN D. & KÖNIG W.A. **1998**. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E.B.-Verlag, Hamburg.
10. ŠOBOTNÍK J., BOURGUIGNON T., HANUS R., DEMIANOVÁ Z., PYTELKOVÁ J., MAREŠ M., FOLTÝNOVÁ P., PREISLER J., CVAČKA J., KRASULOVÁ J. & ROISIN Y. **2012**. Explosive Backpacks in Old Termite Workers. *Science* **337**: 436.
11. LI Y. & TRUSH M.A. **1993**. Oxidation of Hydroquinone by Copper: Chemical Mechanism and Biological Effects. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 346-355.
12. BOLTON J.L., TRUSH M.A., PENNING T. M., DRYHURST G. & MONKS T.J. **2000**. Role of Quinones in Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **13**: 135-160.

ŽIVOTOPIS

Mgr. Jana Krasulová

Narozena 1.5.1985 v Zábřehu, Česká republika
Svobodná

VZDĚLÁNÍ

- 2004 - 2007** bakalářské studium, obor Klinická a toxikologická analýza na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze
Bakalářská práce: “Příprava biologicky degradabilních esterů kyseliny dihydrobetulinové s protinádorovou aktivitou”.
- 2007 - 2009** magisterské studium, obor Klinická a toxikologická analýza na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze a ÚOCHB AV ČR v Praze
Diplomová práce: “Vývoj metody pro stanovení hmyzího juvenilního hormonu GC/MS technikou”
- since 2009** postgraduální studium, obor Analytická chemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze a ÚOCHB AV ČR v Praze
Disertační práce: “Analytical chemistry unravels the diversity and function of chemicals used for communication and defence in termite societies ”

ZAMĚSTNÁNÍ

- 2009 - 2013** ÚOCHB AV ČR, Praha, výzkumná skupina Infochemikálie, Ph.D. student
2014 - dnes ÚOCHB AV ČR, Praha, juniorská výzkumná skupina Chemie společenského hmyzu, PhD.student

JAZYKY

Angličtina – úroveň B2 (FCE certifikát)
Němčina – úroveň A2

VĚDECKÝ ZÁJEM

Analytická chemie (především GC-MS a GC×GC/MS) ve studiu chemické komunikace společenského hmyzu. Izolace a identifikace neznámých látek z přírodních zdrojů.

ČLENSTVÍ VE VĚDECKÝCH SPOLEČNOSTECH

International Society of Chemical Ecology

PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Autor či spoluautor 10 vědeckých publikací v impaktovaných časopisech, 2 příspěvky v konferenčních sbornících, 6 prezentací na konferencích (4 ústní + 2 plakátová sdělení), 33 citací, H-index: 4.

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace v impaktovaných časopisech

Sillam-Dussès D., Hanus R.*, Oukasha Abd El-Latif A., Jiroš P., **Krasulová J.**, Kalinová B., Valterová I. & Šobotník J. 2011: Sex Pheromone and Trail Pheromone of the Sand Termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae: Psammotermitinae). *Journal of Chemical Ecology* 37: 179–188.

Lacey M.J., Sémon E., **Krasulová J.**, Sillam-Dussès D., Robert A., Cornette R., Hoskovec M., Žáček P., Valterová I.* & Bordereau C.* 2011: Chemical communication in termites: syn-4,6-dimethylundecan-1-ol as trail-following pheromone, syn-4,6-dimethylundecanal and (5E)-2,6,10-trimethylundeca-5,9-dienal as the respective male and female sex pheromones in *Hodotermopsis sjoestedti* (Isoptera, Archotermitidae) *Journal of Insect Physiology* 57: 1585–1591.

Hanus R., Šobotník J.*, **Krasulová J.**, Jiroš P., Žáček P., Kalinová B., Dolejšová K., Cvačka J., Bourguignon T., Roisin Y., Lacey M.J. & Sillam-Dussès D. 2012: Nonadecadienone, a New Termite Trail Pheromone Identified in *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae). *Chemical Senses* 37: 55–63.

Krasulová J., Hanus R.*, Kutalová K., Šobotník J., Sillam-Dussès D., Tichý M. & Valterová I. 2012: Chemistry and anatomy of the frontal gland in soldiers of the sand termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae). *Journal of Chemical Ecology* 38: 557–565.

Šobotník J., Bourguignon T., Hanus R.*, Demianová Z., Pytelková J., Mareš M., Foltýnová P., Preisler J., Cvačka J., **Krasulová J.** & Roisin Y. 2012: Explosive Backpacks in Old Termite Workers. *Science* 337: 436.

Sillam-Dussès D., **Krasulová J.**, Vrkoslav V., Pytelková J., Cvačka J., Kutalová K., Bourguignon T., Miura T. & Šobotník J.* 2012: Comparative study of the labial gland secretion in termites (Isoptera). *PLoS One* 7(10): e46431.

Bourguignon T., Šobotník J., Hanus R., **Krasulová J.***, Vrkoslav V., Cvačka J. & Roisin Y. 2013: Delineating species boundaries using an iterative taxonomic approach: The case of soldierless termites (Isoptera, Termitidae, Apicotermitinae), *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 694–703.

Cristaldo P.F., DeSouza O., **Krasulová J.***, Jirošová A., Kutalová K., Lima E.R., Šobotník J. & Sillam-Dussès D. 2014: Mutual use of trail-following chemical cues by a termite host and its inquiline. *PLoS One* 9(1): e85315.

Dolejšová K., **Krasulová J.***, Kutalová K. & Hanus R. 2014: Chemical alarm in the termite *Termitogeton planus* (Rhinotermitidae). *Journal of Chemical Ecology* 40: 1269–1276.

Kyjáková P., Dolejšová K., **Krasulová J.***, Bednářová L., Hadravová R., Pohl R. & Hanus R. 2015 The evolution of symmetrical snapping in termite soldiers does not implicate the loss of chemical defence. *Biological Journal of the Linnean Society*, DOI: 10.1111/bij.12540.

* - korespondenční autor

Příspěvky v konferenčních sbornících

Krasulová J., Hanus R., Šobotník J., Bosáková Z. & Valterová I. 2011: GC-MS analysis of termite defensive compounds secreted from their frontal glands. *Proceedings of 7th ISC Modern Analytical Chemistry* 46-49.

Krasulová J., Hanus R., Sillam-Dussès D., Žáček P., Jiroš P., Šobotník J., Kalinová B., Bosáková Z. & Valterová I. 2012: Analytical methods used in studies on chemical ecology of termites. *Proceedings of 8th ISC Modern Analytical Chemistry* 79–81.

Plakátová sdělení

Krasulová J., Hanus R., Šobotník J., Bourguignon T., Cvačka J., Valterová I. 2010: Chemistry and anatomy of the frontal gland in termite imagoes. *ISCE 26th Annual Meeting, Tours, France*

Krasulová J., Šobotník J., Sillam-Dusses D., Jiroš P., Kalinová B., Kutalová K., Valterová I., Hanus R. 2011: Chemical ecology of the sand termite *Psammotermes hybostoma* (Isoptera, Rhinotermitidae): Trail following and sex pheromones, defensive compounds. *Sixth International Symposium on Molecular Insect Science, Amsterdam, The Netherlands*

Přednášky na konferenci

Krasulová J., Hanus R., Šobotník J., Žáček P., Jiroš P., Kalinová B., Lacey M.J. 2011: Identifikace a syntéza stopovacího feromonu termitů druhu *Glossotermes oculatus* (Isoptera: Serritermitidae). *XI Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků 2011*
*jedna z pěti oceněných prezentací

Krasulová J., Hanus R., Šobotník J., Žáček P., Jiroš P., Kalinová B., Valterová I., Lacey M.J. 2012: Identification of a new termite trail-following pheromone, nonadecadienone, in *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae). *ISCE 28th Annual Meeting, Vilnius, Lithuania*
*Studentská cena na cestovné

Charles University in Prague

Faculty of Science

Department of Analytical Chemistry



**Analytical chemistry unravels the diversity and
function of chemicals used for communication and
defence in termite societies**

Mgr. Jana Krasulová

Summary of the Ph.D. Thesis

Supervisor: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Supervisor-consultant: Doc. RNDr. Irena Valterová, CSc.

Prague 2015

This thesis summarizes my work in the Research Team of Infochemicals at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i and is based on the results presented in publications listed below, supplemented by studies that are not yet published, being in various steps of publication process.

PAPER A

Hanus R., Šobotník J., **Krasulová J.**, Jiroš P., Žáček P., Kalinová B., Dolejšová K., Cvačka J., Bourguignon T., Roisin Y., Lacey M.J. & Sillam-Dussès D. 2012: Nonadecadienone, a new termite trail-following pheromone identified in *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae). *Chemical Senses* 37: 55–63.

PAPER B

Sillam-Dussès D., Hanus R., Oukasha Abd El-Latif A., Jiroš P., **Krasulová J.**, Kalinová B., Valterová I. & Šobotník J. 2011: Sex pheromone and trail pheromone of the sand termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae: Psammotermitinae). *Journal of Chemical Ecology* 37: 179–188.

PAPER C

Lacey M.J., Sémon E., **Krasulová J.**, Sillam-Dussès D., Robert A., Cornette R., Hoskovec M., Žáček P., Valterová I. & Bordereau C. 2011: Chemical communication in termites: syn-4,6-dimethylundecan-1-ol as trail-following pheromone, syn-4,6-dimethylundecanal and (5*E*)-2,6,10-trimethylundeca-5,9-dienal as the respective male and female sex pheromones in *Hodotermopsis sjoestedti* (Isoptera, Archotermopsidae). *Journal of Insect Physiology* 57: 1585–1591.

