

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Bc. Jan Křivánek

**Nový případ smíšené reprodukční strategie a její adaptivní
význam u neotropického termita *Silvestritermes minutus*
(Termitidae: Syntermitinae)**

New case of mixed reproductive strategy and its adaptive significance
in the neotropical termite *Silvestritermes minutus*
(Termitidae: Syntermitinae)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Robert Hanus, Ph.D.

Konzultant: RNDr. David Hořák, Ph.D.

Praha, 2016

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, 15. 08. 2016

Podpis

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval především svému školiteli Robertovi Hanusovi, který mne vůbec přivedl na cestu k termitům, velmi vydatně mi pomáhal jak při výzkumu, tak při psaní této diplomové práce a neztrácel se mnou až do posledních chvil trpělivost. Velký dík rovněž patří mé kolegyni Kláře Dolejšové, která mi celou dobu při výzkumu pomáhala a účastnila se závěrečných korekcí práce i vyhodnocování. Stejně tak patří dík veškerým mým kolegům na ÚOCHB AV ČR (Pavel Jedlička, Pavlína Kyjaková, Anna Jirošová, Jana Krasulová, Lucie Pompeiano Vaníčková a Ulrich Ernst), z nichž každý přispěl velkou měrou k objasnění záhad života mého modelového druhu. Za provedení genetických analýz patří rovněž můj velký dík kolegům na partnerském pracovišti Université Paris-Est Créteil, jmenovitě Virginii Roy, Romainovi Fougeyrollas a Davidovi Sillam-Dussès. Za poskytnutí prostor, bez nichž by tato práce mohla jen těžko vzniknout, děkuji vedení i personálu terénní stanice HYDRECO u přehrady Petit Saut, kde probíhal sběr veškerých terénních vzorků. Za pomoc se sběry v terénu děkuji našim belgickým kolegům, kteří se účastnili dvou výprav s námi – Yves Roisin a Simon Hellemans. Dále své snoubence Miroslavě Pušové, která mi po celou dobu byla oporou a rovněž se účastnila finalizace práce. A rovněž všem svým přátelům, kteří se mnou drželi po celou dobu psaní. Děkuji též svému konzultantovi Davidovi Hořákovi za cenné rady a v neposlední řadě děkuji celé své rodině za možnost studia i morální podporu v těžkých chvílích. Za finanční prostředky, díky kterým mohl můj výzkum probíhat děkuji GAUK (č. 358815) a katedře ekologie, na níž jsem svou práci mohl vykonávat.

Abstrakt

Díky rozvoji genetických metod v populační ekologii se podařilo v nedávné době učinit mnohé zásadní objevy v oblasti rozmnožovacích strategií společenského hmyzu. Jedním z nich je i popis smíšených reprodukčních strategií kombinujících výhody pohlavního rozmnožování a thelytokní partenogeneze. Královny takových druhů produkují sterilní jedince pomocí klasické pohlavní cesty z oplozených vajíček, zatímco budoucí královny vznikají nepohlavně z neoplozených vajíček. Tento originální reprodukční systém byl nejdříve popsán u několika rodů mravenců, velmi nedávno však bylo zjištěno, že se nevyskytuje jen u Hymenoptera, ale byl nalezen i u tak fylogeneticky vzdálené eusociální skupiny jako jsou termiti. Střídání pohlavního procesu a thelytokní partenogeneze, které bylo popsáno jako Asexual Queen Succession (AQS), jež umožňuje pokračování geneticky identických generací královen po smrti královny primární, bylo původně pozorováno jen u jediného rodu nižších termitů *Reticulitermes*. Našemu pracovišti se však nedávno podařilo podílet se na odhalení AQS u dalších čtyř druhů ze dvou podčeledí vyšších termitů. Jedním z nich je i *Silvestritermes minutus*. Tento ve Francouzské Guyaně lokálně abundantní druh, žijící v malých a dobře ohraničených koloniích na lokalitách se střední mírou disturbance, má ve svém životním cyklu tuto strategii obligátně zakořeněnu. Je pro něj totiž pravidlem velmi brzké nahrazení primární královny zakladatelky harémem neotenických královen, které zvětšují reprodukční schopnost a maximální investici do jediného brzkého vyrojení, po kterém kolonie patrně zaniká. Poměrně krátký životní cyklus, který pravděpodobně zřídka přesáhne tři roky, je originálním využitím této smíšené strategie, která zde neslouží pro prodloužení života kolonie, ale naopak především pro ranou disperzi. Genetická analýza ukázala, stejně jako v případě ostatních AQS druhů termitů, sexuální původ sterilních kast i okřídlených dospělců (alátů) a partenogenetický původ neotenických královen s vysokou mírou zachování heterozygotnosti, která ukazuje na automiktickou thelytokii s centrální fúzí. Ontogenetický původ neotenických královen na základě přímých pozorování, dlouhodobých pokusů i morfometrické analýzy můžeme dokladovat z nymf čtvrtého stadia. Sexuální dimorfismus alátů založený rovněž na morfometrické analýze ukázal větší velikost samiček ve všech měřených strukturách s výjimkou délky tibie, která je větší u samců. Rovněž hmotnost se ukázala jako stabilně větší u samiček. Zároveň jsme testovali hypotézu o příbuzenském výběru a asymetrické investici do alátů u druhů s AQS a došli k závěru, že u *S. minutus* je na populační úrovni investice do obou pohlaví vyvážená, což odpovídá našim pozorováním nepřítomnosti kolonií s inbrední genetickou strukturou pohlavních jedinců, která by mohla být motorem pro asymetrickou produkci alátů.

Klíčová slova: společenský hmyz, termiti, vyšší termiti, Termitidae, reprodukční strategie, Asexual Queen Succession, partenogeneze

Abstract

Thanks to the progress in genetic methods in population ecology, many critical discoveries were recently made in the field of reproductive strategies of social insect. Among them is the description of mixed reproductive strategies, combining advantages of sexual reproduction with thelytokous parthenogenesis. The queens of such species produce sterile castes through classical sexual process from fertilized eggs, while future queens develop asexually from unfertilized eggs. This original breeding system was first described in several genera of ants, but it was found very recently, that it is not restricted to social Hymenoptera, since it has been identified also in the phylogenetically remote eusocial clade of termites. Switching between the sexual process and thelytokous parthenogenesis, now known as Asexual Queen Succession (AQS), which enables a continuity of genetically almost identical queen generations after the death of the founding primary queen, was first reported only in one genus of lower termites, i.e. *Reticulitermes*. Recently, our research group participated at the identification of AQS in four other species from two subfamilies in higher termites. One of these species is *Silvestritermes minutus*. This species is locally abundant in French Guiana and lives in small, well shaped nests on localities with a middle degree of disturbance and AQS is an obligate element of its life cycle. We showed that this species obligatorily and very early replaces the founding primary queen with a harem of neotenic queens, boosting thus the reproductive potential of the colony and maximizing the investment into a single dispersal event, followed likely by the decline of the colony. Relatively short life cycle, which rarely exceeds three years, is an original way how to benefit from the mixed reproduction, which is not used to extend the lifespan of the colony, but rather for an early maximum dispersal.

Genetic analysis showed, just as in other AQS termite species, the sexual origin of sterile castes and wing dispersers (alates) and parthenogenetic origin of neotenic queens with a high rate of conservation of heterozygosity, indicating an automictic thelytoky with central fusion. Direct observations, long-time experiments and morphometric analyses indicated that the neotenic queens develop from the fourth nymphal stage. Sexual dimorphism in alates, also studied by morphometric analysis, showed that all evaluated structures are larger in females, except for tibia, which was longer in males. The body mass was significantly and consistently larger in females. We also tested the hypothesis on kin selection-driven asymmetrical investment into alates and concluded that at the population level, the investment into the two sexes of alates is identical. It is consistent with our observations of the absence of colonies with inbred breeding structure, which might be the driving force for asymmetrical investment.

Keywords: social insects, termites, higher termites, Termitidae, reproductive strategies, Asexual Queen Succession, parthenogenesis

Obsah

Seznam zkratk	8
1. <u>Úvod</u>	9
1.1 Termiti a eusocialita	9
1.2 Reprodukce pomocí sekundárních pohlavních jedinců	12
1.2.1 Typy sekundárních pohlavních jedinců.....	14
1.2.2 Sekundární pohlavní jedinci u nižších termitů	16
1.2.3 Sekundární pohlavní jedinci u vyšších termitů	17
1.3 Smíšené reprodukční strategie u společenského hmyzu	19
1.3.1 Smíšené strategie u sociálních blanokřídých.....	21
1.3.2 Asexual Queen Succession u termitů	22
1.4 Poměr pohlaví disperzních jedinců u termitů	26
2. <u>Cíle práce</u>	28
3. <u>Metodika</u>	29
3.1 Terénní práce	29
3.1.1 Studovaná lokalita v prostoru a čase	29
3.1.2 Sledované parametry kolonií, sběr, příprava a konzervace materiálu.....	30
3.2 Rekonstrukce životního cyklu kolonie	31
3.3 Zjišťování poměru pohlaví disperzních jedinců v koloniích	32
3.4 Zjišťování ontogenetického původu královen	35
3.4.1 Morfometrická analýza nymfálních stadií a imag	35
3.4.2 Dlouhodobé vývojové pokusy.....	36
3.4.3 Indikace fertility reprodukčních kast.....	37
3.5 Genetická analýza reprodukční struktury kolonií	37
4. <u>Výsledky</u>	39
4.1 Rekonstrukce životního cyklu kolonie	39
4.1.1 Sociální struktura kolonií v maturační sezóně.....	39
4.1.2 Sociální struktura kolonií v reprodukční sezóně	40
4.1.3 Velikost hnízd v reprodukční a maturační sezóně.....	41
4.1.4 Životní cyklus kolonií	42
4.2 Poměr pohlaví disperzních jedinců v koloniích	46

4.2.1 Poměr pohlaví během maturačního období.....	46
4.2.2 Poměr pohlaví během reprodukčního období.....	46
4.3 Pohlavní dimorfismus u imag.....	47
4.4 Ontogeneze neotenických královen.....	48
4.4.1 Přímá pozorování	48
4.4.2 Výsledky dlouhodobých pokusů	49
4.4.3 Výsledky morfometrické analýzy	50
4.5 Interpretace genetické analýzy.....	51
4.6 Ekologické faktory spojené s hnízdem.....	52
5. <u>Diskuze</u>.....	54
6. <u>Závěry</u>.....	58
7. <u>Seznam použité literatury</u>.....	59
8. <u>Podpůrná data</u>	67

Seznam zkratk

AQS – z anglického „Asexual Queen Succession“, tedy strategie kombinující thelytokní partenogenezi pro produkci neotenických královen s pohlavním procesem pro produkci ostatních kast

DF – stupně volnosti

FAA – fixační směs používaná pro lepší zachování barev vzorku

NY – nedospělý jedinec imaginální vývojové linie, nymfální stadium, jak je označováno v grafech

PCA – analýza hlavních komponent, principal component analysis, metoda statistického vyhodnocení

PGE – eliminace jedné sady parentálních chromozomů při vývoji samců

SD – směrodatná odchylka

1. Úvod

1.1 Termiti a eusocialita

Termiti, nebo též postaru všekazi (Isoptera), jsou řádem hmyzu, který je součástí komplexu Dictyoptera a v současnosti se z hlediska fylogeneze řadí nejčastěji do příbuzenstva švábů (Blattaria) (Nalepa a Bandi 2000). Jakkoliv byl blízký vztah termitů a švábů dlouho nasnadě, teprve relativně nedávno byli termiti s pomocí molekulární fylogeneze ustanoveni jako jejich vnitřní skupina, spolu se švábím rodem *Cryptocercus* sesterská čeledi Blattidae (Inward *et al.* 2007). Nejbližší žijící příbuzný termitů je xylofágní rod švábů *Cryptocercus*, u něhož se na sesterský vztah poukazovalo již dlouho před snesením molekulárně fylogenetických důkazů a to na základě jeho kryptického života v rodinných, subsociálních komunitách a péče o potomstvo podobné jako u termitů, včetně krmení s pomocí anální trofalaxe, a přítomnosti společných střevních bičíkovců rodu *Trichonympha* (Ohkuma *et al.* 2009). Někdy jsou proto sdružováni do společné skupiny Xylophagodea (Engel 2011). Termiti jsou nejstarší eusociální skupinou hmyzu, která vznikla pravděpodobně již v období triasu (Thorne *et al.* 2000, Nalepa a Bandi 2000), ač první fosilní nálezy pocházejí až z období spodní křídy (Nalepa a Bandi 2000, Krishna *et al.* 2013).

Eusocialita je definována třemi hlavními prvky, tj. a) kooperativní péče o potomstvo, na níž se podílí celá skupina, b) reprodukční dělba práce, která vede ke specializovaným kastám zajišťujícím rozmnožování a jiným, zajišťujícím chod kolonie (obrana, sběr potravy, péče o potomstvo, atd.); ty se sice samy nerozmnožují, ale zvyšují svou fitness péčí o potomky reprodukcí se jedinců, kteří jsou jejich rodiči nebo sourozenci a c) překryv samičích generací, kdy společná péče vede k delšímu společnému životu jedinců a rovněž rozdílné životnosti sterilních a reprodukcí se kast (Crespi 1994). Eusocialita splňující tato kritéria se vyvinula mnohokrát nezávisle a v rámci hmyzu se objevuje i v několika dalších skupinách, v některých z nich se vyvinula hned několikrát. U blanokřídlých (Hymenoptera) se jedná o společenské včely (Apoidea), některé vosy (Vespidae) a kutilky (Crabronidae) a dále o všechny známé druhy mravenců (Formicidae). Vyskytuje se u několika australských hálkotvorných třásněnek (Thysanoptera) (Chapman *et al.* 2008) a nalézáme ji u některých mšic (Sternorrhyncha) – rovněž hálkotvorných Pemphigidae a Hormaphididae (Betzig 2014). U Coleoptera se jedná pouze o jediný výjimečný druh australského xylofágního brouka *Austroplatypus incomptus* z čeledi Curculionidae (Kent a Simpson 1992).

Přímým důsledkem vývoje eusociality je tedy vznik kastovního systému. Vývoj kasty dělníka byl u termitů zaznamenán několikrát nezávisle na sobě a to i na několika úrovních fylogenetického stromu. Kasta dělníka sice může být permanentně sterilní, ale mnoho skupin si zachovává schopnost subfertility a vývoje v plodícího jedince (viz kapitola 1.2.1). Byla to obrana společných zdrojů, která

však byla největším krokem vedoucím k opravdovému překročení prahu eusociality. Voják, jakožto první skutečně altruistická kasta ztrácí schopnost dalšího vlastního rozmnožování (Tian a Zhou 2014) a je to právě obrana hnízda, která stimuluje evoluci tohoto altruismu (Crespi 1994). S výjimkou dvou velmi odvozených skupin termitů, u nichž došlo k sekundární ztrátě kasty vojáka (Bourguignon *et al.* 2010) a jejich úlohu zde přebírají dělníci, ji nalezneme v různém procentuálním zastoupení u všech současných skupin termitů.

Všechny v současnosti žijící druhy termitů, kterých je dnes popsáno přibližně 3000 (2933 žijících, 3106 včetně fosilních podle Krishna *et al.* 2013), žijí eusociálně. Řád je v tradičním pojetí dělen na dvě skupiny. Na jedné straně jde o tzv. nižší termity, které charakterizuje asociace se střevními protisty tří řádů kmene Parabasalia (Hypermastigida, Trichomonadida a Oxymonadida) (Inoue *et al.* 2000), schopnými spolu s archebakteriemi obsaženými ve střevě přímo trávit složité polysacharidy a zejména celulózu. Dále se liší především ontogenetickým vývojem jednotlivých kast a méně dokonalou dělbu práce v kastovním pojetí. Obsahují osm čeledí – Mastotermitidae, Archotermopsidae, Stolotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae, Termopsidae, Kalotermitidae a Hodotermitidae. Jejich hlavní složkou potravy je dřevo v různých podobách a stádiích rozkladu, často napadené houbami a plísněmi, což usnadňuje další trávení celulózy. Jejich vývoj je lineární nebo větvený.

Druhá skupina – vyšší termity, oproti tomu využívají k degradaci celulózy vlastní enzymy celulózy a symbiotické bakterie (různé skupiny Proteobacteria, Spirochaetae a další) (Schmitt-Wagner *et al.* 2003, Li *et al.* 2013) a jejich potravu tvoří z velké části rostlinný materiál již částečně degradovaný – opadanka, hrabanka nebo humus, dále ale i stébla trav a případně listy či stonky rostlin. V rámci této skupiny se některé rody podčeledi Macrotermitinae specializují na cílené pěstování mycelií a hyf hub rodu *Termitomyces*. Velká část se živí též zbytkovou celulózą z jílovitých materiálů půdního horizontu. Obsahují jen jednu čeleď Termidae, která však patří k nejpočetnějším čeledím vůbec (asi 1900 druhů) a obsahuje asi 85% všech rodů termitů (Kambhampati a Eggleton 2000).

Termity procházejí hemimetabolním vývojem, jehož průběh se však velmi liší v rámci čeledí a druhů a dokonce i v rámci jednotlivých kast jednoho druhu. Ačkoliv je terminologie kastovního systému termitů podobná jako u dalších eusociálních skupin, zejména společenských blanokřídlých, v mnoha ohledech se zásadním způsobem liší, což je dáno klíčovými rozdíly v biologii mezi holometabolním řádem Hymenoptera a hemimetabolními termity. Například už jen karyotypová struktura není haplodiploidní jako u blanokřídlých, nýbrž diplodiploidní se systémem určení pohlaví typu *Drosophila*. Zároveň jednotlivé kasty neobsahují jen samice, ale jedince obou pohlaví, i když se jejich zastoupení může v rámci kast druhově specificky lišit a preferenčně se posouvat ve prospěch jednoho či druhého pohlaví – každé pohlaví také uvnitř jednotlivých kast může plnit jinou funkci v rámci

pohlavně specifického polymorfismu a polyetismu (Hanus 2008, Roisin 2000). Ontogenetický vývoj kast a tedy i sociální složení kolonií nejsou řízeny genetickou determinací, ale jsou podmíněny především enviromentálně-endokrinním komplexem faktorů, který je zodpovědný za diferenční aktivaci genové exprese v různých fázích embryonálního a zejména postembryonálního vývoje (Mayr 1963). Totipotentní genom společný všem jedincům hnízda totiž obsahuje vývojové programy pro jakoukoli kastu a k expresi vývojových programů pro jednotlivé kasty dochází mnohdy až v pozdních stádiích hemimetabolního vývoje (Miura 2004, Watanabe *et al.* 2014). Níže uvádím jednotlivé kasty v kastovním systému termitů a tím zároveň definuji terminologii, tak jak ji bude ve své práci používat. Pro zavedení terminologie stadií a kast a jejich českých ekvivalentů se řídím pracemi těchto autorů: Thorne (1996), Myles (1999), Roisin (2000), Roisin a Korb (2011) a Hanus a Šobotník (2004).

Larva – je nedospělý jedinec bez náznaků specializované morfologie (křídelních základů, externích pohlavních orgánů nebo morfologických znaků vojáka), z tohoto stadia lze nastoupit jak na imaginální, tak na apterní vývojovou linii. Larvy jsou potravně závislé na krmění od ostatních jedinců.