PAPER D

Dolejšová K., **Krasulová J.**, Kutalová K. & Hanus R. 2014: Chemical alarm in the termite *Termitogeton planus* (Rhinotermitidae). *Journal of Chemical Ecology* 40: 1269–1276.

PAPER E

Krasulová J., Hanus R., Kutalová K., Šobotník J., Sillam-Dussès D., Tichý M. & Valterová I. 2012: Chemistry and anatomy of the frontal gland in soldiers of the sand termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae). *Journal of Chemical Ecology* 38: 557–565.

ABSTRACT

Analytical chemistry plays a crucial role in studies on chemical ecology and only the development of sophisticated methods enables the detection of biologically active compounds that are usually present in minute quantities and often in very complex mixtures. My thesis is dedicated to the application of modern analytical techniques and instrumentation to unravel the identity, chemical diversity and function of semiochemicals and defensive compounds used by various species of termites.

The first section of this thesis aims at the identity of chemicals used in communication, the pheromones. I studied the chemistry of the trail-following communication in three selected species of termites. Besides the identification of (3Z,6Z,8E)-dodeca-3,6,8-trien-1-ol, the most frequent termite trail-following pheromone, as the trail-following pheromone in *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae), I participated in the description of two new structures, (10Z,13Z)-nonadeca-10,13-dien-2-one in *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae) and *syn*-4,6-dimethylundecan-1-ol in *Hodotermopsis sjoestedti* (Archotermopsidae). We identified (3Z,6Z,8E)-dodeca-3,6,8-trien-1-ol to be the female sex pheromone in *Psammotermes hybostoma*, and *syn*-4,6-dimethylundecanal to be the male sex pheromone in *Hodotermopsis sjoestedti*. I also identified the chemical composition of the complex multi-component alarm pheromone secreted by the soldiers of *Termitogeton planus* (Rhinotermitidae) and the volatile specific to reproductives, dodecane-2,10-diol, in *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae).

In the second section, I summarize the studies on the chemistry of termite defensive compounds. In soldiers of *Psammotermes hybostoma*, I detected altogether 33 defensive chemicals belonging mainly to sesquiterpenes and fully identified majority of them. Qualitative and quantitative comparison of defensive blends among colonies clearly distinguished three different chemotypes, corresponding well with the localities of their origin. In workers of *Neocapritermes taracua* (Termitidae), I participated in the description of a previously unknown multi-component defensive mechanism, resulting in the production of benzoquinone(s), converted from hydroquinone(s) through the catalysis by a copper-binding protein.

To conclude, my results highlighted the complexity of chemicals used in communication and defence in termite societies, and contributed to the understanding of the evolution of pheromones and defensive chemicals in these oldest social insects.

INTRODUCTION

Chemical ecology is a relatively new discipline linking chemistry and biology in order to study interactions between organisms and their environment. Chemical signals represent the most ancient and widespread communication tool in the animal kingdom. The main objective of chemical ecologists is to get ‘the maximum amount of information from the minimum amount of the sample’ [1]. Since semiochemicals often occur in really low quantities, micrograms or less, microscale techniques together with microscale equipment are needed. In some cases, a simple chemical reaction leading to a modification of the original compound can facilitate the analysis by enhancing the separation, increasing the detectability or by indicating the presence of particular functional group at specific position in the molecule.

AIMS

The aim of my thesis is to unravel the chemistry of pheromone communication and chemical defence in societies of termites, with emphasis on poorly known species from phylogenetically important lineages. The main part of this thesis was performed in the frame of a research project entitled ‘Biology, chemical ecology, and phylogeny of critical termite genera from families Rhinotermitidae and Serritermitidae’. I studied and included in my thesis the following topics:

- trail-following communication of *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae) (Paper A)
- trail-following pheromone, sex pheromone and chemical defence in *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae) (Papers B, E)
- alarm communication in *Termitogeton planus* (Rhinotermitidae) (Paper D)

Beside the main project I was involved in two other projects on the chemical ecology of termites, performed in collaboration with biologists and chemists from foreign laboratories:

- trail-following pheromone and sex pheromone in *Hodotermopsis sjoestedti* (Archotermopsidae) (Paper C)
- chemical defence by workers of *Neocapritermes taracua* (Termitidae)

I also participated in the search for chemical fertility signals emitted by the kings and queens:

- identification of a fertility related volatile compound in *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae)

MATERIALS AND INSTRUMENTATION

Biological material

Colonies of *Glossotermes oculatus* and *Neocapritermes taracua* were collected in French Guiana, *Psammotermes hybostoma* in Egypt, *Hodotermopsis sjoestedti* in Vietnam and *Termitogeton planus* in West Papua. *Prorhinotermes simplex* originated from Cuba and is held in the laboratory since 1964.

Chemicals

Reagents and synthetic standards were purchased from Sigma-Aldrich or Fluka, solvents from Penta or Merck. Standards of trail-following pheromones were kindly supplied by Christian Bordereau (Dijon, France).

Instrumentation

One-dimensional GC-MS (quadrupole mass analyzer): Focus GC, Thermo Scientific DSQ II.

High-resolution MS data: Waters GCT Premier with time-of-flight mass analyzer.

Chiral separation: gas chromatograph HP 6850 Series (Agilent) with FID detector.

Two-dimensional comprehensive gas chromatograph coupled with mass detector (time-of-flight mass analyzer) GC×GC/TOF-MS: Pegasus 4D, Leco Corporation, United States.

Preparative gas chromatograph: 6890N gas chromatograph (Agilent) equipped with a liquid nitrogen cooled EPC PTV inlet (Gerstel, Mühlheim, Germany) and FID detector. Fractions collected in Preparative fraction collector (Gerstel).

Gas chromatograph coupled with electroantennographic detector (GC-EAD): GC-5890A Hewlett-Packard. EAD-termite antenna connected *via* two glass Ag/AgCl electrodes to universal AC/DC 10XProbe (Syntech, Hilversum, The Netherlands).

NMR spectra: Bruker Avance 500 MHz.

FTIR spectra: gas chromatograph Agilent 6850 combined with Nicolet 6700FT-IR spectrometer (Thermo Scientific).

RESULTS AND DISCUSSION

1 Pheromones

1.1 Trail-following pheromone of *Glossotermes oculatus*

This chapter reports on our results on the trail-following communication in the South-American species *Glossotermes oculatus*, published in Chemical Senses in 2012 (Paper A).

A biologically active hexane extract of sternal glands from 300 workers was analyzed by means of two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection (GC×GC/TOF-MS), giving rise to a very rich chromatogram (Fig. 1).

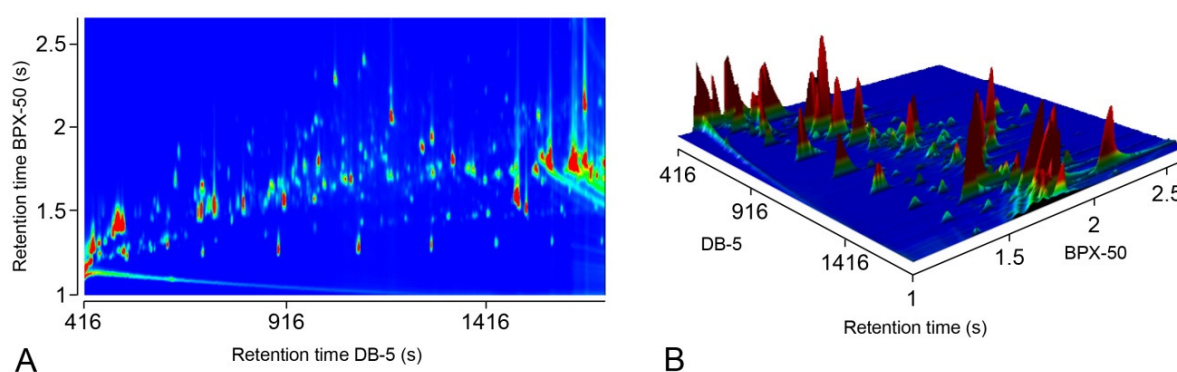


Fig. 1 A. 2D-chromatogram of the sternal gland extract of *G. oculatus* workers

B. 3D visualization

Because of the complexity of the extract, difficulties caused by the great abundance of fatty acids in the extract and the failure of our attempts of electroantennographic detection, we decided to fractionate the extract and test the biological activity of the fractions. Firstly, we used column chromatography and obtained 11 fractions (hexan:ether from 10:0 to 0:10). Since two of these fractions were active, we merged them and separated by means of preparative GC in three steps. From this series of fractionations we obtained one active retention window where we found a single candidate compound (KI = 2075 on DB-5) with m/z 278. EI-MS spectrum of this molecule is shown in Fig. 2.

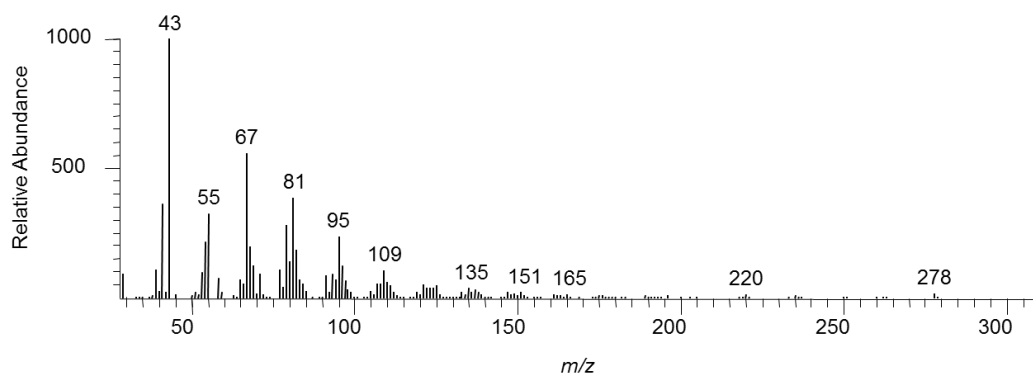


Fig. 2 EI-MS spectrum of the candidate compound

Based on EI mass spectrum and fragmentation pattern similar to naturally occurring linoleic acid and its derivatives, we proposed the structure (10*Z*,13*Z*)-nonadeca-10,13-dien-2-one (hereafter referred to as nonadecadienone). The stereochemistry was suggested in accordance with the natural linoleic acid. To confirm our hypothesis, the nonadecadienone was synthesized from commercially available methyl (9*Z*,12*Z*)-octadeca-9,12-dienoate (linoleic acid methyl ester). The comparison of the chromatographic behaviour and mass spectra of the synthetic compound with our candidate compound from an authentic extract manifested a perfect match. Although we have proposed the double bonds locations on the basis of the position in naturally occurring linoleic acid, we decided to confirm these positions empirically by comparing DMDS derivatives of synthetic and natural compounds (Fig. 3) and it again matched perfectly.

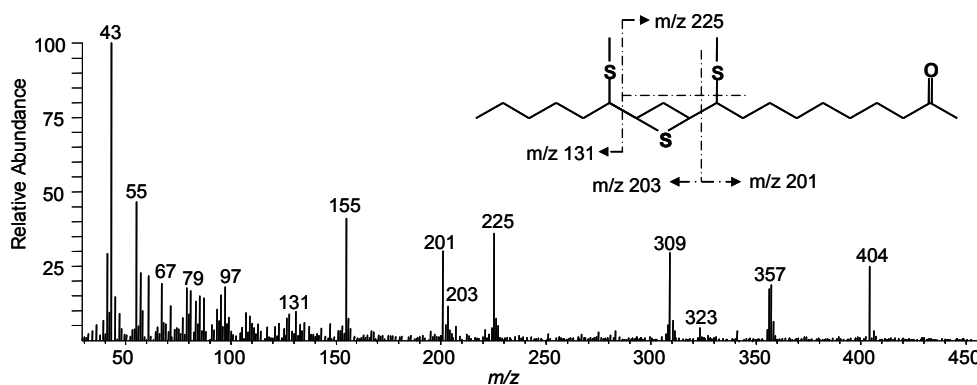


Fig. 3 DMDS of nonadecadienone

The identified structure, (10*Z*,13*Z*)-nonadeca-10,13-dien-2-one, differs dramatically from C12 unsaturated alcohols occurring as trail-following pheromones in all other advanced termite families and underlines the remote phylogenetic position of Serritermitidae.

1.2 Trail-following and sex pheromones in *Psammotermes hybostoma*

This chapter summarizes our investigations on the trail-following pheromone and the sex pheromone in the sand termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae) from Egypt, published in the Journal of Chemical Ecology in 2011 (Paper B).

The first part of this study was focused on the search for the trail-following pheromone. Bearing in mind the low quantities of termite trail-following pheromones per one individual, the analysis was performed using GC×GC/TOF-MS (LECO, Pegasus 3D) with a very concentrated sample representing an extract of 50 sternal glands in 1 μ l of hexane. Using of such a concentrated sample was possible only because of the low amount of fatty acids in the sternal gland extract in comparison with whole body extracts. Based on the retention indices and a typical fragmentation of the known termite trail-following pheromones, (3*Z*,6*Z*,8*E*)-dodeca-3,6,8-trien-1-ol (hereafter named dodecatrienol, *m/z* 180, KI=1525 on DB-5) was found in the sternal gland extracts of *Psammotermes hybostoma* when searching for a diagnostic fragment *m/z* 91 (Fig. 4).

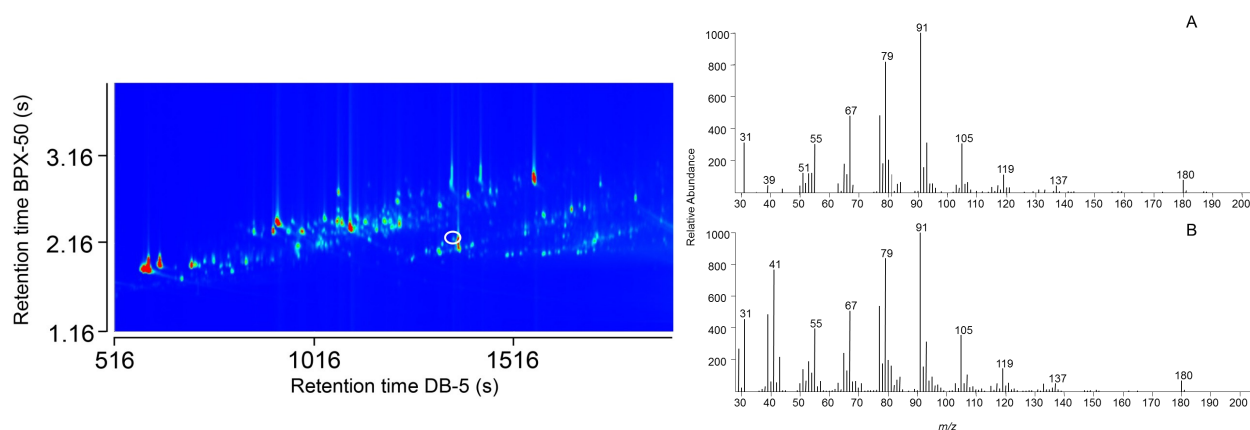


Fig. 4 Left: GC×GC chromatogram of the sternal gland extract of *P. hybostoma*, a white circle marks the peak of dodecatrienol. Right: EI-MS spectrum of (3*Z*,6*Z*,8*E*)-dodeca-3,6,8-trien-1-ol. A - extract of sternal glands, B - synthetic standard

Although the detection of dodecatrienol is not surprising from the phylogenetic point of view, since it is the most frequent termite trail-following pheromone, its chromatographic detection is difficult due to the minute active quantities of the compound and thus its low amounts in the glands. Indeed, this was the first time we had detected this compounds by chromatographic methods which underlines once again the effectiveness of modern analytical methods.

The second part of this study aimed to identify the female sex pheromone of *Psammotermes hybostoma* produced in the tergal and sternal glands of the swarming females. Prior to the proper analysis, hexane extracts of female alate heads were measured by means of GC-MS with quadrupole mass analyzer to check whether their cuticular hydrocarbons profiles are identical, indicating that they belong to the same species and population. Then the hexane extracts of sternal and tergal glands were analyzed using GC×GC/TOF-MS and by the injection of 25 gland equivalents in 1 μ l of hexane. Once again, we determined the presence of dodecatrienol in both types of extracts (Fig. 5).

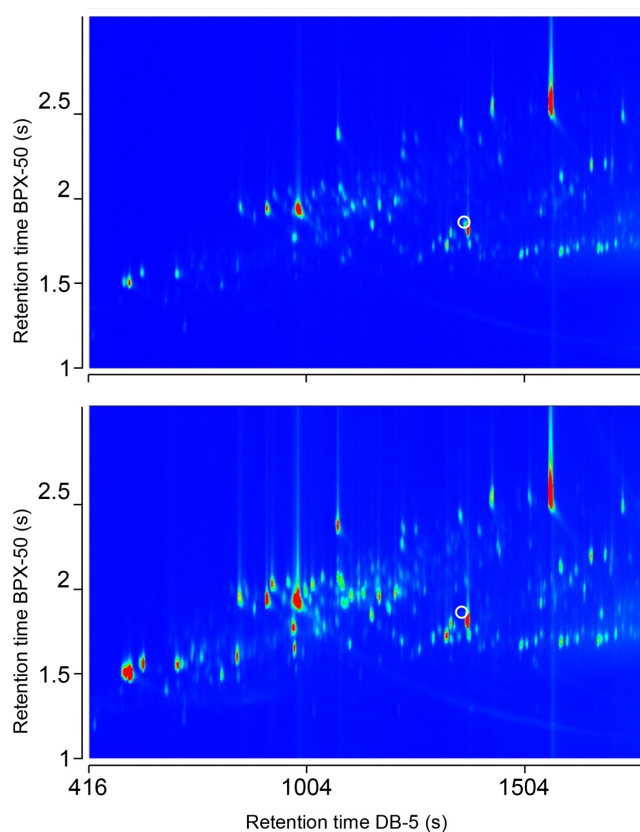


Fig. 5 GC×GC chromatograms of female tergal and sternal glands

To conclude, we identified (3*Z*,6*Z*,8*E*)-dodeca-3,6,8-trien-1-ol as the trail-following pheromone and at the same time as the sex pheromone in the sand termite *Psammotermes hybostoma*. Given an inaccuracy in quantification of this compound by two-dimensional GC caused by tailing, the quantity was estimated by electroantennography to be 1 - 10 pg in the sternal gland of workers and 1 pg in the sternal gland and 10 pg in the tergal glands of females.