Nymfa – je nedospělý jedinec s křídelními základy rostoucími s každým svlékáním, který postupuje po imaginální linii ke stadiu okřídleného aláta nebo neotenického reprodukčního jedince.

Pseudergat, nepravý dělník – pozdní bezkřídle stadium vývojové linie u druhů s lineárním vývojem, který se vyskytuje jen u některých linií nižších termitů. Zastává funkci dělníka, zachovává si však širokou paletu vývojových možností, tedy vývoje v nymfu a pak imago, vývoje v bílého vojáka a vojáka a také v neotenického pohlavního jedince. Může však také procházet stacionárním vývojem, zůstat pseudergatem a pomáhat v kolonii.

Dělník – jedinec vzniklý odchýlením z imaginální vývojové řady směrem na sterilní linii. Tento přechod je u vyšších termitů ireverzibilní, dělník se tedy již nemůže vyvinout v imago. Může se ovšem u některých druhů stát sekundárním pohlavním jedincem, tedy neotenikem.

Bílý voják – vzniká z dělníka, larvy či nymfy a je krátkodobým přechodovým stadiem předcházejícím stadiu vojáka. Je nepigmentovaný, má nesklerotizovanou kutikulu a mandibuly. Hlava však už je jasně diferencována a morfologicky připomíná vojáka.

Voják – jedinec se silně sklerotizovanou hlavou, nesoucí obranné struktury, jako jsou zbytnělé mandibuly nebo hypertrofované vyústění frontální žlázy na kuželovitém výrůstku. Toto stadium je již permanentně sterilní a koncové.

Imago, alát, okřídlený dospělec – dospělý jedinec s plně vyvinutými pohlavními žlázami a křídly, který vznikl vývojem z posledního nymfálního stadia. V koloniích vznikají v reprodukčním období a připravují se na svatební let. Postrádají prothorakální žázy a tím i možnost dalšího svlékání. Jde o

jediné faktické imaginální stadium a zároveň ancestrální rozmnožovací formu termitů, která je téměř universálně přítomna jako hlavní rozmnožovací kasta pro zakládání nových kolonií.

Primární pohlavní jedinec/dealát – vzniká z okřídleného dospělce po svatebním letu a ztrátě křídel. Primární pohlavní jedinec zakládá s partnerem opačného pohlaví (primární král s primární královnou) novou kolonii. Téměř universálně jsou kolonie zakládány jediným párem primárních pohlavních jedinců, výjimečně, v případě některých Termitidae, jsou známy druhy s tendencí zakládat kolonie kooperativně s více jedinci, tedy tzv. pleometrózou (Hartke a Rosengaus 2013).

Sekundární pohlavní jedinci – ontogeneticky rozmanitá kategorie, která sdružuje pohlavní jedince, kteří se vyvinou do plodného stavu v mateřské kolonii a nezakládají tedy kolonii novou svatebním letem. *Adultoid* – imaginální jedinec, který odvrhl křídla a bez svatebního letu se dále rozmnožuje v rámci mateřské kolonie. Všechny ostatní kategorie sekundárních pohlavních jedinců jsou jedinci neoteničtí (neotenici), kteří nejsou faktickými imagy a vyvíjejí se do plodného stavu z různých stadií, podle nichž se také klasifikují. *Ergatoid* – neotenický jedinec vzniklý z apterní vývojové linie z kasty dělníka. *Pseudergatoid* – vzniká z pseudergata u druhů, které nemají kasty pravých dělníků. *Nymfoid* – (brachypterní neotenik) vzniká z nymfy, obvykle je proto rozeznatelný dle zkrácených základů křídel.

Interkast – jedinec snížené funkcionality, u kterého došlo k projevu kastovních znaků několika kategorií. Může vzniknout po velké disturbanci v kolonii, jakou může být například smrt reprodukcí se jedinců, nebo potravní deprivace. Dále může být jeho vznik způsoben i parazitací jedince (Neoh 2010), nebo vystavení kolonie experimentálním podmínkám.

1.2 Reprodukce pomocí sekundárních pohlavních jedinců

Zatímco primární pohlavní jedinci jsou imaga, která zakládají nové kolonie po svatebním letu, sekundární pohlavní jedinci vznikají v již existujících koloniích a nadále se rozmnožují filopatricky v rámci vlastní kolonie. Vzácněji mohou rodné hnízdo opustit a s kohortou dělníků a vojáků založit novou kolonii tzv. „pučením“. Neotenici mají velký evoluční význam, jelikož rozmnožování v rámci mateřské kolonie je pravděpodobně jedním z důležitých kroků ve vývoji eusociality (Roisin 1999). U mnoha druhů neslouží jen jako nouzová strategie pro nahrazení primárních pohlavních jedinců, kteří zahynuli nebo přestali plodit, ale má mnohem větší důsledky pro vývoj a ekologickou úspěšnost druhu (Thorne *et al.* 2003).

Reprodukce s pomocí sekundárních pohlavních jedinců navíc přináší řadu výhod, které ve své práci shrnuje Myles (1999). Z hlediska sekundárních pohlavních jedinců jde o několik výhod rozmnožování

se v rámci mateřské kolonie – v první řadě je to reprodukce asistovaná pomocníky v již založeném a fungujícím hnízdě s dostatkem surovin včetně potravy, větší bezpečnost oproti podnikání svatebního letu a jistota nalezení partnera. Z hlediska celé kolonie pak jde především o výhodu delší životnosti kolonie, která tímto nemusí nutně zaniknout smrtí primárních jedinců. Dále je to možný alternativní způsob rozšiřování kolonie „pučením“ nových kolonií v periferních částech mateřské kolonie, který může být v některých případech bezpečnější a méně nákladný než příprava kolonií na rojení (Husseneder *et al.* 2003). Naopak je ale rozmnožování s pomocí sekundárních pohlavních jedinců spojeno i s řadou nevýhod, mezi něž patří především potenciální inbrední deprese, jelikož se spolu páří geneticky blízcí jedinci (potomci primárního páru), kteří nesou identické alely jako rodiče. Další nevýhodou je i reprodukční kompetice mezi těmito blízkými příbuznými pohlavními jedinci.

Tito sekundární pohlavní jedinci v kolonii vznikají v několika případech – může jít o izolační fragmentaci hnízda, kdy dojde k oddělení části hnízda vlivem náhodné disturbance, potravní fragmentaci, která může proběhnout v lokalitě s velkým množstvím nutričních zdrojů, nebo periferní fragmentaci, která vzniká na okrajích velkých kolonií, kdy dochází k oddělení samosprávných podjednotek nebo při cíleném rozšiřování kolonií „pučením“ (Myles 1999). To, že se tento program spouští při osíření kolonie, nebo případně při její fragmentaci, vedlo k názoru, že jde o pravděpodobnou reakci na absenci inhibičního feromonu roznášeného pomocí trofalaxe, kterým primární královna zabraňuje vzniku nových reprodukčních jedinců (Lüscher 1961). Přesný mechanismus šíření byl však dlouho nejasný, ač se mohlo dle některých výzkumů jednat o produkci pomocí kolaterálních žláz (Myles a Chang 1984). Zatímco u sociálně primitivních druhů žijících pouze v malých společenstvech (např. Kalotermitidae, rod *Zootermopsis* a další), kde je osobní kontakt mezi jedinci kolonie skutečně zprostředkovatelný, se předpokládá působení pomocí kutikulárních uhlovodíků (Liebig *et al.* 2009, Weil *et al.* 2009). Naopak u druhů, žijících ve velkých koloniích, se předpokládá spíše těkavý signál. Mechanismy regulace rozmnožování a signalizace plodnosti u termitů byly každopádně dlouho neznámé, byť s jasnými důkazy o tom, že hlavní roli hrají královské feromony. Teprve v poslední době byl poprvé popsán chemický princip, kterým královna udržuje v kolonii své monopolní reprodukční postavení. Jde o tzv. královský primer feromon, identifikovaný u druhu *Reticulitermes speratus*, jakožto směs dvou vysoce těkavých látek (Matsuura *et al.* 2010). Tyto těkavé látky mohou fungovat jako indikátor fertility, atraktant dělníků, komunikační prostředek královských kast i antimikrobiální látka (Matsuura 2012).

Podle funkce, kterou sekundární pohlavní jedinci v kolonii plní, jsou rozlišováni **doplňkoví pohlavní jedinci**, kteří vznikají v kolonii za přítomnosti funkčních pohlavních jedinců a doplňují rozmnožovací potenciál kolonie a **náhradní pohlavní jedinci**, kteří naopak nahrazují funkční pohlavní jedince po jejich smrti. Zmínky o takovém uspořádání nalézáme už v díle Život termitů (Maetterlinck 1929), kde se lze dočíst, že „plní-li královna všekazů, lépe snad říkajíc zmocněná samička, neboť ničím jiným

není, štedře svůj úkol, nedostane soupeřku. Když povoluje v plodnosti, odstraní ji všekazi, neposkytující jí potravu, nebo jí přidají určitý počet pomocnic. Takto bylo nalezeno až 30 královen, v jedné kolonii, která tím neupadla v bezvládu a zkázu, do níž by upadl úl, kdyby se zvětšil počet matek, nýbrž naopak byla velmi silná a v rozkvětu.“ Samotné neotenicke samičky pak v českém překladu Maetterlinck nazývá „matkami plebejskými“ neboť morfologicky se jedná pouze o matky „slepé a bezkřídle, které plní všechny úkoly pravé královny bez nebezpečí pro stát.“.

1.2.1 Typy sekundárních pohlavních jedinců

U sekundárních pohlavních jedinců se rozlišuje několik základních typů, které se liší jak původem, tak morfologií a rovněž plodností. Není však pravidlem, že by napříč druhy vznikali za stejných podmínek nebo stejnou ontogenezí.

Adultoid – sekundární pohlavní jedinec pocházející z imaga, které odhodilo křídla a místo disperze svatebním letem se rozmnožuje v rámci své mateřské kolonie. Morfologicky jsou jen těžko odlišitelní od primárních pohlavních jedinců, i když je v některých případech zmiňováno, že jsou oproti nim někdy méně pigmentováni (Noirot 1985). U některých jedinců může být zbytek po křídle v odlomové zóně oddělen nepravidelně, případně nést i zbytek křídla. Jako samostatná kategorie bývají někdy vyčleňována **mikroimaga**, která nesou všechny imaginální znaky, ale mají vyvinutá křídla, jež jsou pouze zkrácená (Roisin a Pasteels 1985). Žádný ze zmíněných znaků ale není úplně spolehlivý, a pokud tedy dojde k takovému nahrazení, je mnohdy velmi těžké určit, zda jde o adultoidní náhradní jedince, nebo jedince zakládající, případně o kolonii spoluzaloženou více aláty.

Doklady k tomu však máme díky pokusům s odebráním primárních pohlavních jedinců, kteří byli později úspěšně nahrazeni těmito adultoidy (Sieber 1985). Tito jedinci se vyskytují dle všeho jen u 13 druhů ve skupině vyšších termitů. U nižších termitů nebyli nikdy zaznamenáni (Noirot 1985).

Apterní neotenic, ergatoid – neotenicke sekundární pohlavní jedinec, pocházející z kasty pravého dělníka. Většinou se vyvíjejí jediným svlékáním dělníka, v některých případech však vznikají pomocí dvou až tří svlékání (Thorne a Noirot 1982) z důvodu složité přestavby pohlavních orgánů, které jsou u dělníků redukovány a potřebují tak více instarů pro postupné zvětšování svého objemu. Po prvním svlékání ze stadia dělníka se dostávají do přechodného stadia, někdy též nazývaného pre-ergatoid (Roisin a Pasteels 1987), během kterého u nich dochází k růstu pohlavních orgánů, ale teprve po druhém svlékání jsou plodní. Zatímco v některých případech se ergatoidi morfologicky neliší od dělníků jako např. u *Termes hospes*, jindy během svého vývoje prodělají řadu vnějších i vnitřních změn, jak bylo sledováno např. u *Nasutitermes corniger* nebo *N. columbicus*, kde se během svlékání objevují i další změny, jako zvětšení mesonota i metanota a vznikají drobné struktury připomínající křídelní základy. U druhého stadia se navíc mohou objevit velmi drobné složené oči. V histologickém záznamu je pak nalézán mozek bez větších rozdílů oproti dělničímu, jen s velmi omezeným vývojem

optických laloků, které u dělníků téměř chybí (Noirot 1985). Funkční ergatoidi jsou pravděpodobně spíše krátkodobě žijící kastou, vzhledem k velmi malým tukovým zásobám, ač v případě *N. corniger* je u samičích ergatoidů nalezena tuková tkáň královského typu a může se tedy jednat o kastu žijící déle než běžný dělník. Ergatoidní samice však mají ve srovnání s primární královnou mnohem nižší úroveň fyzogastrie (nadměrného zvětšení zadečku) a tudíž i plodnosti (Myles 1999).

Apterní neotenik, pseudergatoid – pohlavní jedinec vznikající z nepravého dělníka – pseudergata, který se vyskytuje u termitů, kterým chybí kasta pravého dělníka. U několika čeledí nižších termitů existuje kasta tzv. nepravých dělníků, kteří v pozdním instaru vratně opouštějí imaginální linii. V případě svlečení do stadia pseudergatoida je tento proces často doprovázen velmi agresivními střety a souboji mezi příbuznými jedinci stejného pohlaví. U pseudergatoidů nedochází k velkým morfologickým změnám při svlékání do terminálního stadia, často je spojen pouze s vyšší pigmentací a růstem pohlavních orgánů, fyzogastrie a plodnost je poměrně omezená (Nagin 1972, Myles 1999).

Brachypterní neotenik, nymfoid – sekundární pohlavní jedinec pocházející z nymfální linie. Tito jedinci mohou vznikat z nymf různých stadií. Oproti ergatoidům je v jejich případě ke vzniku zapotřebí většinou pouze jediného svlékání, jelikož pohlavní orgány jsou již u nymf ve srovnání s dělníky dobře vyvinuty (Noirot 1985). Morfologicky se tento typ velmi liší na základě nymfálního stadia, ze kterého pochází. Jako hlavní charakteristika se ale uvádí, že ve všech případech mají tito jedinci znatelně zkrácené a rovnější křídelní základy než odpovídající nymfální stadia.

Doba možného vzniku těchto nymfoidních neoteniků je velmi špatně dokumentována, i když podle některých zmínek (Noirot 1985) mohou u vyšších termitů vznikat již po osmi týdnech od založení oddělků. Vývoj nymf v neoteniky dobře zdokumentoval Miller (1942) u nižšího termita *Prorhinotermes simplex*, který je charakteristický velice flexibilním vývojem a zachováním vysoké schopnosti odpovídat ontogenetickými proměnami na změnu sociálního či nutričního statusu kolonie. Izolované nymfy tohoto druhu se v řádu několika dnů po osíření svlékají v neoteniky a po několika týdnech obnoví funkční kolonii.

Samotná morfologická přestavba v nymfoidního neotenika je doprovázena několika dalšími znaky. Dle hypotézy Mylese a Changa (1984) je vývojový program přestavby v neotenika způsoben díky částečné expresi imaginálního vývojového programu, díky čemuž dojde k dozrání pohlavních orgánů, ale je pozastaven celkový vývoj křídel. Především jde v tomto případě o vývoj vnějších pohlavních orgánů a rovněž jejich vývoj vnitřní. U neoteniků se často projeví celá řada dalších změn, jako jsou částečná pigmentace, ztráta či redukce abdominálních stylů (která však není pravidlem a může se lišit v závislosti na druhu, pohlaví a reprodukční strategii), modifikace kutikulárních set, vývoj složených očí a ocelli (Costa-Leonardo *et al.* 1999) a vývoj křídelních základů v redukované formě. Dalšími zaznamenanými změnami jsou i nepatrné zmenšení hlavy, prodloužení tibií nebo vývoj kyčelní

(coxální) armatury, která je sice společná dělníkům i vojákům, ale většinou chybí u imag (Sewel a Watson 1981). Jedná se o nejrozšířenější sekundární strategii v rámci vyšších termitů.

V některých případech se jako zvláštní kategorie nymfoidů vyčleňuje **alatoid**, což je neotenik vzniklý z posledního pre-imaginálního instaru (Gay 1971). Vyskytují se však velmi vzácně.

Larvoid – sekundární pohlavní jedinec, který vznikl z nedospělého larválního stadia. Vyskytuje se u některých nižších termitů (Myles a Chang 1984).

Plodný voják, neotenický voják – pouze u jediného rodu *Zootermopsis* si vojáci všech tří druhů zachovali možnost rozmnožování, kteří tak rovněž mohou plnit úlohu sekundárních pohlavních jedinců (Myles 1986). Jedná se vlastně o pseudergata, u kterého se jediným svlékáním zároveň spustí morfogenetické procesy charakteristické pro vojáka a pro neotenika. Někteří autoři v tomto ojedinělém pozorování spatřují velký adaptivní význam, který přisuzují schopnosti tohoto neotenika uspět v soubojích o reprodukční místo v kolonii, případně při konfliktu se sousedními koloniemi, které jsou u rodu *Zootermopsis* poměrně časté (Myles 1986, Thorne *et al.* 2000).

1.2.2 Sekundární pohlavní jedinci u nižších termitů

Neotenie je velmi rozšířená u všech skupin nižších termitů a nelzáme ji až u 60% rodů. U Termopsidae (ve 100% druhů) jsou těmito náhradními pohlavními jedinci především pseudergatoidi, ale v menším procentu se vyskytují i nymfoidi a larvoidi. Zároveň do této skupiny patří i rod *Zootermopsis*, u kterého nalzáme plodné vojáky (Myles 1986). Sekundární samice zde nedosahují vysokého stupně fyzogastrie. U jediného druhu rodu *Mastotermes* (Mastotermitidae) jsou v sociální struktuře neoteničtí jedinci častější, než pohlavní jedinci primární. Neotenické královny rovněž nejsou fyzogastrické a jedná se vždy o ergatoidy (Watson a Abbey 1985). U Hodotermitidae (67%) jsou neotenicí nacházení asi v polovině případů a jedná se vždy o jedince nymfálního původu. Ti v některých případech v kolonii fungují i ve větších počtech zároveň. V rámci čeledi Rhinotermitidae (57%) se zastoupení neoteniků velmi liší. U podčeledí Heterotermitinae i Coptotermitinae nacházíme neotenyky nymfoidního nebo ergatoidního původu schopné žít ve větších počtech pohromadě a jejich samice bývají fyzogastrické, zatímco u Prorhinotermitinae obvykle pouze neotenyky ergatoidní, byť jsou neotenie schopné i nymfy. Neotenicí jsou jen lehce fyzogastričtí a fungují jako náhradní pohlavní jedinci nahrazující ve větším počtu zakladatelský pár. Velmi nedávno byla u *P. canalifrons* zaznamenána schopnost neoteniků opustit kolonii se skupinou pseudergatů a založit kolonii novou pučením (Rupf a Roisin 2008). U Rhinotermitinae se vyskytují ergatoidi, fungující hlavně při izolačních fragmentacích a rovněž jsou schopni koexistence ve větších počtech. V dalších podčeledích jako Termitogetoninae nebo Psammotermitinae je neotenie rovněž známa. U Kalotermitidae se neotenie objevuje v méně než polovině rodů (46%). I u těch navíc v koloniích nalzáme spíše primární uspořádání než sekundární. Nejčastěji zde neotenicí slouží jako náhradníci za primární jedince a

nevyskytují se s nimi v kolonii současně. Neotenici jsou původem pseudergatoidi, larvoidi, nebo nymfoidi (Myles 1999). Samice jsou ve všech případech nefyzogastrické. Vysoká agresivita mezi vznikajícími sekundárními pohlavními jedinci často vyústí v rozmnožování pouze jednoho páru.