1.3 Trail-following pheromone and sex pheromones in *Hodotermopsis sjoestedti*

This chapter summarizes a study on the trail-following pheromone and the sex pheromone in *Hodotermopsis sjoestedti* (Archotermopsidae) on which I had the opportunity to collaborate with researchers from Australia, France and Japan. The results of the study were published in the Journal of Insect Physiology in 2011 (Paper C).

For both purposes, extracts were prepared by rubbing of the surface of appropriate glands with SPME fibers (PDMS/DVB). For the study of the trail-following pheromone, sternal glands of 20 - 50 workers were extracted, for the sex pheromone 10-20 reproductives were used.

The trail-following pheromone was identified by the comparison of compounds detected on the sternal gland surface and on the control surface on the dorsum of abdomen. This experiment revealed the presence of one compound specific for the sternal gland with KI = 1468 on non-polar column DB-5 and KI = 1937 on polar DB-WAX. The EI-MS spectrum is shown in Fig. 6.

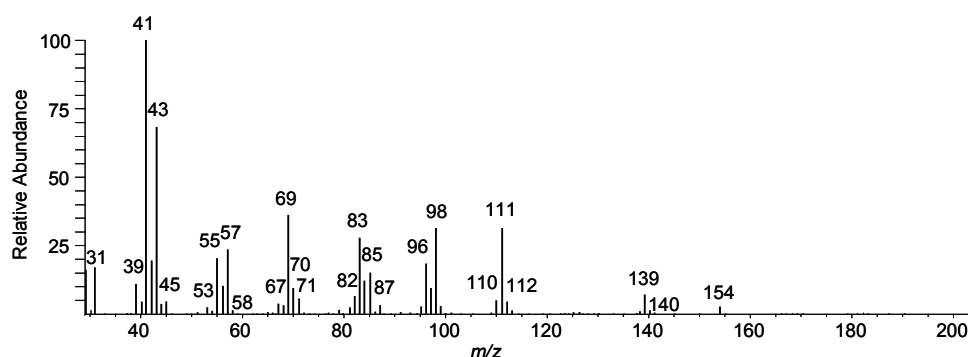


Fig. 6 EI-MS spectrum of *H. sjoestedti* trail-following pheromone

Based on the fragmentation pattern, FT-IR and comparison with published data [2] we proposed the structure 4,6-dimethylundecan-1-ol. Subsequent synthesis yielded a blend of *syn* and *anti* diastereomers. To identify the correct diastereomer used by termites, the GC profiles of the synthetic mixture and the natural extract were compared. On the basis of this comparison, we suggested that the trail-following pheromone of *H. sjoestedti* is *syn*-4,6-dimethylundecan-1-ol. Since *syn*-4,6-dimethylundecan-1-ol has two chiral carbon atoms, the two possible final structures were as follows (Fig. 7):

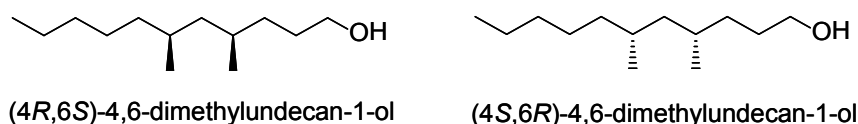


Fig. 7 Possible final structures of *syn*-4,6-dimethylundecan-1-ol

Similarly to the trail-following study, the sex pheromone of *H. sjoestedti* was studied from extracts obtained using SPME of sternal and tergal glands of reproductives. The specific compound of male reproductives with KI = 1406 on DB-5 and KI = 1668 on DB-WAX was detected on the surface of their sternal glands. The EI-MS spectrum is shown in Figure 8.

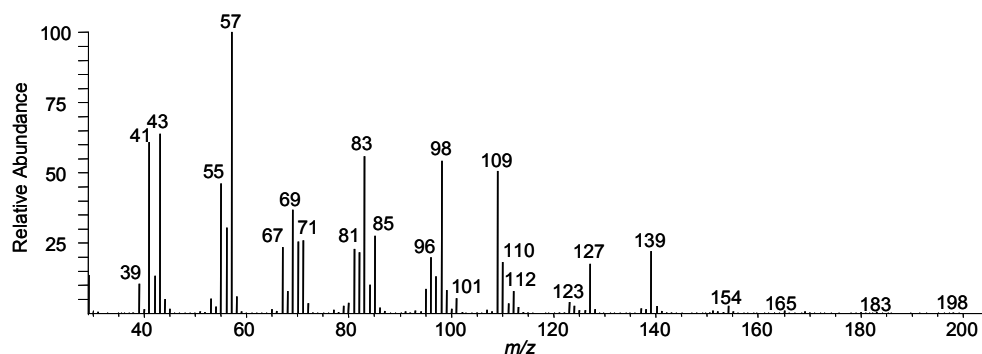


Fig. 8 EI-MS spectrum of the male specific compound

Having compared the MS spectrum with that of the male-specific compound in the related species *Zootermopsis nevadensis*, *syn*-4,6-dimethyldodecanal [2], we hypothesized the structure of the male sex pheromone in *H. sjoestedti* to be *syn*-4,6-dimethylundecanal. This compound was easily prepared by the oxidation of the previously prepared trail-following pheromone, 4,6-dimethylundecan-1-ol. And just as in the case of the trail-following pheromone, the two possible final structures were proposed (Fig. 9).

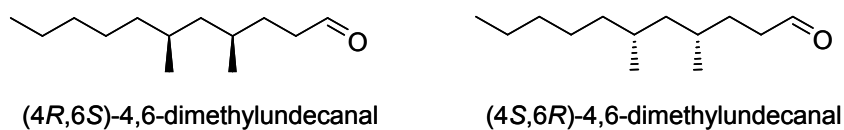


Fig. 9 Possible final structures of *syn*-4,6-dimethylundecanal

The situation in female reproductives appeared to be much easier since their specific compound corresponded to the female sex pheromone of *Zootermopsis nevadensis*, (5*E*)-2,6,10-trimethylundeca-5,9-dienal. Taking into consideration that sex-specific pheromones in both sexes were previously described only in the genus *Zootermopsis*, our results underlined the relation of the genera *Hodotermopsis* and *Zootermopsis* which were recently classified as sister genera and separated from other lineages in a distinct family Archotermopsidae [3].

1.4 Alarm pheromone in *Termitogeton planus*

This chapter summarizes our investigations of the chemical composition of the defensive secretion of soldiers in a poorly known termite species *Termitogeton planus* (Isoptera: Rhinotermitidae) from West Papua and on the biological role of the secretion in eliciting the alarm behaviour. The results of the study were published in 2014 in the Journal of Chemical Ecology (Paper D).

In the first step, twenty-four samples of soldier defensive secretion of *T. planus* collected from nine different colonies were analyzed by means of GC-MS with quadrupole mass analyzer (DSQ II) equipped with non-polar ZB-5MS column. For these analyses, two types of samples were prepared, i.e. extracts of 40 - 120 soldier heads prepared directly in the field and extracts of individual soldier heads prepared in the laboratory in Prague. All the samples were prepared in the same way using 10 μl of distilled hexane per individual for an extraction time of 12 hours at 4°C. For the purposes of relative quantifications, the internal standard, 1-bromodecane (40 ng/ μl), was co-injected with the samples. As a control, body extracts of 10 workers from each colony were analyzed, allowing us to clearly discriminate soldier-specific defensive chemicals (Fig. 10; Tab. 1).

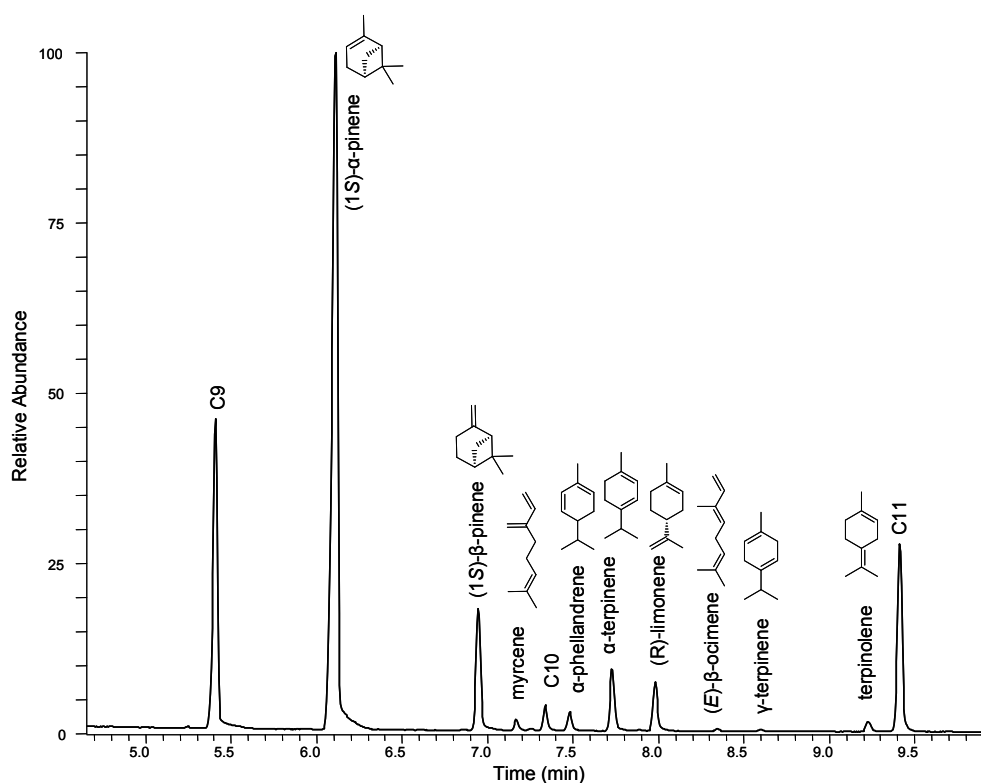


Fig. 10 GC chromatogram of the defensive secretion of *Termitogeton planus* soldiers

Tab. 1 summarizes the identity and relative proportion of soldier defensive compounds from all studied colonies.