1.2.3 Sekundární pohlavní jedinci u vyšších termitů

Neotenie v rámci vyšších termitů není příliš rozšířena a nalézáme ji pouze u 14% rodů. Tato strategie se dlouho ukazovala pouze jako nouzový rozmnožovací prostředek a opatření v případě smrti primárních pohlavních jedinců. Jak ale později uvidíme, může mít i zásadní význam jako stabilní strategie v rámci životního cyklu.

V podčeledi Apicotermatinae je v naprosté většině kolonií sociální uspořádání primárního charakteru. Prvním typem jsou neotenici nymfoidního charakteru, kteří jsou nalézáni velmi vzácně v rámci rodu *Anoplotermes*. Druhým typem sekundárních pohlavních jedinců jsou u některých druhů adultoidi, kteří spolu v malých počtech mohou koexistovat. U podčeledi Nasutitermitinae jsou neotenici vzácně nalézáni u některých xylofágních druhů. *Nasutitermes polygynus* je jedním z druhů, u kterých se v rámci oddělení částí kolonie při dostatku zdrojů objevují adultoidi, kteří se vyskytují i ve větších počtech v jednom hnízdě (Roisin a Pasteels 1986). U některých druhů, jako např. *Nasutitermes corniger* či *N. columbicus*, se prokazatelně vyskytují i ergatoidi, kteří vznikají jakožto náhradní jedinci po smrti primárních pohlavních jedinců, samičky jsou fyzogastrické a často se rovněž vyskytují ve velkých počtech (i několik stovek v jednom hnízdě)(Noirot 1985). Nepočtené, ale fyzogastrické neotenické samičky nymfoidního původu, byly nalezeny též u lichenofágního druhu *Constrictotermes cavifrons* (osobní pozorování). U Macrotermatinae skutečné neoteniky nenalézáme. Zatímco ve většině hnízd je nacházen primární pár, jakožto nouzovou strategií při osídlení kolonie u této skupiny nalézáme adultoidy (Darlington 1985), kteří mohou v menších počtech koexistovat. Mohou se též vyskytovat u kolonií, kde primární královna polevuje v plodnosti. Náhradní samice dosahují velmi vysokého stupně fyzogastrie. Zdokumentovány jsou případy u *Macrotermes michaelseni* (Darlington 1985) a *Macrotermes herus* (Darlington 1988). Největší incidenci rozmnožování pomocí sekundárních pohlavních jedinců však nalézáme u podčeledi Termitinae. U rodu *Cubitermes* se objevují hnízda většinou primární struktury. Pokud u některých druhů nacházíme pohlavní jedince náhradní, jedná se o adultoidy či mikroimaga. Pouze v několika případech byli nalezeni nymfoidi a v jednom případě pravděpodobně nefunkční ergatoidi, vznikající dvěma svlékáními (Noirot 1969).

U rodu *Paracapritermes* je vzácně dokumentován vznik alatoidů (Gay 1971) či pseudoimag. Rovněž se zde vyskytují adultoidi. Sekundární jedinci se snášejí i ve větších počtech pohromadě a samice bývají fyzogastrické. U rodu *Amitermes* může být neotenické uspořádání v koloniích častější než primární. Neotenici jsou nymfoidi a samice bývají fyzogastrické (Myles 1999).

U druhu *Cavitermes tuberosus* (Fournier *et al.* 2016) je přítomnost sekundárních pohlavních jedinců pozorována asi v polovině kolonií, většinou u větších. Jde o lehce fyzogastrické nymfoidní samičky, pocházející z třetího nymfálního stadia, procházející přes univerzální stadium „čekatelky“. V tomto stadiu může v kolonii vyčkávat až do okamžiku nahrazení primární královny.

V případě *Termes hospes* se mohou v koloniích nouzově vyvíjet ergatoidi (Noirot 1985, Roisin 1990), vznikající pomocí dvou svlékání, kteří mají velmi malou úroveň fyzogastrie a jsou spíše krátkodobě žijící. Velmi rozšířená je v této podčeleď neotenie spojená s parazitickou životní strategií. U druhů, které se totiž specializují na získávání potravy přímo z materiálu hnízd jiných druhů je nahrazování velmi časté, snad kvůli velmi riskantnímu způsobu života, při kterém mohou o primární zakladatelský pár snadno přijít a bylo by tak velmi nestrategické spoléhat se na dlouhý život jediného páru. Neotenicí byli pozorováni u druhů *Xylochomitermes occidualis* a *X. reductus*, dále u *Hesperotermes infrequens*, *Crepititermes verrucosus*, *Spinitermes brevicornutus* a *S. nigrostomus*, a u obligátních parazitů, u nichž jsou však tyto neotenicí nacházeni pouze v párech *Ahamitermes hili* a *Incolitermes pumilus* (Myles 1999). Ve dvou případech byly pozorovány neotenicí samičky nymfoidního původu u druhu *Inquilinitermes inquilinus* (osobní pozorování).

I když u samotného bazálního rodu *Syntermes* nejsou sekundární pohlavní jedinci v koloniích nikdy nalézáni (Myles 1999), v podčeleď Syntermitinae je známo několik málo rodů, kde se neotenicí vyskytují. Např. u druhu *Silvestritermes euamignathus* (Costa-Leonardo *et al.* 1999), kde jsou nalézáni neotenicí jedinci nymfoidního a v několika případech i ergatoidního původu obou pohlaví ve velkém počtu v koloniích, z nichž byl experimentálně odebrán primární pár. V některých případech ke vzniku takových jedinců může pravděpodobně dojít po fúzi dvou kolonií (Haifig *et al.* 2016). Všichni tyto neotenicí jedinci pocházejí pravděpodobně ze čtvrtých a pátých nymfálních stadií, nalezen je i jeden případ alatoida (Costa-Leonardo *et al.* 1999). U dalšího humivorního druhu *Embiratermes neotenicus* (Holmgren 1906, Fougeyrollas *et al.* 2015) jsou naopak nymfoidky ve společnosti primárního krále nacházeny téměř ve všech případech, zatímco nálezy kolonií obsahující dva primární pohlavní jedince jsou velmi vzácné. V tomto případě velmi fyzogastrické neotenicí královny (v počtu i několika desítek až stovek v jednom hnízdě) vznikají z nymf čtvrtého stadia. Dalším druhem s pozorovaným výskytem neotenicích královen namísto královny primární (Emerson 1933) je i můj modelový druh *Silvestritermes minutus*, studovaný v této práci.

1.3 Smíšené reprodukční strategie u společenského hmyzu

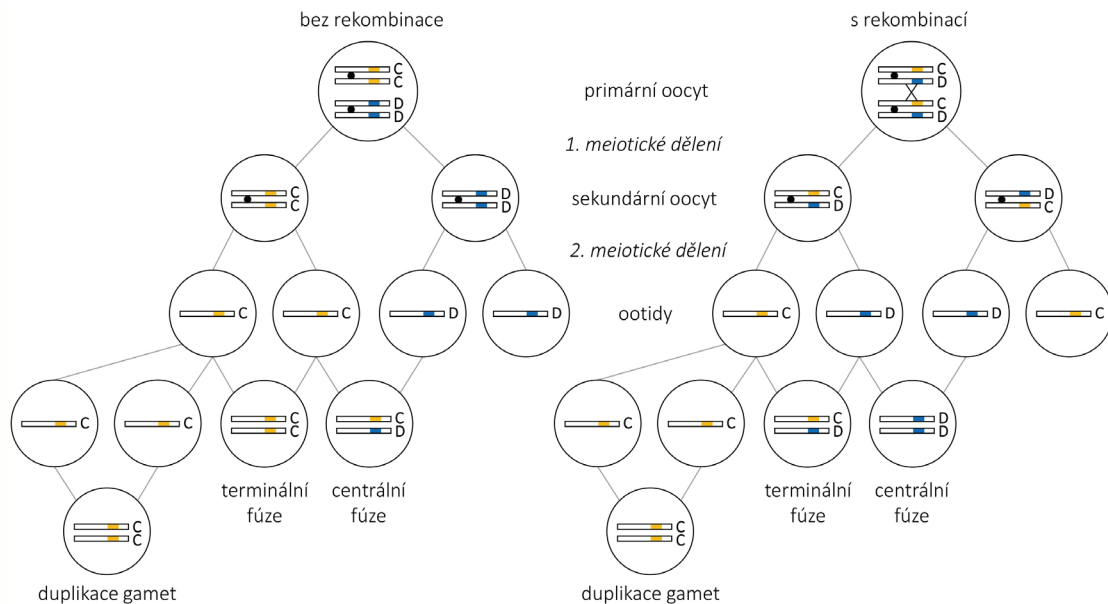
Jedním z nejzásadnějších kroků v evoluci živých organismů byl vznik biparentálního pohlavního rozmnožování, při němž potomstvo vzniká ze zygoty tvořené splynutím samčích a samičích pohlavních buněk (amfimixie) a je zdaleka nejběžnějším způsobem rozmnožování u většiny mnohobuněčných organismů. Tato dominance sexuální reprodukce je však v mnoha ohledech těžko vysvětlitelná a je základem celé řady evolučních teorií o významu, původu a zejména udržení pohlavního rozmnožování u většiny současných organismů, jejichž společným jmenovatelem je snaha vysvětlit tzv. „paradox sexuality“ (*paradox of sex*). Gonochoristická amfimixie, spojená s rozrůzněním pohlaví na mikrogametické samce a makrogametické samice, je totiž procesem dosti náročným, který vyžaduje řadu složitých mechanismů a investic jak na úrovni buněk, tak na úrovni celých organismů a jejich chování, jež mají za cíl zajistit nalezení partnera a úspěšné oplození. Dalším zjevným problémem plynoucím z podstaty biparentálního rozmnožování je z pohledu jednotlivce přenos pouhé poloviny jeho genů do generace potomků. Z pohledu samic je tu pak nutnost produkce samců, kteří sami aktivně neplodí potomstvo (Maynard Smith 1978, Williams 1975). Posledně zmíněný problém je jedním z nejčastějších argumentů, které zpochybňují výhodnost biparentálního rozmnožování, známý pod anglickým termínem *two-fold cost of sex* (Maynard Smith 1971). Paradoxem sexuality pak je právě fakt, že jsou existující způsoby rozmnožování, které netrpí zmíněnými nedostatky biparentálního rozmnožování, tak málo rozšířeny mezi současnými organismy.

Nejběžnějším z nich je partenogeneze, tedy rozmnožování s pomocí vajíček neoplozených opačným pohlavím. Partenogenetické rozmnožování s sebou přináší mnoho výhod z hlediska samic, pro něž takový způsob reprodukce znamená přenos dvojnásobného množství genů a možnost rozmnožování bez přítomnosti samce (Maynard Smith 1978). Partenogeneze samotná jako produkce potomstva z vajíček neoplozených samcem v sobě zahrnuje širokou škálu cytogenetických mechanismů, které se liší svým dopadem na genetickou strukturu potomstva, od čisté klonality v případě apomixie až po geneticky rozrůzněné potomstvo vzniklé prostřednictvím automixie (samooplození) – splynutím haploidních ootid, jež vznikly meiotickým procesem, včetně genové rekombinace.

Z hlediska ploidie potomků a pohlaví, které je partenogezí produkováno, existují následující typy partenogeneze (Kirkendall a Normark 2003): a) thelytokie – z neoplozeného vajíčka se vyvíjí pouze samičí potomstvo, obvykle diploidní, b) arrhenotokie – z neoplozeného vajíčka se vyvíjí pouze samčí potomstvo, které je obvykle haploidní, c) pseudogamie (gynogeneze) – ke spuštění embryogeneze je potřeba průchodu samčí pohlavní buňky, ale zygota nese pouze samičí chromozomy (Schlupp 2005).

Na cytologické bázi se pak rozlišuje thelytokní partenogeneze apomiktická (ameiotická), při níž neprobíhá meióza a nedochází k žádné rekombinaci alel – potomci jsou tedy pravými klony své

matky. Druhou, a to velice odlišnou z hlediska mechanismu, průběhu i délky trvání, je partenogeneze automiktická (meiotická), kde první fáze meiózy jsou podobné jako při pohlavním rozmnožování a kde může rovněž v profázi I dojít ke genové rekombinaci (Pearcy *et al.* 2006). Ve výsledku dávají vznik haploidním buňkám, ale samotná diploidní zygota vzniká fúzí mezi dvěma jádry pocházejícími ze stejného primárního oocyty. Pro obnovení diploidie se pak využívají různé mechanismy – terminální fúze, centrální fúze, duplikace gamet a několik alternativních mechanismů jako například náhodná fúze (Schön *et al.* 2009) (obr. 1).



Obr. 1. Nejčastější mechanismy automiktické thelytokní partenogeneze (samooplození), při níž se tvoří diploidní samičí zygota splynutím jader haploidních ootid, vzniklých meiotickým dělením primárního oocyty.

Další alternativou k pohlavnímu procesu je klonální rozmnožování s pomocí polyembryonie, kdy dochází k rozdělení jedné rýhující se vaječné buňky na několik dalších a která je známa u Strepsiptera, Ichneumonomorpha, Aculeata a Proctotrupomorpha (Strand a Grbić 1997).

U druhů s haplodiploidním určením pohlaví se uplatňuje arrhenotokie, tedy plození diploidních samic z oplozených vajíček a haploidních samců z vajíček neoplozených, splynutím jejichž gamet vzniká znovu diploidní potomstvo sdílející 75% společných genů. Tento geneticky asymetrický systém je nejčastěji skloňovaným argumentem pro vznik eusociality u některých z těchto skupin, jmenovitě mnohých blanokřídlých a třásněnek. Největší skupinou, kde s ojedinělými výjimkami nacházíme haplodiploidii, jsou Hymenoptera, rovněž je známa u všech Thysanoptera, Micromalthidae, Chironomidae, některých skupin Margerodidae a Aleyrodoidea a dalších (Normark 2003). U posledních dvou pravděpodobně vznikla pomocí PGE – eliminace jedné sady parentálních chromozomů při vývoji samců (Kol-Maimon *et al.* 2014).

Thelytokní partenogeneze je napříč celým systémem hmyzu dosti rozšířená a byla zaznamenána alespoň u některých zástupců u většiny hmyzích řádů. Ovšem jen u relativně malého počtu hmyzích linií zastává thelytokie klíčový význam v životním cyklu druhu a z velké části se omezuje na akcidentální využití při nepřítomnosti samců, nebo jen na úrovni některých populací. Často se tedy vyskytuje jako fakultativní strategie, např. u Phasmatodea (Scali *et al.* 2003), Ephemeroptera (Tojo *et al.* 2006) a jiných, včetně několika skupin blanokřídlých, jako např. u *Apis mellifera capensis* (Oldroyd *et al.* 2008), některých parazitických vos (Stille a Dävring 1980) a hálkotvorných žlabatek Cynipidae. U některých druhů s haplodiploidním systémem určení pohlaví může parazitická bakterie *Wolbachia* způsobit spuštění duplikace gamet u neoplozených vajíček a jejich vývoj v thelytokní samice (Huigens *et al.* 2004). Stejného efektu dosahuje i symbiotická bakterie *Rickettsia* u parazitoida *Pnigalio soemius* (Giorgini *et al.* 2010).

Skutečného využití potenciálu partenogeneze dochází v mnoha případech v kombinaci s rozmnožováním biparentálním. Právě takové smíšené reprodukční strategie jsou velmi časté a staví partenogenezi jako obligátní součást životního cyklu, který kombinuje výhody pohlavního procesu s procesem partenogenetickým. Jinými slovy, navzdory poměrně široké dostupnosti partenogeneze rozmanitým vývojovým liniím si pohlavní rozmnožování udržuje svou dominanci a velmi úspěšné skupiny jsou takové, které se biparentálního množení nevzdávají zcela, ale kombinují jej s partenogenezí.

Jednou z takových úspěšných skupin s obligátním střídáním sexuálního a partenogenetického procesu jsou Aphidoidea, u nichž zakládající samička (fundatrix) vzniká z oplozeného přezimujícího vajíčka, zatímco po založení háčky se při panování vhodných klimatických podmínek již rozmnožuje čistě partenogeneticky, a to klonálně s pomocí apomixis (Moran 1992). Pohlavně vzniklá generace sloužící pro rozmnožení vzniká zase pouze před zimním obdobím, kdy se podmínky zhoršují.

1.3.1 Smíšené strategie u sociálních blanokřídlých

Na základě využití genetických metod v populační ekologii byly také v rámci společenského hmyzu poměrně nedávno objeveny nové strategie, které v sobě kombinují výhody pohlavního a partenogenetického rozmnožování (Wenseleers a Van Oystaeyen 2011). V těchto smíšených reprodukčních strategiích se uplatňují unikátní procesy, díky kterým se někteří z jejich nositelů stali ekologicky velmi úspěšnými.

První skupina, kde byly smíšené strategie pozorovány, byli společenští blanokřídlí, konkrétně několik druhů mravenců. U evropského druhu mravence *Cataglyphis cursor* královna vytváří další královny pomocí thelytokní partenogeneze, zatímco dělnice vznikají pohlavní cestou – ty v některých případech zůstávají plodné a v kolonii se dále páří se samci (Cagniant 1979). Proces vedoucí k obnovení

diploidie byl popsán později a jedná se v tomto případě o automixis s centrální fúzí (Pearcy *et al.* 2004).

Jihoamerický mravenec *Wasmannia auropunctata* má cyklus odlišný – i zde pohlavní cestou vznikají z vajíček oplozených samci sterilní dělnice, zatímco z neoplozených vajíček se líhnou další královny. V některých případech však pomocí partenogeneze, při které je během oplození vajíčka samčí buňkou samičí genetický materiál vyloučen ze zygoty, vzniká naopak samčí potomstvo identické s otcem. Jde o první případ klonálního rozmnožování samic i samců vedoucí k oddělení samčího a samičího genofondu. Díky této strategii je tento druh velmi rychlý a úspěšný díky možnosti zakládání klonálních populací v nově obsazených areálech. Obnovení diploidie u samic je zde zajištěno pomocí centrální fúze (Fournier *et al.* 2005).

Dalšími druhy mravenců, u nichž se vyskytuje smíšená reprodukční strategie včetně schopnosti samčí klonality je *Vollenhovia emeryi* (Ohkawara *et al.* 2006) a *Paratrechina longicornis* (Pearcy *et al.* 2011). U druhého zmíněného je princip obnovy diploidie sice neznámý, ale je pravděpodobně zajištěn pomocí centrální fúze jako u všech dosud objevených Hymenoptera se smíšenou reprodukční strategií (Wenseleers a Van Oystaeyen 2011). Posledním objeveným druhem se smíšenou reprodukční strategií je *Anoplolepis gracilipes*, u něž se pro obnovení diploidie vedle centrální fúze uplatňuje též apomixis (Gruber 2012, Gruber *et al.* 2013).

1.3.2 Asexual Queen Succession u termitů

Ač se dlouhou dobu myslelo, že je tato smíšená strategie omezena jen na několik druhů blanokřídlých, přišel v roce 2009 markantní objev reprodukčního systému kombinujícího výhody pohlavního a nepohlavního rozmnožování i v rámci tak fylogeneticky vzdálené skupiny, jako je eusociální skupina termitů. Zatímco schopnost thelytokní partenogeneze královen byla u termitů prokázána již dříve (Stansly a Korman 1993, Matsuura a Nishida 2001, Matsuura *et al.* 2004), dlouho se jí nepřisuzoval velký význam v rámci životního cyklu a byla považována pouze za fakultativní či nouzovou strategii. V roce 2009 však bylo u nižšího termita druhu *Reticulitermes speratus* (Rhinotermitidae), žijícího ve dřevě, při sběru hnízd a analýze sociálního uspořádání téměř ve všech koloniích nalezeno namísto jedné primární královny velké množství až několika set (maximální nalezený počet čítal 676 jedinců) neotenických královen nymfálního původu spolu s primárním králem (Matsuura *et al.* 2009). Pouze v jedné z kolonií byla nalezena spolu s neotenickými i královna primární, což ukazovalo na její velmi brzké nahrazení, které bylo v podstatě pravidlem v rámci životního cyklu. Původ těchto náhradnic byl nejasný, jelikož pokud by se jednalo o potomstvo krále, muselo by nutně po čase docházet k inbrední depresi. Genetická analýza nicméně ukázala, že téměř všechny genotypované neotenické královny byly homozygotní na všech pěti lokusech pro alely pocházející od primární královny a zároveň neobsahovaly žádnou alelu primárního krále, což jasně ukazovalo na jejich partenogenetický původ.

Oproti tomu u genotypovaných jedinců sterilních kast i okřídlených pohlavních jedinců byly nalezeny alely obou rodičů. Tento princip se tak ukázal jako strategie analogická smíšeným strategiím u výše zmiňovaných druhů mravenců (Wenseleers a Van Oystaeyen 2011), byť se u *R. speratus* při obnově diploidie uplatňuje automixie s terminální, nikoli centrální fúzí (Matsuura 2010). Jedná se tak o další z mnoha fascinujících příkladů konvergentní evoluce fylogeneticky nesmírně vzdálených eusociálních skupin mravenců a termitů.

Tato originální strategie zahrnující střídání pohlavních a nepohlavních generací, které zajišťuje plný genetický vklad primární královny do dceřiných generací neotenických královen a tedy její maximální podíl na genotypu sterilních kast a okřídlených dospělců i po její smrti, byla nazvána Asexual Queen Succession (AQS) (Matsuura *et al.* 2009). Později byla AQS nalezena i u dvou dalších druhů stejného rodu, tj. severoamerického *R. virginicus* (Vargo *et al.* 2012) a jihoevropského *R. lucifugus* (Luchetti *et al.* 2013). Podle nejnovějších fylogenetických poznatků se však oproti očekávání nejedná o monofyletický vznik v rámci rodu, ale právě naopak jde o trojí nezávislý vznik AQS v rámci tří odlišných fylogenetických větví, které jsou zároveň geograficky jasně oddělené skupiny, asijské, evropské a severoamerické (Dedeine *et al.* 2016).

Princip přepínání mezi produkcí oplozených a partenogenetických vajíček nebyl zpočátku znám. Nedávno však japonští objevitelé AQS u *R. speratus* navrhli vysvětlení. Na základě skenování povrchu vajíček pod elektronovým mikroskopem zjistili, že na vnějším povrchu partenogenetických vajíček, ze kterých se vyvíjejí neotenické královny, je nápadná absence mikropylí, sloužících ke vstupu samčího spermatozoidu, zatímco u vajíček dávajících vznik ostatním kastám se mikropyle vyskytují. Podíl těchto vajíček se navíc liší v průběhu sezóny či věku kolonie. U vajíček bez mikropylí tak nemůže dojít k oplození spermatozoidy a tudíž by se mohlo jednat o případný mechanismus kontroly fertilizace ze strany samotné královny (Yashiro a Matsuura 2014).

V této smíšené reprodukční strategii královny produkují dělníky, vojáky i okřídlené disperzní jedince pomocí klasické pohlavní cesty z oplozených vajíček, zatímco budoucí náhradní královny vznikají nepohlavně pomocí thelytokní partenogeneze (Matsuura *et al.* 2009). Adaptivní význam této strategie tak podle všeho je zkombinovat výhody pohlavního i partenogenetického rozmnožování, a zároveň eliminovat jejich nedostatky. Velkou výhodou AQS je, že z hlediska rozmnožování a šíření alel zakládajícího páru kolonie vytváří v podstatě ideální genetickou strukturu potomstva. U sterilních kast, produkovaných pohlavní cestou – tedy dělníků a vojáků, je zachována genetická variabilita sloužící částečně jakožto obranný evoluční mechanismus vůči patogenům, parazitům a výkyvům prostředí. Mezi okřídlenými imagy, produkovanými taktéž pohlavně při rojení kolonie, je rovněž zajištěna genetická variabilita pro zakládání nových kolonií a nesou ve shodném poměru alely obou rodičů. I po nahrazení primární královny jejími neotenickými následnicemi, produkovanými pomocí thelytokní

partenogeneze, zůstává genetická informace u dalšího potomstva, které dále vzniká pářením neotenických dcer s primárním králem, téměř identická jako u generací produkovaných primární královnou. Tyto neotenické královny sice nedosahují plodnosti královny primární, ale bohatě ji kompenzují svým počtem, což kolonii umožňuje intenzivní populační růst, ať již jde o sterilní kasty nebo okřídlená imaga v době rojení. Navíc je vyšší počet královen z hlediska kolonie mnohem bezpečnější, než spolehnout se na pouze jedinou nenahraditelnou královnou. Zároveň i tyto partenogenetické královny znovu doplňují své řady pomocí partenogeneze a násobí tak svůj počet dalšími generacemi (Matsuura 2010). Tato unikátní kombinace využití výhod pohlavního a nepohlavního procesu se ukázala jako ideální evoluční strategie, která by podle všeho mohla být více rozšířena.

Velmi nedávno se skutečně ukázalo, že AQS není omezena jen na jediný rod v rámci nižších termitů – *Reticulitermes*, ale že se vyskytuje také uvnitř nejmodernější a neúspěšnější větve termitů, Termitidae (kteří jsou nazýváni též vyšší termiti). AQS byla v posledních čtyřech letech pozorována u čtyř humivorních druhů ze dvou podčeledí vyšších termitů, žijících v jihoamerických tropech Francouzské Guyany.

V podčeledi Termitinae jsme ve spolupráci s našimi kolegy z Belgie zkoumali druh *Cavitermes tuberosus* (Fournier *et al.* 2016), u něhož nacházíme v sociálním uspořádání u mladších kolonií sice primární monogamní pár, ale u větších kolonií vždy jednoho primárního krále se stovkami neotenických královen, které jsou oproti primární královně jen lehce fyzogastrikové, ale tuto sníženou plodnost vynahrazují svým velmi vysokým počtem (až 667 neotenických královen). Nahrazení primární královny zde probíhá až ve středně starých koloniích, díky čemuž ještě primární monogamní pár může vyprodukovat dostatek alátů, aby mohlo proběhnout rojení už v tomto stavu. Další rojení již probíhají u sekundárních kolonií a pravděpodobně se cyklicky každoročně opakují. U tohoto druhu se stejně jako u rodu *Reticulitermes* ukázala u všech genotypovaných neotenických královen nepřítomnost alel krále a tedy jejich partenogenetický původ. Zároveň však analýza na sedmnácti lokusech ukázala u neotenických královen pouze homozygotní kombinace alel, což naznačuje odlišný mechanismus obnovení diploidie – duplikaci gamet. Při ní se při vzniku partenogenetického vajíčka haploidní jádra vzniklá meiózou rozdělí a poté znovu splynou, což vyústí v homozygotní kombinace alel v zygotách (Fournier *et al.* 2016). Tedy podobný mechanismus obnovy diploidie jako v případě nákazy bakterií *Wolbachia* u Hymenoptera (Huigens *et al.* 2004).

Dalším případem z této podčeledi je zatím ještě nepopsaný rod termita, který je na základě již provedených chemických i genetických analýz sesterský předchozímu zmíněnému rodu *Cavitermes* (Kyjaková *et al.* in press). U tohoto rodu nacházíme sice menší harémy – primárního krále ve společnosti několika desítek samic (maximum 99 neotenických královen), ale rovněž jde o produkci

pomocí thelytokní partenogeneze. Toto uspořádání však nacházíme pouze v menším procentu kolonií, u většiny stále převažuje monogamní uspořádání. I zde probíhá první rojení ještě za přítomnosti zakládajícího primárního páru. K obnově diploidie dochází opět s pomocí duplikace gamet (Hellemans *et al.* 2016).

AQS však byla mými spolupracovníky nalezena i u jiné podčeledi vyšších termitů, tj. Syntermitinae. Prvním odhaleným druhem je *Embiratermes neotenicus* (Fougeyrollas *et al.* 2015), u něhož byly zmínky o velkém počtu královen s jediným králem popsány už na začátku 20. století (Holmgren 1906). Na základě těchto informací se bližšímu průzkumu začali věnovat moji kolegové v současnosti (Hanus *et al.* 2014) a skutečně byl v sociální struktuře odhalen systém jednoho krále a desítek až stovek neotenických královen (v maximu šlo o 267 královen) téměř u všech nalezených hnízd. Primární kolonie byly u tohoto druhu extrémně vzácné a pravděpodobně k nahrazení primární královny dochází již v prvním roce po založení kolonie ještě v jejím v raném stadiu. K dalšímu intenzivnímu rozšiřování a produkci okřídlených imag dochází tedy až v koloniích sekundárních a všichni disperzní jedinci jsou tedy až potomstvem neotenických královen. Na základě analýzy genotypů neotenických královen se znovu prokázal jejich partenogenetický původ bez otcovských alel. Co však bylo v případě tohoto druhu unikátní, byl princip obnovení diploidie, který ukázal vysokou míru zachování heterozygoty partenogenů na lokusech vycházejících z heterozygotních maternálních genotypů. To svědčí o přítomnosti jiného mechanismu, u termitů zatím neznámého – automixie s centrální fúzí (Fougeyrollas *et al.* 2015).

Druhým druhem v rámci podčeledi Syntermitinae je můj modelový termit *Silvestritermes minutus*, jehož harémové sociální uspořádání bylo odhaleno náhodou při sběru kolonií v roce 2013 ve Francouzské Guyaně. Teprve zpětně bylo zjištěno, že zmínky o tomto netypickém sociálním uspořádání zmiňoval již Emerson (1925, 1933). Právě tento nález byl motivem pro vypracování této diplomové práce, která si klade za cíl zdokumentovat co nejpodrobněji i u tohoto druhu princip smíšené strategie, jeho genetické pozadí a ekologický dopad na životní cyklus. Přestože totiž v tuto chvíli máme objevenou tuto jedinečnou strategii kombinace pohlavního a nepohlavního rozmnožování u tří druhů nižších a čtyř druhů vyšších termitů, její skutečný význam pro životní cyklus je stále ještě z důvodu absence kontinuálního pozorování kolonií v přirozených podmínkách z velké většiny neznámý. Jinými slovy, naše znalosti o genetice kolonií těchto druhů převyšují znalosti o jejich životě. Hlavním obecným cílem mojí práce je proto studovat důsledky jedinečné smíšené reprodukční strategie pro life history a celkovou bionomii druhu *Silvestritermes minutus*.

1.4 Poměr pohlaví disperzních jedinců u termitů

Poměr pohlaví okřídlených disperzních jedinců, kteří mateřskou kolonii v určité části roku opouštějí kvůli zakládání nových kolonií, byl sledován u několika druhů, přičemž se ukázalo, že u většiny je na populační úrovni vyrovnaný (Thorne 1983, Parmentier a Roisin 2003). Produkce alátů v individuálních koloniích ale může tento poměr měnit na základě sociální struktury a vychylovat je ve prospěch jednoho nebo druhého pohlaví (Vargo a Husseneder 2010). Pro investici do potomstva se totiž u většiny živých organismů na populační úrovni uplatňuje hypotéza R. A. Fishera, zvaná „Teorie vyrovnané investice“, která předpokládá jako nejvýhodnější a evolučně nejstabilnější strategii pro plození potomstva a pro rozložení genů v populaci rovnocennou investici do obou pohlaví, ať z hlediska biomasy nebo množství (Fisher 1930). Na úrovni populační by tedy měl být skutečně výsledný průměrný poměr pohlaví 1:1 (jako poměr se tedy uvádí střední hodnota 0,5), protože jakýkoli vychýlený poměr by vedl ke snížení fitness.

U eusociálního hmyzu se na úrovni kolonií zároveň uplatňuje tzv. „Teorie příbuzenského výběru“ (Kin-selection theory) (Hamilton 1964), podle níž je z hlediska šíření genů v populaci výhodnější vyšší investice do potomstva, které má vyšší koeficient příbuznosti buď s královnou nebo se sterilními pečovateli, kteří o budoucí disperzní jedince pečují. Funkčnost tohoto systému byla ověřována u společenských blanokřídlych, u kterých je haplodiploidní systém určení pohlaví a tedy vzájemný koeficient příbuznosti vyšší mezi samicemi (více než 75% společných genů), než mezi samicemi (dělnicemi) a samci (25%). Dělnicím se tedy vyplatí investovat více do dalších samic než do případných samců. U sociálního hmyzu, který je diploidní, což je právě případ termitů, by však tato teorie platit neměla, nebo jen v omezené formě, jelikož takovou příbuznost postrádají. Jsou ovšem známy případy, kdy je vychýlení poměru pohlaví dosaženo adaptivně. U termitích druhů s AQS by dle hypotézy (Kobayashi *et al.* 2013) mohl případný sexuálně asymetrický inbreeding měnit a vychylovat poměry pohlaví, zatímco u druhů bez této strategie by měl být poměr pohlaví blízký středové hodnotě 0,5. Sexuálně asymetrický inbreeding se předpokládá při splnění tří podmínek: a) kolonie je založena monogamním párem, b) v určitém stadiu vývoje kolonie dojde k nahrazení zakládajícího páru jeho potomstvem, která vede u nově plodící kohorty k inbreedingu, c) mezi pohlavími je výrazný rozdíl v délce života, přičemž jeden z rodičů přežije druhého a pak se páří s potomstvem.

Zatímco u termitů bez AQS strategie nebyl pozorován výrazný rozdíl v délce dožití pro jednotlivá pohlaví zakládajícího páru (Keller 1998, Thorne *et al.* 2002), u druhů, které tuto strategii využívají má primární král signifikantně delší dobu dožití, než primární královna (Kawatsu a Matsuura 2013). Po nahrazení primární královny se tedy primární král dále rozmnožuje s neotenickými královnami, které jsou v případě AQS druhů produkovány pomocí thelytokní partenogeneze a mají tak téměř totožný genotyp jako by v kolonii byla nadále přítomna primární královna. Poměr pohlaví by tedy v této

situaci ještě neměl být pozměněn. Pokud však v pozdních stádiích kolonie dojde i k nahrazení primárního krále králem sekundárním, který je ale produkován pohlavní cestou, nastává inbrední situace, v níž se neotenické královny (potažmo geneticky primární královna v její mnohačetné formě) dále fakticky páří se svým synem (F1 generace). Podíl proporce genů u F2 generace sexuálně produkovaných alátů je v tomto případě pro 0,75 královniných alel, ale pouze 0,25 alel krále, což činí královnin přínos trojnásobným (Kobayashi *et al.* 2013). Při dalším, terciárním replacementu krále, by byl tento poměr ještě markantnější 0,875 královniných alel vůči 0,125 králových. U AQS druhů by tak měla být optimální strategií ještě vyšší investice do produkce samičích alátů.

Při vypočítávání poměru pohlaví pro různé druhy se ukázala vyšší investice do samičích alátů u druhů se strategií AQS, u kterých se navíc prokazatelně v koloniích vyskytují i neoteničtí králové. V případě *Reticulitermes virginicus* se neotenický král vyskytuje cca v 60% kolonií a k nahrazení primárního krále dochází v koloniích poměrně brzy, zatímco u druhého AQS druhu *Reticulitermes speratus* je nahrazení pozdější a vyskytuje se cca u 7% kolonií. V případě *R. virginicus* se tedy očekávalo mnohem znatelnější vychýlení ve prospěch okřídlených samic. Výsledná proporční investice pro jednotlivá pohlaví byla signifikantně vychýlena ve prospěch samic u *Reticulitermes virginicus* (0,642), zatímco u *Reticulitermes speratus* byla tato asymetrie nižší (0,587), byť stále signifikantní. Pro ověření hypotézy byly porovnány i příbuzné druhy, u nichž strategie AQS nebyla prokázána, tj. *R. okinawanus* (0,460), *R. yaeyamanus* (0,434), *R. flavipes* (0,442). Neukázalo se signifikantní vychýlení ve prospěch samic ani výrazné vychýlení od středové hodnoty (Kobayashi *et al.* 2013). AQS tedy může vést ke příbuzenskému výběru při produkci potomstva i v případě diploidního hmyzu.

Asymetrie v poměru pohlaví by tedy mohla sloužit i k vytipování dalších kandidátních AQS druhů na základě poměru pohlaví alátů. U druhu *R. lucifugus* se totiž ukázala signifikantně vyšší investice do samičích alátů (Matsuura 2010) ještě dříve, než bylo prokázáno, že se skutečně jedná o třetí AQS druh v rámci tohoto rodu (Luchetti *et al.* 2013) v rámci tohoto rodu. Oproti tomu u *R. urbis*, který tuto strategii nemá, byla investice rovnocenná. Provedené analýzy u jednoho druhu vyššího termita se strategií AQS – *Cavitermes tuberosus*, ukázaly lehké, ale signifikantní vychýlení ve prospěch samic v investičním poměru pohlaví (Hellemans 2015). I my se tedy pokusili ověřit, zda se nám na základě této hypotézy podaří prokázat vyšší investici do samičích alátů v rámci našeho kandidátního AQS druhu *Silvestritermes minutus*.