	RI	TP-1	TP-2	TP-3	TP-4	TP-5	TP-6	TP-7	TP-8	TP-9	TP-10	TP-11	ng/ind.
Nonane	900	9.4	14.9	11.2	11.1	7.9	6.8	7.4	10.3	6.5	18.1	15.8	/
(1S)-(-)-α-Pinene	940	71.1	66.0	70.5	72.8	75.3	78.3	74.2	75.5	75.3	51.4	35.5	3300
(1S)-(-)-β-Pinene	986	11.1	12.1	11.5	10.0	10.2	9.9	11.1	11.3	10.2	7.5	6.5	500
Myrcene	991	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	<0.5%	ND	0.6	0.7	0.9	65
Decane	1000	<0.5%	ND	ND	ND	ND	ND	<0.5%	<0.5%	<0.5%	1.4	2.7	/
α-Phellandrene	1011	1.4	1.3	2.0	1.4	1.4	1.0	1.4	0.9	1.2	1.0	1.5	83
α-Terpinene	1022	2.5	1.6	2.9	1.5	1.8	1.5	2.8	0.9	1.9	4.0	4.9	250
(R)-limonene	1036	2.7	1.8	1.5	1.9	2.3	1.7	2.3	0.7	2.5	2.9	4.2	198
(E)-β-Ocimene	1048	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<0.5%	<0.5%	15
γ-Terpinene	1062	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<0.5%	<0.5%	10
Teprinolene	1092	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<0.5%	0.8	1.5	50
Undecane	1100	1.2	2.3	<0.5%	1.3	1.2	0.8	0.6	<0.5%	1.3	12.0	26.2	/

For a precise separation and identification, some of the samples were analyzed also by means of GC \times GC/TOF-MS (Leco, Pegasus III) and the separation in the second dimension revealed the presence of an alkene in trace quantities. Finally, we identified 4 saturated or unsaturated hydrocarbons together with nine monoterpene hydrocarbons, which were confirmed by their retention indices and fragmentation patterns with literature [4] and with commercially available standards. In view of the fact that enantiomeric purity is essential for eliciting the alarm behaviour [5, 6], we analyzed the natural extracts using GC-FID (HP 6850 Series) with a chiral column HP-CHIRAL-20B and compared with commercially available standards.

Subsequently, 8 synthetic standards of monoterpenes were mixed together in relative proportions corresponding to those in the authentic extracts and used in alarm bioassays. Since the synthetic mixture elicited the same alarm reaction as the natural extract, we continued with searching for the responsible compound(s). Low number of testing individuals did not allow us to test all possible combinations of monoterpenes, therefore we tested the mixtures prepared from 4 major monoterpenes, 4 minor monoterpenes and the dominant monoterpene (1S)- α -pinene. Although the reactions of the termites to the mixture of the four major compounds and (1S)- α -pinene were stronger, the mixture of minor compounds was also active in eliciting the alarm behaviour.

We concluded that the alarm pheromone of *T. planus* is a multi-component signal combining major as well as minor components from the defensive secretion of soldiers. Such a multi-component chemical signalling is preferred to single-component pheromones in a variety of insects and other animals [7] and represents what is called the chemical language [8].

1.5 Fertility signals in *Prorhinotermes simplex*

This chapter summarizes our investigations on chemicals produced by the reproductives of the termite *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae), expected to act as recognition cues. Based on previous investigations of my colleagues, we were searching for a small volatile compound, very likely quite polar, released from a binding protein secreted on the body surface of the kings and queens.

My first task was to develop a suitable extraction method compatible with GC. Finally, the most effective method was the extraction with dichloromethane for 16 hours in freezer. Fig. 11 shows a comparison of 1D chromatograms of male and female reproductives and workers prepared by the described method. The candidate compound specific to reproductives is marked with an asterisk.

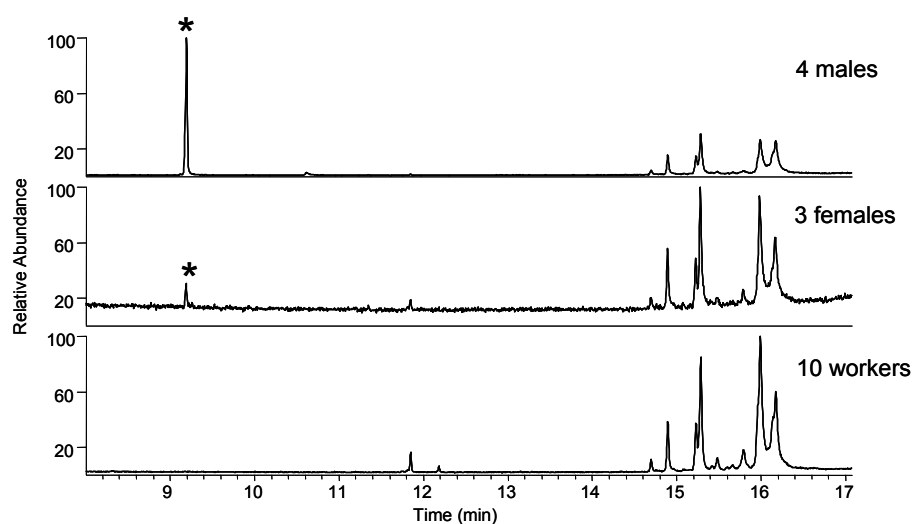


Fig. 11 GC profiles of reproductives versus workers

Subsequently, we proceeded to the identification of the unknown compound of the EI-MS spectrum depicted in Fig. 12.

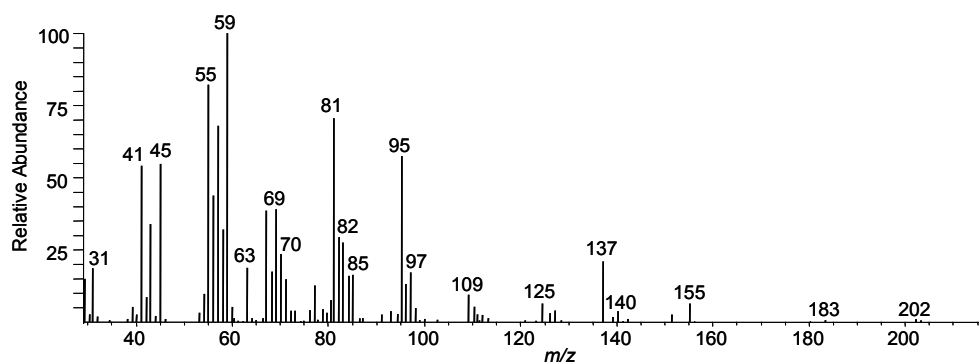


Fig. 12 EI-MS spectrum of the candidate compound

The analysis on Q-TOF (Waters) determined the molecular mass of our compound to be m/z 202 and the elemental composition $C_{12}H_{26}O_2$. The m/z 31, typical for alcohols, together with results from infrared spectroscopy suggested that the compound bears two hydroxyl groups. To localize the position of the hydroxy groups using TMSI, we prepared a silylated derivative of the compound as well as the silylated derivative of a commercial standard of a primary diol – dodecane-1,12-diol. The shift of the retention time suggested a branching of our compound. EI-MS spectrum of the compound after derivatization (Fig. 13) showed among the dominant fragments the fragments m/z 117 and 131. Based on these observations we proposed the molecular structure dodecane-2,10-diol.

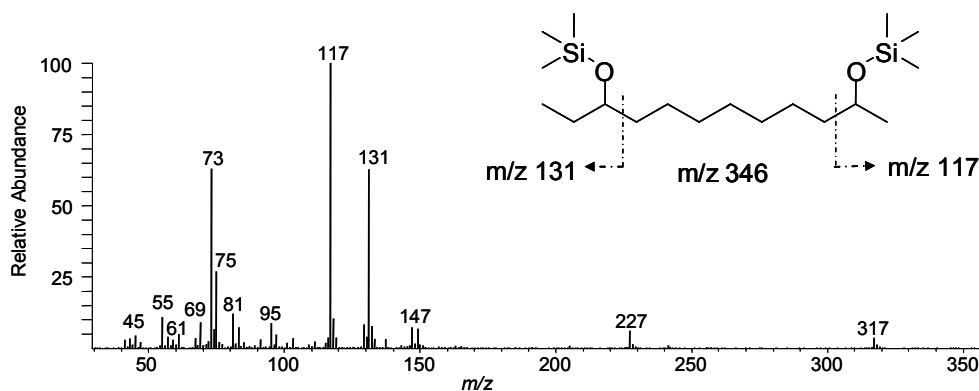


Fig. 13 EI-MS spectrum of the silylated compound

Finally, the compound from the natural extract was compared with the synthetic dodecane-2,10-diol using GC×GC/MS, GC-IR and both analyses revealed a perfect match. In addition, EI-MS spectra of silylated derivatives of both, natural and synthetic compounds, were identical. In the next step, we will selectively prepare the four possible isomers of dodecane-2,10-diol (Fig. 14) and design a suitable bioassay to investigate the biological role of the compound in termite colonies.