2. Cíle práce

Modelovým druhem, na nějž je zaměřena tato diplomová práce, je jihoamerický druh *Silvestritermes minutus* (Emerson 1925, Constantino 2016)(Termitidae: Syntermitinae). Jelikož u něj bylo pozorováno kromě klasického monogamního způsobu života i množství kolonií vedených primárním králem spolu se skupinou neotenických královen, jedná se o kandidátní a v pořadí teprve čtvrtý druh v rámci vyšších termitů, který možná využívá smíšenou strategii kombinace pohlavního rozmnožování a fakultativní thelytokní partenogeneze královen (AQS). Bylo proto důležité začít se jeho studiu hlouběji věnovat a odhalit mechanismus vzniku neotenických královen na straně jedné a dopad zmíněné neobvyklé reprodukční strategie na biologii a životní cyklus *S. minutus* na straně druhé. Hlavní náplní této práce je tedy především komplexní studium přírodních kolonií tohoto druhu se zvláštním zřetelem na jednotlivé dílčí cíle:

- **studium sociální struktury a životního cyklu kolonií v kontextu sezónních a ekologických faktorů,**
- **ověření hypotézy o vlivu příbuzenského výběru na poměr pohlaví a investici do okřídlených pohlavních jedinců u druhů s AQS,**
- **analýza pohlavního dimorfismu u okřídlených pohlavních jedinců,**
- **studium ontogenetického původu jednotlivých typů královen,**
- **interpretace genetické struktury kolonií s ohledem na vznik jednotlivých typů pohlavních a sterilních jedinců,**
- **srovnání reprodukční strategie *Silvestritermes minutus* s ostatními druhy vyšších termitů a diskuse jejího významu pro life history druhu.**

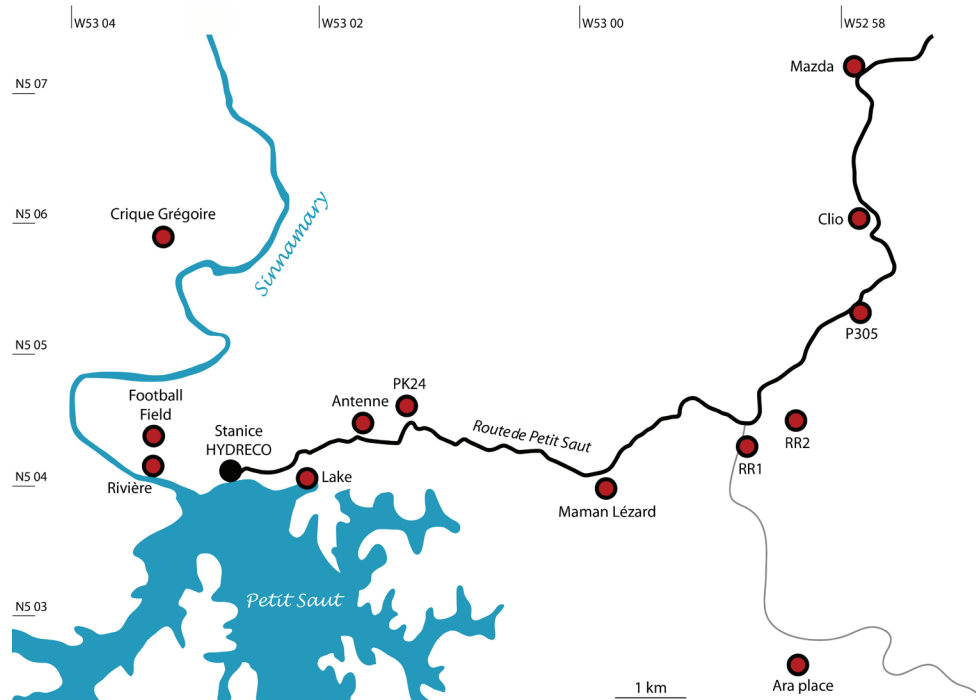
3. Metodika

3.1 Terénní práce

Kvůli charakteru této práce a snaze co nejlépe dokumentovat bionomii druhu přímo v přirozeném místě výskytu tohoto termita bylo velké množství dat sbíráno přímo v terénním prostředí. Terénní práce samotná tak v sobě zahrnovala širokou paletu metod a přístupů popsanych v samostatných kapitolách níže.

3.1.1 Studovaná lokalita v prostoru a čase

Sběr materiálu na tuto diplomovou práci probíhal v okolí vědecké stanice HYDRECO zbudované u přehradní nádrže Petit Saut ve Francouzské Guyaně (N5 02.662 – N5 07.202 a W53 03.295 – W52 57.878). Okolí stanice pokrývá jak primární, tak sekundární tropický deštný prales, v němž náš sběr probíhal na třinácti lokalitách (obr. 2), situovaných podél hlavní přístupové silnice ke stanici (Route de Petit Saut), v okolí přehrady Petit Saut a řeky Sinnamary, lišících se mezi sebou v některých ekologických aspektech biotopu, jako je přítomnost vodních toků, mokřad nebo jezírek, terénních nerovností, elevačních stupňů, stáří stromové vegetace a hustota vegetačního pokryvu a ve výsledku i vegetační složení. V našem případě byla důležitá přítomnost palem rodu *Astrocaryum*, zejména mladých exemplářů, které jsou nejčastějším mikrohabitatem, na němž *S. minutus* zakládá své kolonie.



Obr. 2. Mapa zkoumané oblasti znázorňující 13 studovaných lokalit v okolí silnice *Route de Petit Saut*, řeky *Sinnamary* a přehrady *Petit Saut*.

Sběr probíhal během čtyř výprav v letech 2014–2016 s cílem pokrýt dvě období životního cyklu kolonií – období **reprodukční**, tj. sezóna produkce nymf a okřídlených dospělců a jejich disperzní let (březen až srpen) a období **maturační**, tj. zbytek roku. Pro pokrytí každého z těchto období sloužily dvě výpravy v rámci dvou let, abychom dokázali co nejkompletněji popsat celkovou dynamiku procesů v koloniích. V **reprodukčním** období jsme podnikli dvě výpravy (první na přelomu března a dubna a druhou na přelomu května a června). Tato data sloužila především pro určení poměru pohlaví v rojících se koloniích, analýze sociálního uspořádání a studiu celkové bionomie u kolonií procházejících rojením. Rovněž bylo v tomto období prováděno několik sérií dlouhodobých pokusů. Během **maturačního** období jsme rovněž podnikli dvě výpravy (první na přelomu září a října, druhá na přelomu října a listopadu), během nichž jsme sledovali reprodukční strukturu hnízd mimo období rojení, prováděli dlouhodobé vývojové pokusy a rovněž pokusy zaměřené na ontogenezi neotenických královen (viz kapitola 3.4.2).

3.1.2 Sledované parametry kolonií, sběr, příprava a konzervace materiálu

U vybraných hnízd byly přímo v terénu zaznamenány GPS souřadnice s pomocí přístroje GARMIN eTrex Vista HCx, vyfotografována celá kolonie v přírodním prostředí a trojrozměrně změřena pásmovým metrem. V hnízdech byla dále pro zajímavost změřena hodnota pH a teplota pomocí měřáku CONRAD Q1100 a vlhkost měřičem vlhkosti BASETECH BT300, kontrolně pak byla měřena hodnota vlhkosti pralesní půdy ve vzdálenosti 10 cm od kolonie. Hnízdo (nebo v některých případech jeho fragment) bylo poté šetrně odděleno od podkladu (pilkou, ostřím mačety, kapesním nožem), zabaleno do uzavíratelného plastového pytle, zváženo digitální vahou KONIG HC-LS10 a odneseno k pozdějšímu zpracování do laboratoře na terénní stanici. Jelikož se hnízda tohoto druhu často vyskytují přímo na palmových výhoncích, byly v rámci možností dle dostupných klíčů určovány i ty (Funk *et al.* 2007, Kahn 2008). Hnízda byla později rozebrána přímo v laboratoři, a to nejpozději 24 hodin od jejich sběru. Při rozebrání hnízd v laboratorních podmínkách byly sledovány další vlastnosti hnízda. Jedním z hlavních parametrů byla samotná struktura stavby a její tvarování, dále stavební struktura uvnitř hnízda založená na záznamu struktury chodeb, přítomnosti zpevňujících materiálů hnízda, jako jsou rostlinné kořeny prorůstající hnízdem, případně i využití různých přírodních překážek typu kusů dřeva nebo tvrdých plodů pro fortifikaci nejdůležitějších částí hnízda. Z některých kolonií byl rovněž odebrán vzorek rostlinných materiálů (kořenů, listů, plodů) pro pozdější analýzy.

Důležitým sledovaným stavebním prvkem byla královská komora a její umístění v rámci termitiště. Samotná struktura královské komory pak byla fotograficky dokumentována, zaznamenán její tvar a měřen její průměr v horizontálním směru. U vícepatrových královských komůrek byl zaznamenáván jejich počet a případné přepažení tenkými stěnami.

V rámci každé kolonie byla samozřejmě zaznamenána její sociální struktura. Především šlo o odhad celkového množství jedinců v hnízdě, rovněž jejich zastoupení v rámci jednotlivých kast a případné vychýlení od normálu (např. menší počet vojáků než je v koloniích obvyklé), množství vajíček a jejich umístění, přítomnost mladých larev, nymf včetně jejich stadií a případně i okřídlených dospělců (alátů). U pohlavních jedinců byla sledována přítomnost primárního páru a úroveň fyzogastrie primární královny, v případě přechodných a sekundárních kolonií pak počet neotenických královen, úroveň jejich maturace (pigmentace a fyzogastrie) s cílem odhadnout jejich plodnost a tedy stáří a zároveň přítomnost pouze jedné nebo více generací neotenických královen, prozrazující případnou vícegenerační pokročilou či pozdní sekundární kolonii.

Pečlivě byly vždy zaznamenány a vzorkovány všechny nymfy, případně aláty v kolonii přítomní, ať už v období reprodukčním pro stanovení počtu a poměru pohlaví (budoucích) okřídlených dospělců (viz kapitola 3.3), tak v období maturačním pro zachycení přítomnosti samičích nymf, určených k vývoji v neotenické královny s cílem nahradit primární královnu nebo nahradit či doplnit první generaci neotenických královen. Sběrem nymf v maturačním období jsme dále sledovali případný výskyt samčích jedinců, kteří by eventuálně mohli nahradit či doplnit přítomného primárního krále. Samičí nymfy z maturačního období byly dále použity pro studium ontogenetického původu neotenických královen (viz kapitola 3.4). Nymfy z reprodukčního období spolu s aláty naopak posloužily k vypracování morfometrické analýzy vývoje nymf a neotenických královen (viz kapitola 3.4.1).

Vybraní jedinci jednotlivých kast byli poté buď použiti k etologickým pokusům přímo na místě, případně uschováni pro pozdější použití v konzervantech – 96% EtOH v potravinářské kvalitě pro genetické analýzy, 80% EtOH pro morfologické analýzy, případně FAA pro lepší zachování barev vzorků a uchování měkkých tkání. Pohlaví nymf, alátů a pohlavních jedinců bylo určováno buď přímo na místě pomocí binokulární lupy, nebo v případě většího počtu byli všichni jedinci z kolonie zakonzervováni a pohlaví určeno po návratu do Prahy (viz kapitola 3.2.1).

3.2 Rekonstrukce životního cyklu kolonie

Na základě 164 podrobně zdokumentovaných kolonií druhu *Silvestritermes minutus*, jsme se pokusili co nejlépe rekonstruovat jeho životní cyklus, zejména ve vztahu k vývoji reprodukční struktury kolonií v čase, jmenovitě zakládání kolonií primárním párem, vývoj fyzogastrie primární královny, načasování nahrazení primární královny neotenickými královnami, dynamiku v produkci těchto neotenických královen a také následujících generací neotenických královen. Druhým hlavním cílem pak bylo studovat časovou dynamiku produkce samčích a samičích nymf určených k vývoji v okřídlené dospělé a načasování jejich vývoje v imaga, připravená ke svatebnímu letu. Zjištěná data

a sebrané vzorky pak sloužily pro další dílčí cíle této práce, tedy studii genetické struktury kolonií, ontogenetického původu neotenických královen, počtu a poměru pohlaví okřídlených dospělců, atd. Rekonstrukci životního cyklu zakládáme na souběžné analýze dvou charakteristik, tedy a) sociálním složení kolonií v každé ze dvou sledovaných sezón, tj. přítomnost různých typů pohlavních jedinců, larev, vajíček, nymf v různém vývojovém stadiu a různých pohlaví, okřídlených dospělců, přítomnost indicií již prodělaného rojení, zejména výletových komínů na povrchu kolonií a dalších pozorování, a b) objemu každé ze studovaných kolonií ve vztahu k dané sezóně. Objem byl spočítán na základě matematického vzorce pro výpočet objemu nepravidelných sféroidů, kde se tři délkové rozměry vynásobí konstantou 0,523 (vzorec 1).

$$V_n = a \times b \times c \times 0,523$$

Vzorec 1. V_n – objem hnízda, a – výška hnízda, b – šířka hnízda, c – délka hnízda

Jednotlivé kategorie sociálního uspořádání jsme potom seřadili dle průměrné velikosti kolonií a kombinací těchto parametrů jsme sestavili vývoj sociální struktury kolonií v čase a navrhli životní cyklus kolonií.

3.3 Zjišťování poměru pohlaví disperzních jedinců v koloniích

Poměr pohlaví u nymf a alátů byl zjišťován u kolonií během dvou hlavních období. Prvním je období **maturační** (září až prosinec), v němž se kolonie nerojí a investuje především do zvětšování počtu sterilních kast, dozrávání reprodukčních jedinců a zvětšování objemu hnízda, a kdy je v koloniích přítomno jen malé množství samičích (a vzácně i samčích) nymf určených pro vývoj v neotenické královny (dále jen filopatrických). Druhým obdobím je období **reprodukční** (březen až srpen), kdy v koloniích dochází k masové produkci nymf, které během této etapy prochází pěti nymfálními stadii a nakonec se vyvíjejí v okřídlená imaga. Ta se připravují k disperznímu letu v pozdní hlavní dešťové sezóně, tj. v červnu – červenci. Kolonie byly v terénu sebrány celé a rozebrány přímo na terénní stanici. Nymfy a aláti byli dle možností vybráni z kolonií kompletně a dávají tak ucelený údaj nejen o poměru pohlaví, ale také o celkové produkci disperzních jedinců každou kolonií. Tito byli dále konzervováni v mikrozkušnicích v 96% EtOH, nebo v případě většího počtu ve velkých falkonkách v 80% EtOH. V laboratoři byli po návratu rozděleni dle stadií, velikosti a tvaru křídelních základů (viz. obr. S4) a podle pohlaví (obr. 3).

V maturačním období byly sebrány a rozříděny nymfy z 45 kolonií, u kterých jsme sledovali především četnost a trendy ve vývoji nymf pro obě pohlaví. Pro období reprodukční bylo sebráno a

roztříděno 26 kolonií, u kterých jsme sledovali poměr pohlaví u různě velkých kolonií a posléze u vybraných kolonií i celkovou investici do disperzních jedinců.

Na základě našich pozorování četnosti filopatrických nymf (jakých jsme v koloniích nacházeli obvykle mezi 2 – 34 jedinci, maximálně však 106), které jsou v koloniích přítomny celoročně a nevyvíjejí se v disperzní jedince, jsme se rozhodli zařadit do statistického vyhodnocení pouze kolonie, jejichž celkový počet nymf a alátů přesahoval 500 jedinců a minimalizuje tak možnost ovlivnění souboru zařazením samičích nymf určených k vývoji v neoteniky.

Z reprodukčního období bylo do statistického vyhodnocení poměru pohlaví zahrnuto 14 kompletních, dostatečně početných kolonií obsahujících čtvrtá a pátá nymfální stadia a okřídlené aláty. Počet disperzních jedinců byl u jednotlivých kolonií různý a soubor tak poskytuje průřez různě úspěšnými koloniemi. Celkem bylo pro tyto účely použito 24403 disperzních jedinců (nymf a alátů).

Statisticky jsme vyhodnocovali dva hlavní faktory:

- 1) Numerický poměr pohlaví disperzních jedinců byl počítán jakožto poměr samiček ku všem budoucím rojícím se jedincům (viz vzorec 2).

$$SRn = n_{\text{♀}} / (n_{\text{♀}} + n_{\text{♂}})$$

Vzorec 2. SRn – numerický poměr pohlaví, $n_{\text{♀}}$ – počet samic, $n_{\text{♂}}$ – počet samců

V tomto případě byla sečtena všechna stadia nymf samičího i samčího pohlaví dohromady, jelikož jsme odpozorovali, že rychlost vývoje samců a samic je v jednotlivých koloniích rozdílná a v různých stadiích se tak poměr pohlaví liší.

- 2) Investice do biomasy disperzních jedinců. Abychom zjistili skutečnou investici kolonie do biomasy budoucích rojících se jedinců, vybrali jsme soubory alátů z pěti kolonií ($n=20$ pro obě pohlaví). Jejich tělní tkáň jsme vysušením zbavili zbytků vody. Používali jsme pouze celá imaga se zachovanými křídly a kompletními vnějšími tělními strukturami. Ty jsme dva dny před vážením uložili do absolutního EtOH s obsahem FeSO_4 pro co nejdokonalější vysušení tkání. Poté byl líh odtážen plastovou pipetou a nahrazen destilovaným acetonem (CH_3COCH_3) na nejméně 16 hodin. Z těchto vzorků byl ve vakuovém centrifugačním koncentrátoru CentriVapVacuum Concentrator (Labconco) odpařován aceton ze všech tkání po dobu 2 hodin a poté byly uzavřeny ve vzduchotěsných eppendorfkách. Imaga byla ihned poté vážena na analytických vahách Sartorius GmbH Göttingen typ 4501 MP6, jejichž efektivní citlivost je až 10^{-6} gramu. Kontrolně byla ještě vážena hmotnost uzavřené eppendorfky se vzorkem a poté bez vzorku, aby se předešlo možnosti ovlivnění pokusu opětovnou rehydratací vzorku.

Výsledná dehydratovaná hmotnost obou pohlaví byla napříč pěti měřenými koloniemi velmi stabilní (průměr hmotnosti samice : samci = 1,148, SD = 0,0075; 95% konfidenční interval = 1,141–1,154). Proto byla tato hodnota použita jako koeficient investice do samic při přepočtení numerického poměru pohlaví na investiční pro všech 14 zkoumaných kolonií, včetně těch, které ještě neobsahovaly plně vyvinutá imaga, a nebylo tedy možno stanovit hmotnostní poměr empiricky. Investiční poměr pohlaví jsme poté vypočetli dle vzorce 3.

$$SRI = n_{\text{♀}}k / (n_{\text{♂}} + n_{\text{♀}}k)$$

Vzorec 3. SRI – investiční poměr pohlaví, $n_{\text{♀}}$ – počet samic, $n_{\text{♂}}$ – počet samců, k – koeficient hmotnostního poměru samice : samci

Průměrné hodnoty numerického a investičního poměru pohlaví pro 14 kolonií byly s pomocí dvoustranného t-testu porovnány s hodnotou 0,5 očekávanou při vyrovnaném poměru pohlaví, respektive vyrovnané investici do pohlaví disperzních jedinců.

Díky tomu, že naše vzorky sestávaly z kompletních kolonií – tedy všech budoucích disperzních jedinců vyprodukovaných danou kolonií v daném roce, mohli jsme provést výpočet numerického a investičního poměru pohlaví na úrovni populace a vzít tak v úvahu možné rozdíly v poměru pohlaví vázané na celkovou produktivitu kolonie. Průměrné hodnoty jsme vypočetli jako jednoduchou proporcii kumulativního počtu samic (či jejich kumulativní hmotnosti). Pro výpočet směrodatné odchylky (SD) jsme použili vzorec 4, jak jej uvádějí Bourke a Franks (1995). Hodnota x je v tomto případě numerický (nebo investiční) poměr pohlaví, f je poměr počtu disperzních jedinců (nebo jejich celkové hmotnosti) konkrétní kolonie ku průměru všech kolonií. Hodnota $\sum f$ je tedy rovna počtu uvažovaných kolonií.

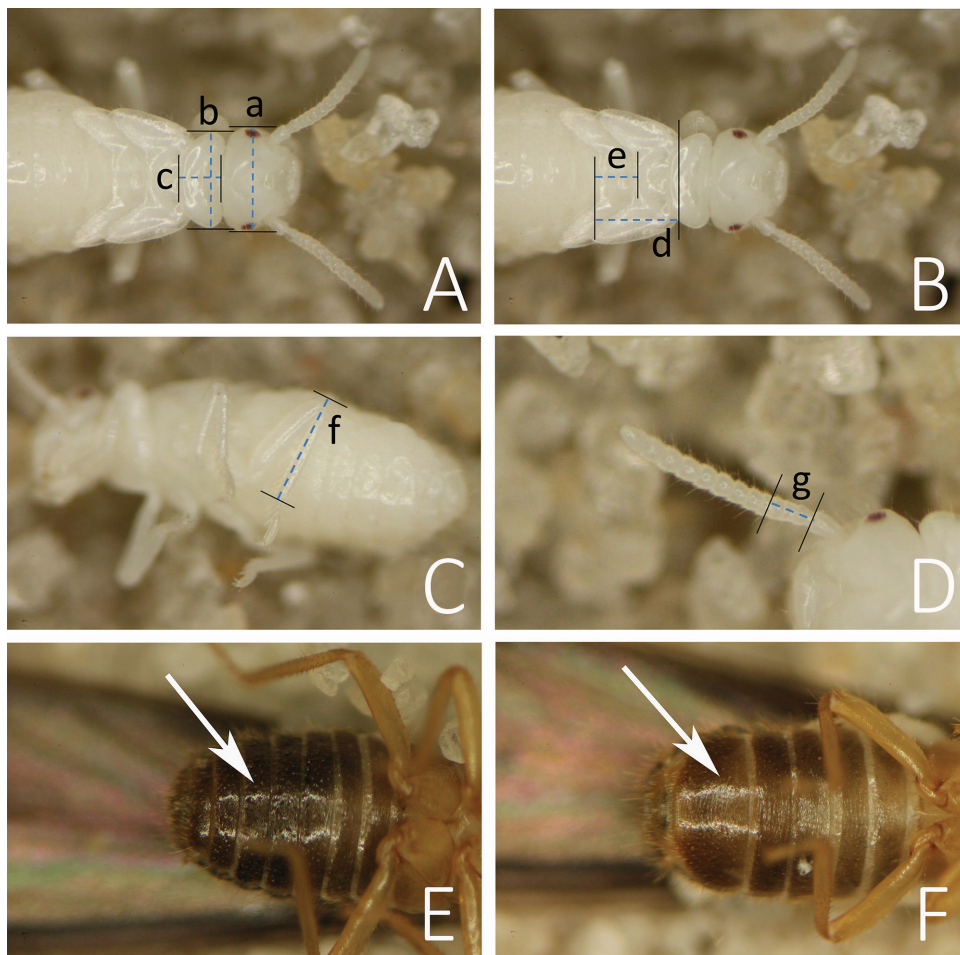
$$SD = \sqrt{[(\sum fx^2) / (\sum f - 1) - (\sum fx)^2 / (\sum f) (\sum f - 1)]}$$

Vzorec 4. SD – směrodatná odchylka, x – poměr pohlaví (numerický nebo investiční), f – poměr počtu disperzních jedinců kolonie ke koloniálnímu průměru celé populace

3.4 Zjišťování ontogenetického původu královen

3.4.1 Morfometrická analýza nymfálních stadií a imag

Morfometrické analýzy byly prováděny na vzorcích získaných z kolonií přímo v terénu. Jelikož v případě neotenických královen u tohoto druhu jde zcela jasně o nymfoidy se zkrácenými křídly, (Noirot 1985), byly vybrány kolonie, které hostily co nejúplnější vývojovou řadu, obsahující soubor na sebe navazujících stadií imaginální vývojové linie obou pohlaví, tj. pěti stadií nymf, okřídlených dospělců a neotenických královen. Jelikož žádná ze studovaných kolonií neobsahovala všechna kýžená vývojová stadia, použili jsme k pokrytí ontogenetické řady jedince ze tří kolonií. Vybírání byli pouze takoví jedinci, kteří měli nepoškozené tělní struktury uvažované v analýze. Vzorky pro tuto analýzu byly konzervovány ve všech případech v 96% EtOH.



Obr. 3. Morfometrická analýza a určení pohlaví. **A – D.** Schéma sedmi morfologických parametrů měřených pro morfometrickou analýzu. **E.** Ventrální strana abdomenu okřídleného samečka. Šipka ukazuje na rovný sedmý sternit. **F.** Ventrální strana abdomenu okřídlené samičky. Šipka ukazuje na klenutý sedmý sternit. **a,** šířka hlavy; **b,** šířka pronota; **c,** délka pronota; **d,** délka pravých předních křídelních základů nebo křídel od základů až po konec; **e,** délka křídel či jejich základů od koncového záhybu mesonota (u všech nymfálních stadií)/od odlomové plochy křídla (u alátů) po konec; **f,** délka tibie levé zadní nohy; **g,** délka růstové zóny pravého tykadla od devátého segmentu od konce po konec pedicelu.

Před samotným měřením byly objekty usušeny na filtračním papíře a poté položeny na Petriho misku naplněnou křemičitým pískem, který umožňuje polohování vzorku tak, aby měřené struktury byly vždy v rovině kolmé k ose objektivu. Každý vzorek pak byl několikrát vyfotografován s pomocí stereomikroskopu Olympus SZH10 Research Stereo na jednotné zvětšení pro všechny nymfy a neotenické samice (4×) a pro aláty (1,5×). Před každou sérií měření jsem vyfotografoval i milimetrové kalibrační sklíčko, které jsem poté použil k co nejpřesnějšímu stanovení měřítka. Fotografování probíhalo za použití fotoaparátu Canon EOS D500. Získané fotografie byly analyzovány v programu ImageJ 1.48v. Měřené parametry byly určeny na základě předchozích morfometrických analýz termitů (Hanus *et. al.* 2006, Moura *et al.* 2011): **a**) šířka hlavy v nejširším místě (včetně očí), **b**) šířka pronota, **c**) délka pronota, **d**) délka předních křídelních základů nebo křídel na pravé straně, měřená od základů až po konec, **e**) délka od koncového záhybu mesonota/od odlomové plochy po konec křídla, **f**) délka tibie levé zadní nohy, **g**) délka růstové zóny pravého tykadla – počítáno od devátého segmentu od konce u nepoškozené struktury a na straně druhé od konce pedicelu (viz obr. 3). Vyhodnocování probíhalo v programu STATISTICA verze 8.0.360.0 za využití analýzy hlavních komponent (PCA) pro zobrazení jednotlivých stadií imaginální linie ve vzájemném vztahu a jeho následná interpretace.

3.4.2 Dlouhodobé vývojové pokusy

Dlouhodobé pokusy probíhaly s fragmenty kolonií obsahujícími pouze filopatrické nymfy a měly za úkol experimentálně zjistit, z jakého nymfálního stadia vznikají neotenické královny a jakým způsobem probíhá maturace neotenických královen v rámci ontogeneze. Tyto pokusy probíhaly několika způsoby:

a) do Petriho misky o průměru 5,5 cm s vlhkým filtračním papírem jako podkladem byl umístěn předem určený počet samičích nymf čtvrtého stadia odebraných přímo z kolonie čerstvě sebrané v terénu, spolu s 20ti plně vyvinutými dělníky. Tyto misky byly zakryty víčkem a ponechány v přírodních klimatických podmínkách na stinném stanovišti na terénní stanici. Papír byl periodicky každých cca 6 hodin vlhčen a nymfy kontrolovány.

b) do vybraného fragmentu prázdného hnízda byl vložen předem určený počet dělníků a vojáků dle poměru kast v kolonii 20:5 spolu s určitým počtem samičích nymf čtvrtého stadia ze stejné kolonie. Experiment probíhal za přítomnosti/nepřítomnosti primárního krále nebo přítomnosti/nepřítomnosti fyzogastrických neotenických královen. Takto byly fragmenty ponechány po 14 dnů, během nichž byly jednou denně vlhčeny. Poté byly rozebrány a vyhodnocena data o vývoji.

c) přímo v terénu byla z hnízda odebrána primární královna a v kolonii byl ponechán pouze primární král. Takováto kolonie byla znovu vrácena do přírodního prostředí a kontrola proběhla při další výpravě.

3.4.3 Indikace fertility reprodukčních kast

Plodnost reprodukčních kast byla zjišťována pitvami vybraných jedinců. V případě královen byla nejdříve oddělena hlava od těla pomocí laboratorních mikronůžek, poté byla vyjmuta celá trávicí soustava vytažením za konec střeva pomocí pinzet z posledního sternitu. Abdomen byl ze stran rozstřížen, aby mohlo dojít k vyjmutí párových ovarii vcelku. Úpon ovarii byl utržen dvěma pinzetami, případně odstřížen mikronůžkami a poté byla vytažena ven. Poté jsme je vyfotografovali a případně spočítali zralé oocyty. Rozhodující byla především velikost ovarii vůči tělu a předpokládanému stáří královny, též jejich celkový vzhled a další indikátory fertility jako např. počet zralých oocytů.

V případě králů jsem odstříhl hlavu a následně rozstříhl abdomen od šestého sternitu směrem k hlavě, aby nedošlo k poškození pohlavních orgánů. Mezi druhým a třetím sternitem jsem na ventrální straně rozstříhl intersegmentální membránu. Poté byla celá oddělená ventrální strana překlopena a díky vzniklému prostoru vytažena trávicí soustava. Testes spolu se semennými vácíky připojené na devátém sternitu byly odděleny a vyhodnocován byl jejich celkový vzhled a velikost vůči tělu krále. Pro lepší rozlišitelnost genitálního aparátu byla použita technika barvení jader buněk pomocí toluidinové modři (Leeson a Leeson 1970).

3.5 Genetická analýza reprodukční struktury kolonií

Naším úkolem bylo v této fázi především vyhledání a výběr kolonií vhodné sociální struktury přímo v terénu, včetně rozdělení podle kast, stadia vývoje a dle pohlaví, a zajištění dostatečného množství sterilních jedinců (tj. dělníků a vojáků). Veškeré vzorky pro genetickou analýzu byly konzervovány v 96% EtOH, aby byl co nejméně poškozen genom. Vzorkování navíc ze stejných důvodů probíhalo pouze u živých termitů. Jedinci byli rozděleni podle kast do samostatných eppendorfek. V případě neotenických královen jsem rovněž rozděloval fyzogastrické samice a nefyzogastrické, které mohly reprezentovat druhou generaci. Nymfy a aláti byli navíc rozděleni dle stadia a pohlaví, jehož určování probíhalo pod binokulární lupou ve sterilním prostředí za použití rukavic a sterilizovaných pinzet. V případě dělníků i vojáků bylo archivováno 50 jedinců od obou kast, kdyby došlo k poškození materiálu. Veškerý tento materiál byl až do chvíle finálního zpracování uskladněn v chladničce při +6°C.

K samotnému genotypování a rovněž vývoji mikrosatelitových markerů došlo až na našem partnerském pracovišti Université Paris-Est Créteil. Pro genetickou studii rozmnožovacího systému a původu jednotlivých kast bylo použito 14 kolonií. Abychom pokryli veškeré sociální kategorie, bylo vybráno 10 kolonií obsahujících primárního krále a harém neotenických královen, dvě kolonie

obsahující primárního krále a královnu (oba případy byly kolonie při replacementu) a dvě kolonie procházející rojením, které byly do studie doplněny o rok později.

Do analýzy byli z kolonie vždy zahrnuti primární pohlavní jedinci, neotenické královny (v počtech od 2 do 20), 15 dělníků a 15 vojáků (jedinou výjimkou byla kolonie G14-205, ze které byl kvůli možnosti kontaminace s jiným vzorkem použit vzorek 29 dělníků místo vojáků) z rojících se kolonií bylo použito 30 alátů samčího pohlaví a 30 alátů samičího. Dva rozdílné typy sterilních kast byly používány z toho důvodu, že vojáci jsou jako kasta starší, jelikož vznikají z dělníků a reprezentují tak větší část životního cyklu kolonie. DNA byla extrahována z každého jedince s pomocí komerčního kitu Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit a všichni jedinci byli genotypováni na 12 mikrosatelitových lokusech.

Pro popis reprodukčního systému a otestování přítomnosti AQS u *S. minutus* byly parentální genotypy rekonstruovány z každé kolonie. Byly sledovány parametry jako příbuznost mezi jedinci v kolonii, koeficient inbreedingu pro sterilní kasty, koeficient inbreedingu v rámci celé populace a měření genetické diferenciace mezi koloniemi.

Způsob obnovy diploidie pro thelytokně produkované potomstvo byl určen na základě výpočtu přechodu do homozygotity na původně heterozygotním mateřském lokusu. Tyto hodnoty byly poté porovnány s těmi, které byly očekávány u různých typů thelytokie (Pearcy *et al.* 2006).

Celkem bylo genotypováno 690 sterilních jedinců, 136 neotenických královen, 2 primární královny, 9 primárních králů, 60 alátů samčího pohlaví a 60 samičího.

4. Výsledky

4.1 Rekonstrukce životního cyklu kolonie

Jak uvádím v kapitole 3.2, bylo pro pochopení životního cyklu podrobně zkoumáno 164 kolonií ve dvou sezónách. V následujících kapitolách (4.1.1–3) uvádím pozorování a rekonstrukci životního cyklu založenou na celkem 85 koloniích, u nichž se nám podařilo shromáždit kompletní sadu kýžených parametrů (viz tabulka S1).

4.1.1 Sociální struktura kolonií v maturační sezóně

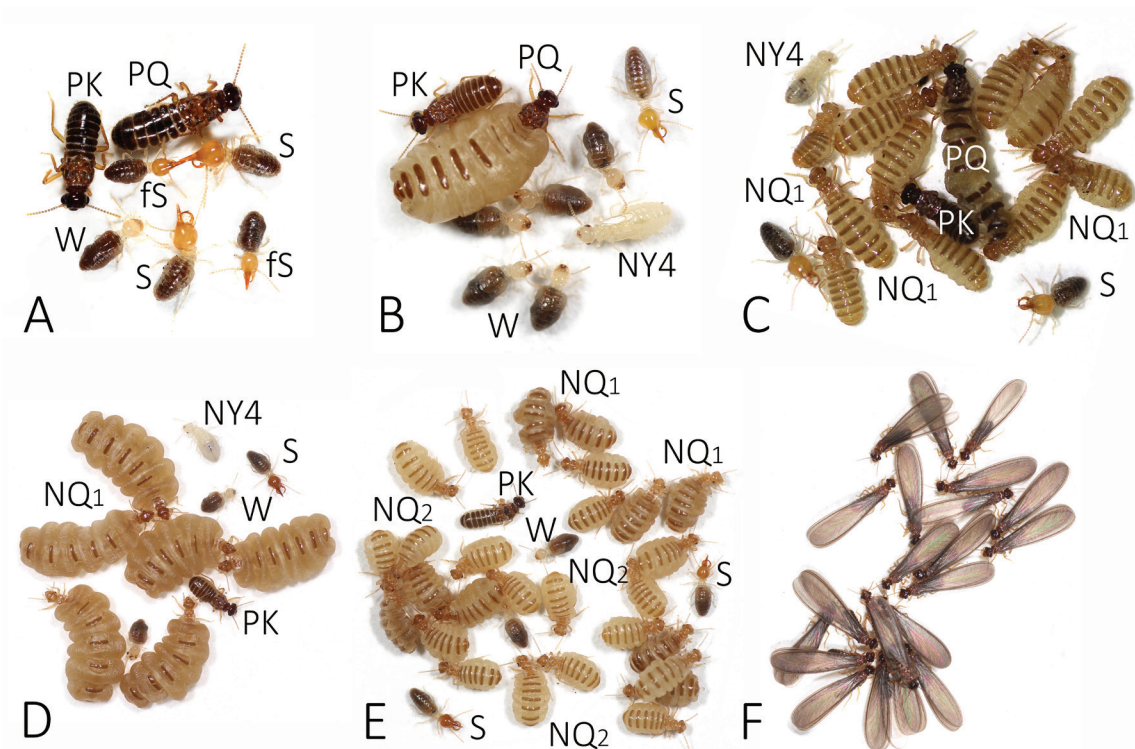
V maturační sezóně jsme pozorovali následující typy kolonií jasně odlišitelné sociální strukturou a dalšími charakteristikami.

a) **Incipientní kolonie** (2×) – kolonie krátce po založení, které obsahují pár primárních pohlavních jedinců v nediferencované královské komůrce. V jednom případě nevykazovala královna téměř žádnou fyzogastrii a nelišila se příliš svou velikostí od krále. V této kolonii jsme našli několik larev a pouhých několik dělníků a vojáků, z nichž někteří se jeví jako jedinci z první snůšky, tedy neobvykle malí a u vojáků se zřetelně jinou morfologií – jednalo se tedy o tzv. „první“ vojáky (Hanus *et al.* 2006) (obr. 4). Královna v druhé kolonii jevila mírnou fyzogastrii a kolonie celkem obsahovala několik desítek jedinců.

b) **Rané sekundární kolonie** (12×) – kolonie, v nichž se vyskytuje primární král ve společnosti mladých, lehce či středně fyzogastrických královen neotenického původu jediné (tedy první) generace. V těchto koloniích se též vyskytují nymfy filopatrického charakteru, které slouží pro vývoj budoucích neotenických královen. Ve dvou případech byla v těchto koloniích přítomna také primární královna na vrcholu či za zenitem maximální fyzogastrie, v jednom z těchto případů zjevně již reprodukčně neaktivní, se sraštělým abdomenem a nefunkčními vaječníky (obr. 4 a S2).

c) **Pozdní sekundární kolonie** (11×) – kolonie obsahující primárního krále a neotenické královny s vysokou úrovní fyzogastrie včetně množství filopatrických nymf, popřípadě dvě generace funkčních neotenických královen (obr. 4).

d) **Vyrojené kolonie** (10×) – kolonie, u nichž jsme na základě vertikálních hliněných přístaveb ve tvaru komínek, nebo přítomnosti odlámaných křídel v chodbách určili, že v předchozím reprodukčním období prodělaly rojení. Sociální uspořádání těchto kolonií je velmi rozmanité. Některé z nich jsou zcela opuštěné, a tedy po rojení zahynuly, některé obsahují pouze sterilní kasty, případně několik filopatrických nymf nebo mladých málo fyzogastrických neotenických královen bez doprovodu primárního krále, jiné naopak byly plně reprodukčně aktivní a obsahovaly primárního krále a fyzogastrické neotenické královny (obr. 4).



Obr. 4. Charakteristická sociální struktura kolonií dle kategorií použitých v této práci. **A.** Incipientní kolonie. **B.** Primární kolonie. **C.** Raná sekundární kolonie. **D.** Pokročilá sekundární kolonie. **E.** Pozdní sekundární kolonie. **F.** Rojící se kolonie. **PK**, primární král; **PQ**, primární královna, **NQ₁**, neotenická královna 1. generace; **NQ₂**, neotenická královna 2. generace; **NY4**, samičí nymfa 4. stadia; **W**, dělník; **S**, voják; **fS**, první voják.

4.1.2 Sociální struktura kolonií v reprodukční sezóně

V reprodukční sezóně jsme pozorovali následující typy kolonií, tříděných dle sociální struktury.

a) **Primární kolonie** (11×) – kolonie obsahující primárního krále a primární královnu ve středních stadiích fyzogastrie. V kolonii jsou rovněž přítomny první filopatrické nymfy 3 – 4 stadia, ojediněle i první čerstvě svlečené neotenické královny.