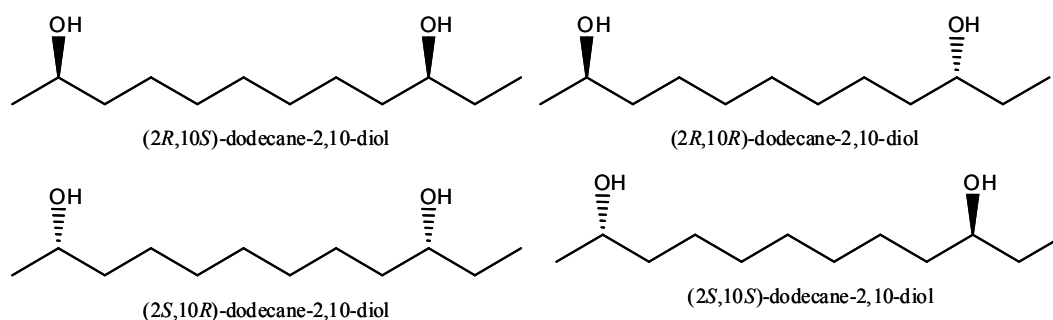


Fig. 14 Possible isomers of dodecane-2,10-diol

2 Defensive chemicals

2.1 Defensive chemicals in soldiers of *Psammotermes hybostoma*

This chapter summarizes our investigations on the defensive chemistry of soldiers in the termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae) published in the Journal of Chemical Ecology in 2012 (Paper E).

In this study, defensive secretions from the frontal gland of soldiers from nine colonies and five different localities from the Nile Valley and Egyptian Western Desert were analyzed in order to identify the defensive chemicals and compare their intracolony, intercolony and geographical chemical diversity. Extracts of workers and soldiers were compared in order to highlight chemicals specific to the caste of soldiers (Fig 15).

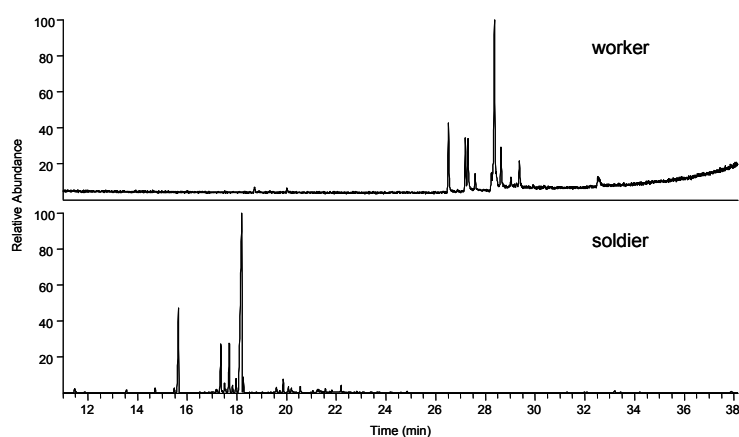


Fig. 15 Comparison of extracted workers and soldiers

Altogether, we detected 33 soldier-specific compounds, belonging mainly among sesquiterpene hydrocarbons and their oxygenated derivatives. Since standards of sesquiterpenes are in most cases not commercially available, majority of *P. hybostoma* chemicals was identified based on the comparison with literary data [4, 9] and when natural or synthetic standards were available, they were used for a final confirmation. Table 2 represents a simplified version of a table included in the Paper E. It shows all soldier-specific compounds identified in extracts in quantity superior to 1%. Even a simple visual inspection of the table allows to distinguish easily three different chemotypes, present in our sampling. The most indicative compounds for these chemotypes were β -elemene, valencene and (*E*)- γ -bisabolene.

Tab. 2 List of *P. hybostoma* defensive chemicals

RI	Name	Class	A1	A2	A3	B1 LS	B1 MS	B1 SS	C1	C2	D1	E1	E2
1188	<i>p</i> -methylacetophenone	ketone	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
1394	iso- β -elemene	sesquiterpene	-	-	-	2	3	3	2	-	-	-	-
1402	β -elemene	sesquiterpene	11	8	25	64	62	58	34	15	15	14	25
1451	2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methylbicyclo[5.3.0]decane	sesquiterpene	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1464	α -helmiscapene	sesquiterpene	18	16	8	5	5	7	4	5	-	-	-
1488	<i>cis</i> -eudesma-6,11-diene	sesquiterpene	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1495	selina-4,11-diene	sesquiterpene	-	-	-	-	-	-	7	5	8	-	-
1497	aristolochene	sesquiterpene	5	4	3	2	2	2	-	-	-	-	-
1504	valencene	sesquiterpene	58	65	54	22	21	26	19	31	6	3	6
1515	β -bisabolene	sesquiterpene	-	-	-	-	-	-	4	7	15	9	6
1532	7-epi- α -selinene	sesquiterpene	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	2
1541	(<i>E</i>)- γ -bisabolene	sesquiterpene	-	-	-	-	-	-	25	24	34	46	49
1549	(<i>E</i>)- α -bisabolene	sesquiterpene	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	-
1648	gossonorol	ox. sesquiterpene	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4	-
1690	unidentified	ox. sesquiterpene	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	-
1796	unidentified	ox. sesquiterpene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-

For the comparison of intercolonial variability, hexane extracts of 10 soldiers of each colony were analyzed, while to assess the intracolony variability, samples of 10 individual large soldiers from colony E2 and samples of 10 individual small soldiers from colony A1 were compared. Finally, we evaluated the variability among soldiers of different body sizes in the colony B1, containing all the three soldier categories (small, middle and large). Results are depicted in Figure 16.

To conclude, we had not observed any variations between soldiers of different body sizes neither within colonies. On the other hand, we detected quantitative and qualitative differences among particular localities which were in some cases so distinctive that three significantly different chemotypes corresponding well with the locality of origin were established. These findings prove the possibility of using termite defensive chemistry as a tool for studies on phylogeography.

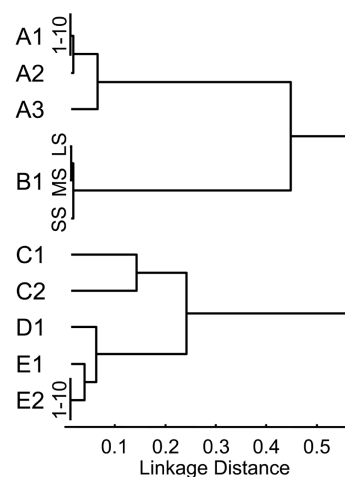


Fig. 16 Cluster tree

2.2 Defensive chemistry of the termite *Neocapritermes taracua*

This chapter summarizes our investigations on the defensive chemicals and the functional mechanism of defence in workers of the neotropical termite *Neocapritermes taracua* (Termitidae). This research was conducted as an extension of our previous study on anatomic and behavioural aspects of the defence in this species [10] and will be a part of a future publication on the chemistry of the unusual defensive strategy that we discovered in *N. taracua* [manuscript *in prep.*].

Workers of *N. taracua* have a unique two-component chemical defence. As they age, they gradually accumulate in two cuticular pouches outside their body cavity a pair of blue crystal-like structures (hereafter called blue crystals). When disturbed, the workers rupture their body wall between blue crystals and labial glands. The mixing of the labial glands content and blue crystals with hemolymph results in a yellow sticky fluid which is toxic to other termites. The collaborating biochemists determined that the blue crystals are copper-containing proteins and the quantity of the copper was estimated by ICP-MS to be 9 ± 2 ng [10]. However, the chemistry of the mechanism of *N. taracua* defence remained unclear.

Since solvent extraction revealed to be complicated because of insolubility in majority of solvents, I decided to use the SPME headspace extraction to study volatiles emitted by the bursting liquid. First experiments were performed with a group of 10 old workers with blue crystals and 10 young workers without the blue crystals. While in the sample of young workers without the blue crystals methyl- and ethylbenzoquinone were detected in moderate quantities, in old workers with the blue crystals we identified very large quantities of benzoquinone and its methyl- and ethyl-derivatives as well as hydroquinone and the corresponding methyl- and ethyl-derivatives (Fig. 17).

Subsequently, we analyzed five labial glands of workers of three categories (without blue crystals, with small blue crystals and with large blue crystals) which revealed the presence of hydroquinone and both its derivatives which were previously found in the headspace analysis. These compounds were found in all three categories of workers but there was an obvious increase in their quantity along with the increase in size of the blue crystals and thus with the age of the workers (Fig. 18).

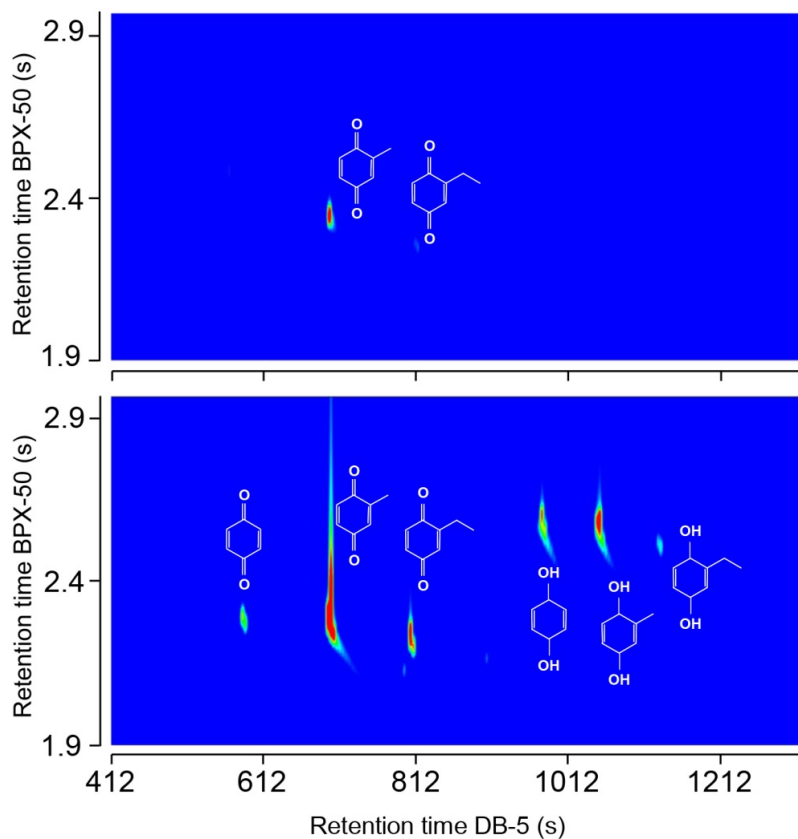


Fig. 17 Headspace analysis of workers without/with blue crystals

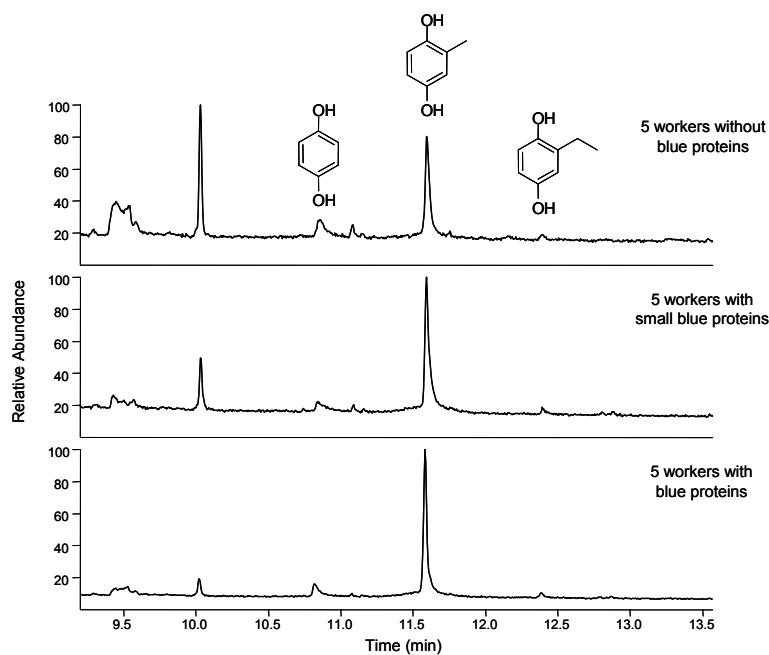


Fig. 18 The increasing quantity of hydroquinone and its derivatives with workers age

We also studied the relative quantity of benzoquinone and its derivatives in the bursting liquid of individuals at different age by headspace SPME and subsequent GC×GC/MS analysis (Fig. 19).

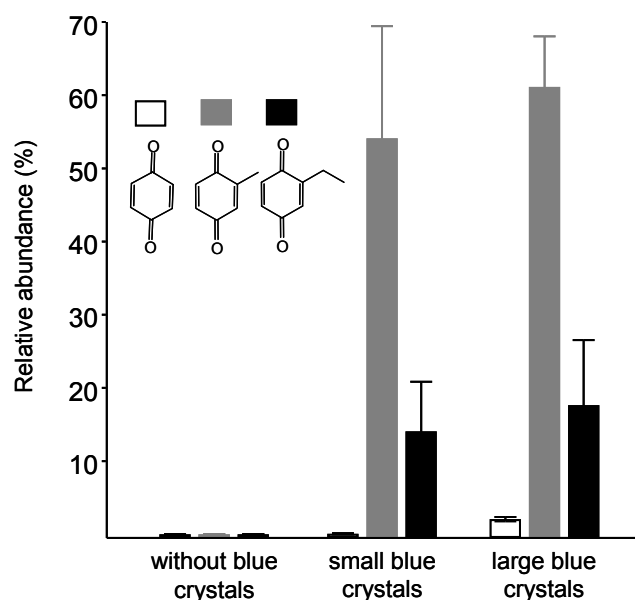


Fig. 19 Relative quantity of benzoquinone and its derivatives in the bursting liquid

Despite the difficulties in the quantification of outputs from two-dimensional gas chromatography, we noticed the same age-dependent trend in the increase of quantity of benzoquinones with age as in case of hydroquinone and its derivatives in labial glands. Thus we hypothesized that the defensive mechanism is based on an oxidative conversion of hydroquinone(s) originating in labial glands into benzoquinone(s) catalysed by the blue crystals, made up of copper-binding protein (Fig. 20).

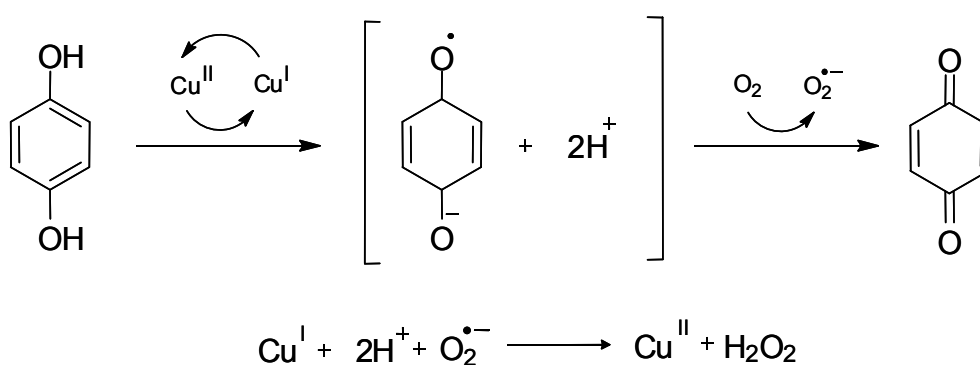


Fig. 20 Oxidation of hydroquinone by copper-binding protein [11]

Our findings are in agreement with the previously published data where the role of copper ions in enhancing of hydroquinone cytotoxicity has been described [11, 12]. The source of the copper and other aspects of this unique defensive strategy remain unknown.

SUMMARY

The aim of this thesis was to contribute to the knowledge on chemical communication and defence in selected important and poorly studied genera of termites, namely on chemical identity and function of semiochemicals and defensive compounds, and their chemical diversity in a phylogenetic context.

Within a research project focusing on critical termite genera from families Rhinotermitidae and Serritermitidae, I participated on the identification of a new trail-following pheromone in the serritermitid *Glossotermes oculatus*. The identified structure, (10Z,13Z)-nonadeca-10,13-dien-2-one, differs dramatically from C12 unsaturated alcohols occurring as trail-following pheromones in all other advanced termite families and underlines the remote phylogenetic position of Serritermitidae.

I was involved in the identification of trail-following and sex pheromones in the sand termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae). Although in both cases we assigned the pheromone role to the most frequent termite pheromone, (3Z,6Z,8E)-dodeca-3,6,8-trien-1-ol, it was the first time we have detected this compound by chromatographic methods. In *Psammotermes hybostoma*, also the defensive chemistry has been studied. Altogether 33 defensive chemicals have been detected and majority of them fully identified. Qualitative and quantitative comparison of defensive blend among colonies clearly distinguished three different chemotypes corresponding well with the locality of origin. Under the terms of the same project, I identified the chemical composition of alarm pheromone secreted by soldiers of a poorly known termite species *Termitogeton planus* (Rhinotermitidae). The alarm communication appears to be a multi-component signal, combining major and minor monoterpene components from the defensive secretion.

In collaboration with foreign laboratories, two new pheromones have been identified in the basal termite *Hodotermopsis sjoestedti*, i.e. *syn*-4,6-dimethylundecan-1-ol as the trail-following pheromone and *syn*-4,6-dimethylundecanal as the male sex pheromone,. Our results underlined the phylogenetic relationship of the genera *Hodotermopsis* and *Zootermopsis* within the family Archotermopsidae.

In workers of the neotropical termite *Neocapritermes taracua* (Termitidae), I participated on the description of multi-component defensive mechanism, resulting in the production of benzoquinone(s), converted from hydroquinone(s) through the catalysis by a copper-binding protein. Last but not least, dodecane-2,10-diol was identified as a fertility-related volatile in *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae) and a hypothetic primer pheromone.