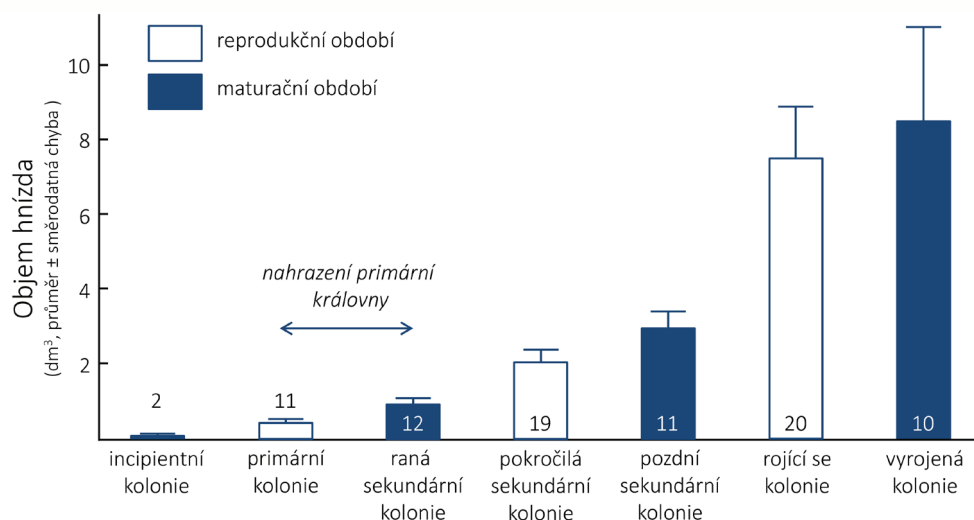
b) **Pokročilá sekundární kolonie** (19×) – kolonie obsahující primárního krále a plně fyzogastrické neotenické královny, mnohdy na vrcholu možné fyzogastrie (obr. 4). V koloniích se dále vyskytují filopatrické nymfy, z nichž některé již prodělaly svlékání v mladé neotenické královny druhé generace, v některém případě již jeví známky fyzogastrie a plodnosti.

c) **Rojící se kolonie** (20×) – kolonie, ve kterých dochází k masivní produkci nymf obou pohlaví, které se vyvíjejí v aláty, případně už obsahující přímo okřídlená imaga. Funkční pohlavní jedinci ve většině případů v takových koloniích chybí, často zde nenacházíme ani mladé jedince či vajíčka. Pouze v ojedinělých případech byli nalezeni plodící neotenické královny a primární král.

4.1.3 Velikosti hnízd v reprodukční a maturační sezóně

Jednotlivé kolonie tříděné dle uvedené sociální struktury se v rámci každé ze dvou uvažovaných sezón sdružují do poměrně dobře vymezených velikostních kategorií, které lze od sebe dle průměrného objemu hnízda jasně odlišit (obr. 5). V období maturačním jde o srovnání objemů a) incipientních (73 ± 29 ml) (průměr \pm SD), b) raných sekundárních (939 ± 360 ml), c) pozdních sekundárních (2843 ± 1580 ml) a d) vyrojených kolonií (8519 ± 7377 ml). V období reprodukčním jde o a) primární (406 ± 290 ml), b) pokročilá sekundární (2061 ± 1112 ml) a c) rojící se kolonie (7590 ± 5133 ml). V rámci jedné sezóny jsou tedy velikostní a sociální rozdíly zřetelné a odrážejí meziroční růst a vývoj sociální struktury.

Seřazení jednotlivých kategorií z obou sezón dle velikosti, uvedené v obrázku S1 nám umožnilo rekonstruovat životní cyklus, jak je rozepsáno v následující kapitole. Jednotlivé sociální kategorie se při sloučení obou sezón ve velikosti hnízd překrývaly, což nesporně odráží rozdílnou prosperitu jednotlivých kolonií, která zakrývá míru růstu kolonií mezi dvěma obdobími sběru, jež dělí 4 – 6 měsíců. Velkého rozpětí objemů dosahují především rojící se a vyrojené kolonie, které dle terénních pozorování prodělávají v období před rojením dramatický růst v periferních oblastech, spojený s budováním výletových komínů. Průměrné velikostní hodnoty pro kategorií však vyústily v řazení dle očekávaného sledu incipientní – primární – raná sekundární – pokročilá sekundární – pozdní sekundární – rojící se – vyrojená kolonie. Pro většinu kolonií se tak třídění dle objemu (obr. 5) ukázalo jako spolehlivý zpětný indikátor sociální struktury i stadia životního cyklu, v němž se kolonie aktuálně nacházela.



Obr. 5. Rekonstrukce životního cyklu *S. minutus* založená na sociální struktuře a hnízdni velikosti 85 kolonií, sbíraných ve třech po sobě následujících letech ve dvou sezónách. Definice sociálních struktur jsou uvedeny v textu v kapitolách 4.1.1 a 4.1.2.

4.1.4 Životní cyklus kolonií

Z výše popsaných charakteristik jsme proto vydedukovali následující životní cyklus. Uvedené údaje vycházejí z pozorování všech 164 podrobně zkoumaných kolonií. Pro lepší přehlednost jsme jej rozdělili do úseků odpovídajících kalendářním rokům (viz tabulka S1).

ROK 1.

Po masivním rojení, které přichází v druhé polovině hlavní dešťové sezóny (červen – červenec), zakládají páry odkřídlených alátů nové kolonie v pralesním substrátu, často při nějaké překážce (palma rodu *Astrocaryum*, kmen stromu, trouchnivějící pařez). Zde pak snáší první vajíčka, ze kterých se stávají první dělníci – pečovatelé. Během expedice v říjnu 2015 byly, vzhledem k jejich velikosti pouze ve dvou vzácných případech, takové incipientní kolonie nalezeny. Jednalo se o malá kulovitá hnízda o maximálním objemu 94 ml. Reprodukční jedinci byli tmavě pigmentovaní s pouze lehkým stupněm fyzogastrie u primárních královen. Primární králové měli širší abdomen v kaudální části zadečku, pravděpodobně vlivem růstu pohlavních žláz. Tyto kolonie obsahovaly i několik „prvních“ vojáků (Hanus *et al.* 2006), kteří byli morfologicky odlišní (viz obr. 4) od vojáků vyvinutých ve starších koloniích. Královská komora v těchto případech nebyla ještě jasně tvarována oproti pozdějšímu stavu.

ROK 2.

V následujících měsících kolonie dále rostou a primární královny nalezené v jarních měsících koncem prvního roku života kolonie už dosahují středního stupně fyzogastrie (obr. 4). V období prvního roku nacházíme primární kolonie pouze s několika samičími filopatríckými nymfami 3.– 4. stadia (viz kapitola 4.2.1), určenými k nahrazení primární královny, ojedinelé pak v ročních koloniích jsou už i první čerstvě svlečené, nefyzogastrické neotenické královny. Roční primární kolonie v reprodukční sezóně nebyly nikdy nalezeny s větším počtem nymf (maximum bylo 9 samičích nymf), které by mohly indikovat přípravu na rojení. U těchto kolonií byla královská komora již lépe diferencována – jednalo se o místnost ovoidního nebo lehce diskovitého charakteru s průměrem od 0,4 mm do 1,3 mm (obr. 6). Pokud byly v přítomnosti primárního páru nalezeny mladé neotenické královny, nenacházely se poblíž královské komůrky, ale spíše v periferních částech hnízda. Vajíček bylo produkováno velké množství a rovněž byly uloženy v komůrkách dále od královské komory.

V první části druhého roku života kolonií se samičí nymfy svlékají do stadia neotenických královen a postupně nahrazují primární královnu zakladatelku. V podzimním, maturačním období tak nalézáme kolonie jednak krátce po nahrazení královny, tak se situacemi přechodnými, při nichž můžeme pozorovat jak primární královnu, tak i dospívající neotenické královny. Toto přechodové stadium jsme pozorovali dvakrát – v jednom případě (G14-205) šlo o primární královnu s jedenácti fyzogastrickými, dvěma středně fyzogastrickými a jednou mladou, čerstvě svlečenou neotenickou královnou. Navíc zde

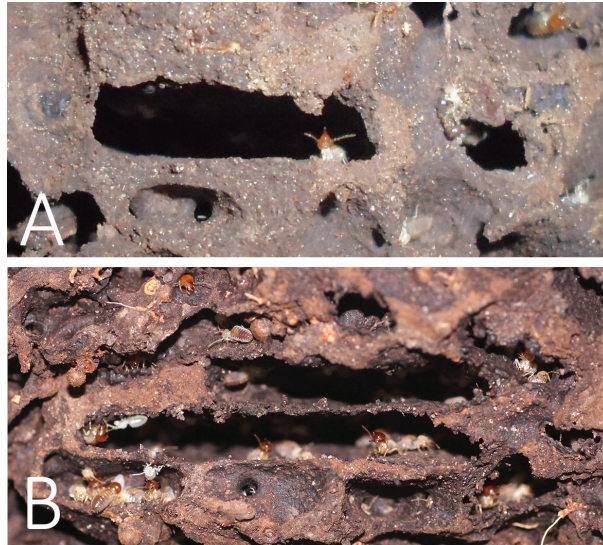
bylo přítomno ještě 7 dalších samičích nymf. V této kolonii jsme u královen provedli pitvu pohlavních orgánů, abychom zjistili, v jakém stupni nahrazení se kolonie nalézají. Zatímco primární královna se již nacházela v neplodném stadiu a její ovaria byla nefunkční bez jakýchkoli zralých oocytů, neotenické královny měly zrající ovaria s již zralými oocyty (obr. S2). V druhém případě (G14-227) šlo o kolonii, v níž se nalézal primární král s primární královnou ve vrcholném stavu fyzogastrie, společně se dvěma mladými, ještě téměř nefyzogastrickými královnami, jejichž maturace a náhrada primární královny teprve započaly a šesti samičími nymfami třetího a čtvrtého stadia.

Nejvíce inspektovaných hnízd však v podzimním období obsahovalo primárního krále již ve společnosti mladých a plodných neotenických královen. Tyto kolonie se většinou vyznačovaly vysokou kompaktností a ohraničeností v terénu. Královská komora diskovitěho tvaru o průměru 0,9 – 3,6 cm obsahovala od 3 do 25 neotenických královen. Často měla tato komora více pater, případně byla rozdělena tenkými vertikálními příčkami (obr. 6). V těchto koloniích se navíc často nalézalo i malé množství filopatrických nymf, většinou samičího pohlaví, které mohou sloužit pro vývoj dalších neotenických královen. Přítomnost jedné či několika nymf samčího pohlaví, které mohly být určeny k případnému vývoji v neotenické samce (krále), jsme zaznamenali v sedmi sekundárních koloniích. Samotný vývoj neotenických králů je však velmi vzácná záležitost (viz kapitola 4.2). Velmi výjimečné jsou i nálezy neotenických králů, které jsme však pozorovali pouze ve třech případech, z nichž dva pocházely z laboratorního prostředí. Mladé neotenické královny poté dospívají a výrazně rostou směrem k maximální velikosti ovarii a abdomenu (obr. 4, S3). Samotné kolonie se dále zvětšují a produkují velké množství sterilních kast a případných dalších filopatrických nymf. Jak z přímých pozorování přechodových stadií, tak z přítomnosti královen pouze nízkého stavu fyzogastrie soudíme, že k nahrazení primární královny dochází v druhém roce života kolonie.

ROK 3.

V jarním období koncem druhého roku a začátkem roku třetího již v sekundárních koloniích nacházíme plně fyzogastrické královny (3 – 32 královen). V tomto roce může docházet k postupnému nahrazování první generace neotenických královen generací mladých, nově vzniklých neotenických královen. Tyto jsou od sebe v koloniích dobře odlišitelné – královny první generace bývají tmavěji zbarvené s větším podílem kutikuly u štítků na abdomenu vůči intersegmentální membráně, která bývá v tomto stadiu svraskalá a tmavá. Často navíc nesou známky nejrůznějšího poškození v podobě chybějících končetin nebo tykadlových článků, navíc zřetelně nekrotizovaných. Oproti tomu mladé neotenické královny druhé generace mají větší podíl světlé intersegmentální membrány vůči kutikule na abdominálních štítcích (obr. 10). Maximální počet královen v takovéto dvougenerační kolonii činil 32 – z toho 5 královen bylo první generace a 27 druhé generace.

Také v podzimní, maturační sezóně druhého roku jsme nacházeli tyto kolonie s neotenickými královnami ve vrcholném stadiu fyzogastrie, nebo jasně dvougenerační. Ať už se v kolonii toto nahrazení druhou generací neotenických královen odehraje či nikoliv, začínají, počínaje tímto obdobím, kolonie investovat do rozmnožování, tedy do produkce maximálního množství nymf obou pohlaví určených pro vývoj v okřídlené dospělé.



Obr. 6. Královské komory *S. minutus*. **A.** Jednopatrová královská komora primární kolonie. **B.** Dvoupatrová královská komora sekundární kolonie.

ROK 4.

Masová produkce nymf obou pohlaví a s tím spojená stavba nových struktur počíná v zimní až jarní části třetího roku kolonie, což si dovoluujeme tvrdit na základě pozorování počátku přípravy k rojení u jedné z laboratorních kolonií (G15-400). Koncem třetího roku již kolonie obsahují nymfy v různém stadiu vývoje, které se v průběhu května a června svlékají v okřídlené dospělé a připravují k disperzi. Zároveň s produkcí velkého množství nymf se začíná měnit vnější architektura hnízd, která rychle rostou, na jejich okraji se tvoří velké a často velmi difusní struktury s velkou koncentrací nymf a alátů. Struktury rojících se kolonií jsou proto často nejasně ohraničené a nebývají z tak pevného materiálu jako pozdní sekundární kolonie s neotenickými jedinci. V každém případě však kolonie explozivně zvětšuje svůj objem (viz obr. 5, S1) na více než dvojnásobek průměrné velikosti pozdní sekundární kolonie. V těchto koloniích jsme našli ve všech případech budoucí účastníky rojení ve velkých množstvích od 99 až do 4837, ve stadiích vývoje odpovídajících sezóně a období sběru. Přípravenost kolonie na rojení a její zralost byla kromě toho závislá na typu lokality – jak jsme vypořádali, tak na každé ze zkoumaných lokalit postupuje rychlost vývoje disperzních jedinců jiným tempem.

V těchto velkých rojících se koloniích jsme jen ve třech případech objevili rozmnožující se pohlavní jedince, tedy primárního krále a harém neotenických královen, kteří produkovali vajíčka a mladé

larvy. Většinou však byly rojící se kolonie charakterizovány právě velkým množstvím disperzních jedinců a nepřítomností funkčních pohlavních jedinců, vajíček a mladých larev. V těchto případech nebyla nalezena ani královská komora. Pouze v jednom případě jsme takovou královskou komoru našli, nicméně ji obývaly nymfy čtvrtého a pátého stadia.



Obr. 7. Vyrojená kolonie nalezená v listopadu, tedy cca 4 měsíce po rojení. Šipka ukazuje výletové komíny zbudované v reprodukční sezóně před svatebním letem.

Kolonie, které jsme nacházeli v podzimním období po rojení, se vzájemně velmi lišily. Jakožto indicie toho, že se konkrétní kolonie vyrojila, nám posloužily hliněné přístavby v podobě 1 – 15 komínků, které se na hnízdě vertikálně tyčily (obr. 7). Tyto přístavby aláti používají pro opuštění kolonie při svatebním letu (Mill 1983). Dalším potenciálním důkazem rojení byly zbytky křídel v chodbách kolonie. Některé kolonie byly po rozebrání absolutně prázdné a bez života, jiné pouze s jedinci sterilních kast a bez mladých jedinců. V těchto případech jsme našli v několika koloniích i malé množství nymf, které v nich i po vyrojení zůstaly. Naproti tomu jsme však nacházeli i kolonie, ve kterých byly rovněž malé larvy i když bez dospělých plodných pohlavních jedinců. A konečně v posledním případě jsme nacházeli také kolonie, které sice měly vystavěny komínové přístavby, ale ve vnitřním uspořádání jsme našli větší množství fyzogastrických neotenických královen spolu s primárním králem. Jelikož již v následujícím jarním období nenacházíme funkční kolonie, které by nesly jasné znaky prodělaného rojení (difuzní struktury, komínové přístavby apod.), myslíme si, že ve většině kolonií dochází pravděpodobně po třetím roce fungování a masivním vyrojení k zániku. Nemůžeme však přímo vyloučit, že některé z kolonií, které rojení prodělají i nadále pokračují.

4.2 Poměr pohlaví disperzních jedinců v koloniích

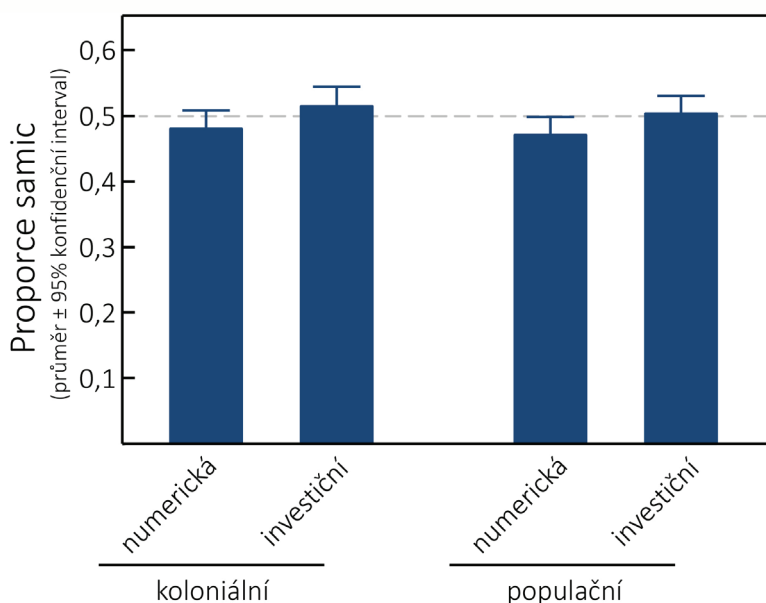
4.2.1 Poměr pohlaví během maturačního období

V maturačním období jsme v měsících září až listopadu sesbírali a vyhodnocovali data pro 45 kolonií (viz tabulka S3), ve kterých se nacházelo ve všech případech jen malé množství filopatrických nymf. Tyto nymfy byly v koloniích přítomny v průběhu celého roku a jednalo se o jedince různých stadií od druhého až do pátého. V naprosté většině případů – 35 kolonií, převažovaly nymfy čtvrtého stadia. Drtivá většina nalezených nymf byla samičího pohlaví, naopak pouze v sedmi koloniích jsme našli nymfy samčího pohlaví. Počet samičích nymf se mimo období rojení pohyboval od 2 do 34 jedinců (median = 6), s výjimkou jednoho odlehlého pozorování 106 nymfálních jedinců v jediné kolonii. Naopak, pokud byly v kolonii přítomny nymfy samčího pohlaví, jednalo se o 1 – 2 jedince. Ve třech koloniích jsme našli vyšší počet samců (9 – 16) i samic (8 – 12) v téměř vyrovnaných počtech, i když samci ve všech případech početně převažovali (viz tabulka S3).

Tyto nymfy se vyskytovaly často v přítomnosti primárního páru, nebo v sekundárních koloniích v přítomnosti již plodících neotenických královen. Nezřídka jsme rovněž nacházeli kolonie, ve kterých nebyli přítomni žádní reprodukcující se jedinci – pouze tyto nymfy.