REFERENCES

13. MILLAR J.G. & HAYNES K.F. **1998**. Methods in chemical ecology: Chemical Methods. Springer, New York.
14. BORDEREAU C., LACEY M.J., SÉMON E., BRAEKMAN J.-C., GHOSTIN J., ROBERT A., SHERMAN J.S. & SILLAM-DUSSÈS D. **2010**. Sex pheromones and trail-pheromones in the basal termites *Zootermopsis nevadensis* (Hagen) and *Z. augusticollis* (Hagen) (Isoptera: Termopsidae: Termopsinae). *Biol. J. Linn. Soc.* **100**: 519-530.
15. ENGEL M.S., GRIMALDI D.A. & KRISHNA K. **2009**. Termites (Isoptera): Their Phylogeny, Classification, and Rise to Ecological Dominance. *Am. Mus. Novit.* 1-27.
16. ADAMS R.P. **2007**. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition. Allured Publishing Corporation, USA.
17. LINDSTRÖM M., NORIN T., VALTEROVÁ I. & VRKOČ J. **1990**. Chirality of the monoterpene alarm pheromones of termites. *Naturwissenschaften* **77**: 134-135.
18. ROISIN Y., EVERAERTS C., PASTEELS J.M. & BONNARD O. **1990**. Caste-dependent reactions to soldier defensive secretion and chiral alarm/recruitment pheromone in *Nasutitermes princeps*. *J. Chem. Ecol.* **16**: 2865-2875.
19. ROWE C. **1999**. Receiver psychology and the evolution of multicomponent signals. *Anim. Behav.* **58**: 921-931.
20. BELL W.J. & CARDÉ R.T. **1984**. Chemical ecology of insects. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
21. JOULAIN D. & KÖNIG W.A. **1998**. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E.B.-Verlag, Hamburg.
22. ŠOBOŤNÍK J., BOURGUIGNON T., HANUS R., DEMIANOVÁ Z., PYTELKOVÁ J., MAREŠ M., FOLTÝNOVÁ P., PREISLER J., CVAČKA J., KRASULOVÁ J. & ROISIN Y. **2012**. Explosive Backpacks in Old Termite Workers. *Science* **337**: 436.
23. LI Y. & TRUSH M.A. **1993**. Oxidation of Hydroquinone by Copper: Chemical Mechanism and Biological Effects. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 346-355.
24. BOLTON J.L., TRUSH M.A., PENNING T. M., DRYHURST G. & MONKS T.J. **2000**. Role of Quinones in Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **13**: 135-160.

CURRICULUM VITAE

Mgr. Jana Krasulová

Born 1st of May 1985 in Zábřeh, Czech Republic
Single

EDUCATION

- 2004 - 2007** Bc. studies in Clinical and Toxicological Analysis at the Faculty of Science, Charles University in Prague
Thesis: 'Preparation of biologically degradable esters of dihydrobetulinic acid with antitumor activity', in Czech
- 2007 - 2009** M.Sc. studies in Clinical and Toxicological Analysis at the Faculty of Science, Charles University in Prague and IOCB, Czech Academy of Sciences, Prague
Thesis: 'Development of a method for determination of insect juvenile hormone using GC/MS', in Czech
- since 2009** Ph.D. studies in analytical chemistry at the Faculty of Science, Charles University in Prague and IOCB, Czech Academy of Sciences, Prague
Thesis: 'Analytical chemistry unravels the diversity and function of chemicals used for communication and defence in termite societies', in English

APPOINTMENTS

- 2009 - 2013** IOCB AS CR, Prague, Infochemicals Research Team, PhD. student
2014 - present IOCB, AS CR, Prague, Chemistry of Social Insects, Junior Research Group, PhD. student

LANGUAGES

English - level B2 (FCE certificate)
German - A2

RESEARCH INTERESTS

Analytical chemistry (before all GC-MS and GC×GC/MS) in studies on chemical communication of social insects. Isolation and identification of unknown compounds from natural sources.

MEMBERSHIP IN SCIENTIFIC SOCIETIES

International Society of Chemical Ecology

PUBLICATIONS AND COMMUNICATION

Author or co-author of 10 original research articles in peer-reviewed journals, 2 conference proceedings, 6 conference presentations, significant IOCB publication in 2012. 33 citations, H-index: 4.

LIST OF PUBLICATIONS

Original research articles in peer-reviewed journals

SILLAM-DUSSÈS D., HANUS R.*, OUKASHA ABD EL-LATIF A., JIROŠ P., **KRASULOVÁ J.**, KALINOVÁ B., VALTEROVÁ I. & ŠOBOTNÍK J. 2011. Sex Pheromone and Trail Pheromone of the Sand Termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae: Psammotermitinae). *Journal of Chemical Ecology* 37: 179-188.

LACEY M.J., SÉMON E., **KRASULOVÁ J.**, SILLAM-DUSSÈS D., ROBERT A., CORNETTE R., HOSKOVEC M., ŽÁČEK P., VALTEROVÁ I.* & BORDEREAU C.* 2011. Chemical communication in termites: *syn*-4,6-dimethylundecan-1-ol as trail-following pheromone, *syn*-4,6-dimethylundecanal and (5*E*)-2,6,10-trimethylundeca-5,9-dienal as the respective male and female sex pheromones in *Hodotermopsis sjoestedti* (Isoptera, Archotermopsidae). *Journal of Insect Physiology* 57: 1585-1591.

HANUS R., ŠOBOTNÍK J.*, **KRASULOVÁ J.**, JIROŠ P., ŽÁČEK P., KALINOVÁ B., DOLEJŠOVÁ K., CVAČKA J., BOURGUIGNON T., ROISIN Y., LACEY M.J. & SILLAM-DUSSÈS D. 2012. Nonadecadienone, a New Termite Trail Pheromone Identified in *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae). *Chemical Senses* 37: 55-63.

KRASULOVÁ J., HANUS R.*, KUTALOVÁ K., ŠOBOTNÍK J., SILLAM-DUSSÈS D., TICHÝ M. & VALTEROVÁ I. 2012: Chemistry and anatomy of the frontal gland in soldiers of the sand termite *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae). *Journal of Chemical Ecology* 38: 557-565.

ŠOBOTNÍK J., BOURGUIGNON T., HANUS R.*, DEMIANOVÁ Z., PYTELKOVÁ J., MAREŠ M., FOLTÝNOVÁ P., PREISLER J., CVAČKA J., **KRASULOVÁ J.** & ROISIN Y. 2012. Explosive Backpacks in Old Termite Workers. *Science* 337: 436.

SILLAM-DUSSÈS D., **KRASULOVÁ J.**, VRKOSLAV V., PYTELKOVÁ J., CVAČKA J., KUTALOVÁ K., BOURGUIGNON T., MIURA T. & ŠOBOTNÍK J.* 2012. Comparative study of the labial gland secretion in termites (Isoptera). *PLoS One* 7 (10): e46431.

BOURGUIGNON T., ŠOBOTNÍK J., HANUS R., **KRASULOVÁ J.***, VRKOSLAV V., CVAČKA J. & ROISIN Y. 2013. Delineating species boundaries using an iterative taxonomic approach: The case of soldierless termites (Isoptera, Termitidae, Apicotermittinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 694 -703.

CRISTALDO P.F., DESOUSA O., **KRASULOVÁ J.***, JIROŠOVÁ A., KUTALOVÁ K., LIMA E.R., ŠOBOTNÍK J. & SILLAM-DUSSÈS D. 2014. Mutual use of trail-following chemical cues by a termite host and its inquiline. *PLoS One* 9 (1): e85315.

DOLEJŠOVÁ K., **KRASULOVÁ J.***, KUTALOVÁ K. & HANUS R. 2014. Chemical alarm in the termite *Termitogeton planus* (Rhinotermitidae). *Journal of Chemical Ecology* 40: 1269-1276.

KYJAKOVÁ P., DOLEJŠOVÁ K., **KRASULOVÁ J.***, BEDNÁROVÁ L., HADRAVOVÁ R., POHL R. & HANUS R. 2015. The evolution of symmetrical snapping in termite soldiers does not implicate the loss of chemical defence. *Biological Journal of Linnean Society* DOI: 10.1111/bij.12540.

* - corresponding author

Conference proceedings

KRASULOVÁ J., HANUS R., ŠOBOTNÍK J., BOSÁKOVÁ Z. & VALTEROVÁ I. 2011. GC-MS analysis of termite defensive compounds secreted from their frontal glands. *Proceedings of 7th ISC Modern Analytical Chemistry* 46-49.

KRASULOVÁ J., HANUS R., SILLAM-DUSSÈS D., ŽÁČEK P., JIROŠ P., ŠOBOTNÍK J., KALINOVÁ B., BOSÁKOVÁ Z. & VALTEROVÁ I. 2012. Analytical methods used in studies on chemical ecology of termites. *Proceedings of 8th ISC Modern Analytical Chemistry* 79-81.

Poster presentations

KRASULOVÁ J., HANUS R., ŠOBOTNÍK J., BOURGUIGNON T., CVAČKA J., VALTEROVÁ I. 2010. Chemistry and anatomy of the frontal gland in termite imagoes. *ISCE 26th Annual Meeting, Tours, France*

KRASULOVÁ J., ŠOBOTNÍK J., SILLAM-DUSSES D., JIROŠ P., KALINOVÁ B., KUTALOVÁ K., VALTEROVÁ I., HANUS R. 2011. Chemical ecology of the sand termite *Psammotermes hybostoma* (Isoptera, Rhinotermitidae): Trail following and sex pheromones, defensive compounds. *Sixth International Symposium on Molecular Insect Science, Amsterdam, The Netherlands*

Oral presentations

KRASULOVÁ J., HANUS R., ŠOBOTNÍK J., ŽÁČEK P., JIROŠ P., KALINOVÁ B., LACEY M.J. 2011. Identifikace a syntéza stopovacího feromonu termitů druhu *Glossotermes oculatus* (Isoptera: Serritermitidae). *XI Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků 2011*
*one of the 5 awarded presentations

KRASULOVÁ J., HANUS R., ŠOBOTNÍK J., ŽÁČEK P., JIROŠ P., KALINOVÁ B., VALTEROVÁ I., LACEY M.J. 2012. Identification of a new termite trail-following pheromone, nonadecadienone, in *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae). *ISCE 28th Annual Meeting, Vilnius, Lithuania*
*Student travel award