4.2.2 Poměr pohlaví během reprodukčního období

V reprodukčním období jsme sesbírali 26 kolonií, obsahujících velké množství disperzních jedinců obou pohlaví (viz tabulka S3). Celkem jsme do souboru zahrnuli 23403 disperzních jedinců ze 14 kolonií s průměrným množstvím 1672 (SD = 1215) a maximálním množstvím 4837. Průměrný numerický poměr pohlaví byl lehce, i když nesignifikantně vychýlen ve prospěch samců (průměr = 0,480; SD = 0,054; $t = 1,402$; $p = 0,18$). Investiční poměr pohlaví na úrovni kolonií vyšel jako nesignifikantně vyšší ve prospěch samic (obr. 8) a blížil se tak rovnovážné hodnotě (průměr = 0,514; SD = 0,054; $t = 0,93$; $p = 0,366$). Numerický poměr pohlaví na populační úrovni ukázal mírný, ale signifikantní odklon ve prospěch samců (průměr = 0,470; 95% konfidenční interval = 0,444–0,496). Navzdory tomu je ale celková investice na populační úrovni (po započtení dehydratované hmotnosti) téměř úplně vyvážená (průměr = 0,504; 95% konfidenční interval = 0,478 – 0,531)(obr. 8).



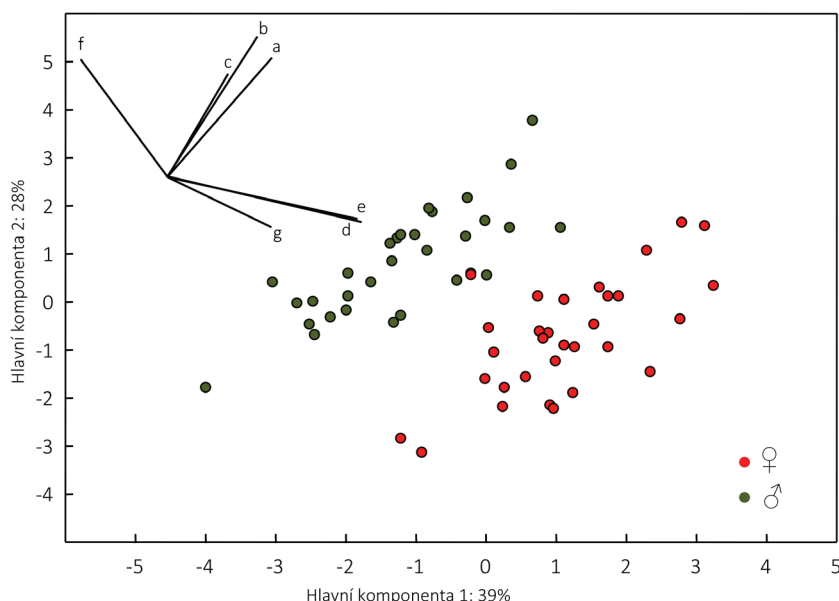
Obr. 8. Poměr pohlaví vyjádřený jako proporce samic mezi disperzními pohlavními jedinci vypočtená z 23403 pozdních nymf a alátů pocházejících ze 14 rojících se kolonií v reprodukčním období. Vlevo nevážené průměrné hodnoty a investiční proporce na jednu kolonii, vpravo kumulativní hodnoty vypočtené na úrovni celé populace, zohledňující produktivitu jednotlivých kolonií.

4.3 Pohlavní dimorfismus u imag

Pohlavní dimorfismus imag byl zjišťován na základě morfometrických měření jednotlivých struktur u 60 jedinců (ve vyrovnaném poměru samice : samci) z jedné kolonie a u pěti jiných kolonií jsme pohlavní dimorfismus hodnotili srovnáním hmotností samců a samic. K interpretaci morfologických dat jsme použili první a druhou komponentu PCA analýzy, které v tomto případě dohromady vysvětlují 66,17% celkové variability. Na základě PCA zobrazení obou pohlaví (obr. 9) lze vyzorovat při souhrnu veškerých měřených znaků nesporný pohlavní dimorfismus. Vektory korelací jednotlivých morfologických proměnných s první a druhou hlavní komponentou uvádí graf na obrázku 9. Měřené tělní struktury samičích imag jsou ve všech případech větší – největší rozdíl se však ukazuje pro celkovou délku křídel i jejich délky od odlomové zóny. Rovněž délka růstové zóny tykadla se ukazuje větší u samic. Oproti tomu u samců imag je vyšší hodnota délky tibie (obr. 9).

Hmotnostní dimorfismus byl zkoumán na 220 jedincích (ve vyrovnaném poměru samice : samci) z pěti kolonií (viz tabulka S4). Ačkoli jsme pozorovali jistou variabilitu v absolutních hmotnostech mezi koloniemi, která mohla být dána úrovní připravenosti kolonie k disperznímu letu, relativní poměr hmotností samic ku hmotnosti samců byl velmi stabilní napříč koloniemi, tj. průměr hmotností samice : samci = 1,148, SD = 0,0075; 95% konfidenční interval = 1,141-1,154, což jasně dokumentuje

signifikantní velikostní pohlavní dimorfismus ve prospěch samic o hodnotě cca 15%. U imag se tak u samic ukazuje jak vyšší hmotnost, tak i větší celková velikost, které jsou v rámci druhu stabilizované.



Obr. 9. Pohlavní dimorfismus alátů – vztah všech měřených morfologických struktur znázorněný s pomocí analýzy hlavních komponent. **a**, šířka hlavy; **b**, šířka pronota; **c**, délka pronota; **d**, délka pravého předního křídla od základů až po konec; **e**, délka křídel od odlomové plochy po konec; **f**, délka tibie levé zadní nohy; **g**, délka růstové zóny pravého tykadla od devátého segmentu od konce po konec pedicelu. Růžice úseček znázorňuje vektory korelací jednotlivých měřených struktur s první a druhou hlavní komponentou.

4.4 Ontogeneze neotenických královen

Ontogenetický vývoj neotenických královen, jenž pocházejí z filopatrických nymf, které jsou v kolonii přítomny celoročně, jsme rekonstruovali jak z výsledků přímých pozorování po rozebrání kolonií, tak dlouhodobých pokusů s oddělenými nymfami a morfometrické analýzy nymfálních stadií. Díky těmto dílčím výsledkům jsme byli schopni potvrdit naše předchozí hypotézy.

4.4.1 Přímá pozorování

Přímá pozorování pocházejí z čerstvě rozebraných kolonií, v nichž se nám v šesti případech podařilo zachytit nymfy přímo při svlékání do stadia neotenické královny. V dalších pěti koloniích jsme našli čerstvě svlečené neotenické královny. Všechny tyto případy jsme fotograficky zdokumentovali (obr. 10) a exempláře i se svlečkami zakonzervovali v 96% EtOH nebo FAA. Díky těmto datům se nám podařilo vypořádat, že svlékání probíhá často již po prvních několika hodinách po oddělení nymf od přítomných plodných královen (3 – 24 hod). Ze svlečky křídelních základů (viz obr. 10) bylo navíc možno usuzovat na vznik neotenických královen z nymf čtvrtého stadia. U těchto čerstvě svlečených

královen navíc následovala velmi rychlá pigmentace kutikuly – plné pigmentace dosáhly už za 6 – 12 hodin (obr. 10).



Obr. 10. Vývoj neotenických královen. **A.** Samičí nymfa 4. stadia svlékající se v neotenickou královnu. Šipky ukazují křídelní základy na nymfální svlečce. **B.** Čerstvě svlečená neotenická královna, která dosahuje pigmentace v průběhu 12 hodin po ekdysi. **C.** Dospělá neotenická královna první generace s maximální úrovní fyzogastrie, přibližně 20 měsíců po založení kolonie. **D.** Stárnoucí neotenická královna se svaštělým abdomenem, přibližně 29 měsíců po založení kolonie. Měřítko označuje 1 mm.

4.4.2 Výsledky dlouhodobých pokusů

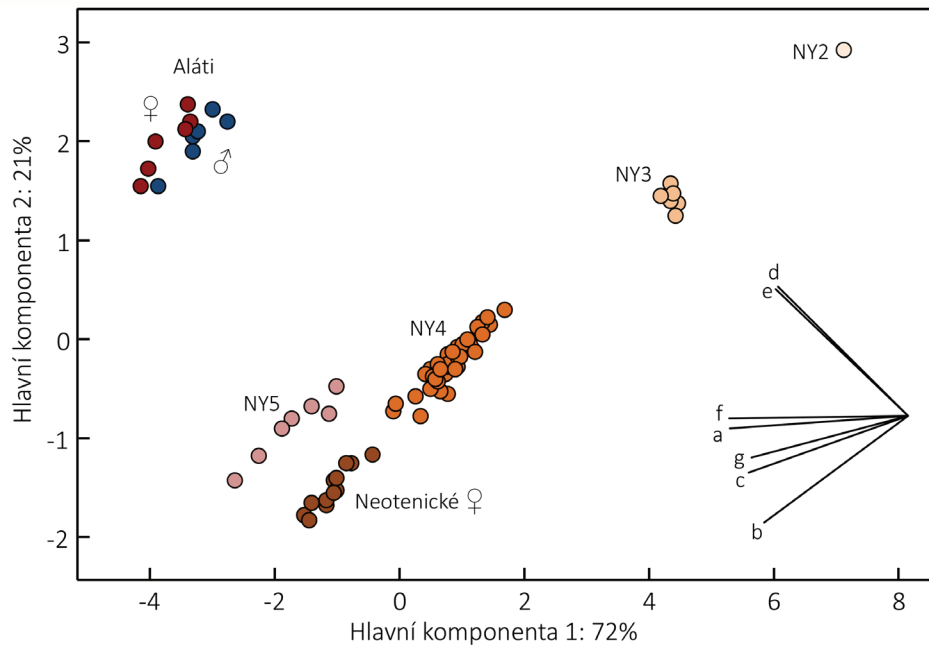
Dlouhodobé pokusy s oddělováním nymf proběhly na dvaceti koloniích. Oddělky v Petriho miskách (10 kolonií) byly kontrolovány denně a tak byla zachycena dynamika celého procesu. Ve čtyřech případech jsme při kontrole (po 24 – 60 hodinách) našli mezi ostatními nymfami čtvrtého stadia čerstvě svlečené, případně již pigmentované neotenické královny. Ve třech případech šlo pouze o jednoho jedince ze skupiny. V jednom případě o všech pět nymf najednou. Tyto dílčí výsledky lze interpretovat jako druhý nezávislý důkaz o původu neotenických královen z nymf čtvrtého stadia.

Pokusy s fragmenty hnízda (8 kolonií) měly za úkol vytvoření neotenických královen z dlouhodobého hlediska za výše popsaných experimentálních podmínek. Bohužel nebyly úspěšné. Až na jeden případ, v němž přežil pouze primární král a jedna nymfa čtvrtého stadia s několika dělníky, všechny experimentální fragmenty do 14 dnů uhynuly. Pravděpodobně byl zásah do kolonie příliš velký. Neúspěch tohoto pokusu je jedním z několika neúspěchů při pokusech o odchov kolonií, které byly před pokusem otevřené. Ve většině případů kolonie takový zásah velmi špatně snášely a brzy zanikly.

Pokusy s odebráním primární královny z kolonie (2 kolonie) přímo v terénu měly prokázat umožnění náhrady primární královny neotenickými královnami vzniklými z filopatrických nymf. Ani ty však nebyly úspěšné, jelikož při kontrole po šesti měsících byly kolonie nalezeny zaniklé.

4.4.3 Výsledky morfometrické analýzy

Pro analýzu bylo použito 128 jedinců různých stadií ze tří kolonií. Tím byla vytvořena téměř kompletní vývojová řada (viz tabulka S5). Jedna z kolonií (G15-123) obsahovala pouze aláty a byla tak použita především pro analýzu pohlavního dimorfismu a vývoje křídelních znaků (viz kapitola 4.3).



Obr. 11. Morfometrická analýza nymfálních stadií, neotenických královen a alátů, znázorněná s pomocí analýzy hlavní komponent. Matice dat kombinuje měření ze tří kolonií, která byla centrována s pomocí šířky hlavy nymf čtvrtého stadia. NY1–5, nymfální stadia; a, šířka hlavy; b, šířka pronota; c, délka pronota; d, délka pravých předních křídelních základů nebo křídel od základů až po konec; e, délka křídel, či jejich základů od koncového záhybu mesonota/od odlomové plochy po konec; f, délka tibiie levé zadní nohy; g, délka růstové zóny pravého tykadla od devátého segmentu od konce po konec pedicelu. Růžice úseček znázorňuje vektory korelací jednotlivých měřených struktur s první a druhou hlavní komponentou.

Pro interpretaci morfologických dat jsme použili první a druhou komponentu PCA analýzy, které dohromady vysvětlují 92,26% celkové variability. Vektory korelací jednotlivých morfologických proměnných s první a druhou hlavní komponentou uvádí graf v obrázku 11. Naměřené hodnoty byly znázorněny v grafu s pomocí prvních dvou komponent (Obr. 11). Jednotlivá pozorování se na základě souboru morfologických parametrů jasně seskupují do skupin dle stadií. Od třetího stadia je patrný i pohlavní dimorfismus – větší struktury u samic, s výjimkou tibií, které jsou delší u samců. Bez ohledu na variabilitu danou pohlavím se skupiny v rámci daného nymfálního stadia výrazně nerozdělují dle pohlaví. Na základě PCA zobrazení jednotlivých stadií (obr. 11) lze jasně vypožorovat, že neotenické královniny jsou svými morfologickými charakteristikami umístěny mezi čtvrtým a pátým nymfálním stadiem. Od čtvrtého stadia se liší především celkovým růstem struktur, očekávatelným při

každém dalším svlékání (šířka hlavy, délka růstové zóny tykadla, délka tibie), zatímco od pátého stadia je odlišuje především délka křídelních základů, které jsou u neotenických královen redukovány. Naopak páté stadium je jimi jasně vymezeno, ač se v ostatních znacích velmi podobají. Druhým směrem se pak vychyluje okřídlená imaginální linie (obr. S4).

4.5 Interpretace genetické analýzy

Genetické analýzy proběhly na našem partnerském pracovišti a samotné tak nejsou mou vlastní prací. Níže proto pouze shrnuji pozorování kolegů z Université Paris Est Créteil a interpretuji nejdůležitější zjištění, relevantní pro mou práci. V případě genetické analýzy dělníků a vojáků byly u všech kolonií nalezeny až 4 alely na lokusu, a rovněž až 4 genotypy, přičemž ve všech případech byly rovněž přítomny exkluzivní alely primárního krále. Koeficient příbuznosti (r) mezi sterilními kastami a primárním králem byl 0,494. Příbuznost s primární královnou byla 0,479 a s neotenickými královnami 0,436. Vzájemná úroveň příbuznosti mezi vojáky a dělníky byla 0,490, tedy stejná jako by se dala očekávat u sourozenců. V žádném z uvedených případů se pozorované hodnoty signifikantně nelišily od očekávané hodnoty 0,5 pro vztah otec–potomek, matka–potomek, nebo sourozenci se společnými rodiči. Zároveň frekvence jednotlivých genotypů dělníků a vojáků nevybočovala z očekávaného Mendeliánského rozložení rodičovských alel. Takový výsledek lze očekávat pouze u sexuálně produkovaných jedinců, potomků primárního krále a královny nebo primárního krále a neotenických partenogenů královny. V případě 130 neotenických královen byly nalezeny maximálně 2 alely na lokusu a maximálně 3 genotypy. Alely primární královny byly nalezeny na všech lokusech neotenických královen, buď v původní heterozygotní podobě, nebo homozygotní pro jednu z mateřských alel. Výlučné alely primárního krále v tomto případě úplně chyběly. Úroveň příbuznosti s primární královnou byla 0,894, zatímco s primárním králem 0,004, což značí vysokou příbuznost s primární královnou a nepříbuznost s primárním králem, v obou případech signifikantně odlišnou od hodnoty 0,5, očekávané při pohlavním biparentálním původu neotenických královen. U zbývajících 6 neotenických královen ze dvou kolonií (G14-42, G14-47) byly nalezeny maximálně 4 alely a 4 genotypy na lokusu. Přítomny tedy byly jak alely primární královny, tak i primárního krále. Úroveň příbuznosti byla s primární královnou 0,560, zatímco s primárním králem 0,417, v obou případech se signifikantně nelišily od hodnoty 0,5 pro sexuální původ. To ukazuje, že těchto výjimečných 6 jedinců (4% neotenických královen), vzniklo křížením primárního krále a primární královny.

U okřídlených jedinců z kolonií procházejících rojením nebyli v kolonii, jak je pro takové kolonie obvyklé reprodukcí se jedinci. Genotypy rodičů tak byly rekonstruovány na základě genotypů sterilních jedinců a logicky nebylo lze přiřadit, který rodičovský genotyp byl otcovský a který

mateřský. U většiny okřídlených dospělců byly nalezeny až 4 alely na lokusu, a rovněž až 4 genotypy, přičemž ve všech případech byly přítomny alely obou rekonstruovaných rodičů. Pouze u 4 alátů samičího pohlaví (6% samičích alátů) ze dvou různých kolonií (G16-39 a G16-42), nebyly nalezeny alely primárního krále, což ukazuje na jejich vznik partenogenetickou cestou.

Pro princip obnovy diploidie se u tohoto druhu ukazuje vysoká míra konzervace původních mateřských heterozygotních kombinací (míra změny na homozygotní od 5 do 34%, průměrně 20%), která je velmi odlišná od apomixie, duplikace gamet, či automixis s terminální fúzí. Naopak jsou tyto hodnoty jednoznačně v souladu s předpoklady automixis s centrální fúzí.

Výsledky tedy ukazují na sexuální původ sterilních kast a alátů (pro samčí ve 100% případů, pro samice v 94% případů), kteří jsou v koloniích produkováni primárním párem, popřípadě pářením primárního krále s neotenickými královnami, vzniklými po nahrazení královny primární. Zároveň se též ukázalo, že neotenické královny jsou v 96% případů partenogenetického původu a pouze výjimečně ve 4% mohou vznikat i pohlavně. Rovněž se partenogenetický původ ukázal v 6% samičích alátů.

Sterilní potomstvo i alátů si tak zachovávají genetickou diverzitu i v případě absence primární královny. Tím tedy bylo potvrzeno pro druh *Silvestritermes minutus* využívání strategie AQS, což z něj činí teprve čtvrtý druh u vyšších termitů s touto smíšenou reprodukční strategií. Vysoká je i míra zachování heterozygotních kombinací, což poukazuje na automixii s centrální fúzí, podobně jako u příbuzného druhu *Embiratermes neotenicus* (Fougeyrollas *et al.* 2015).

4.6. Ekologické faktory spojené s hnízdem

Náš modelový druh termita *Silvestritermes minutus* se vyskytuje ve Francouzské Guyaně, Guyaně, Brazílii a Ekvádoru (Emerson 1925, data z online databáze Termite Catalog). Jde o druh, který se typicky vyskytuje v pralesích se střední mírou narušení, kde roste především sekundární vegetace. Kolonie jsou většinou tvarem blízké kouli, popř. nepravidelnému sféroidu a spíše menších velikostí, ale v reprodukčním období se objevují i velké, špatně strukturované a difusní stavby (viz kapitola 4.1.4), které byly materiálně i mnohem řidší.

Kolonie byly téměř ve všech případech postaveny v těsné blízkosti nebo přímo na překážce. V největším procentu případů byly nalezeny přímo na mladých stoncích palem rodu *Astrocaryum* ze tří druhů (*Astrocaryum gynacanthum*, *Astrocaryum sciophilum* a *Astrocaryum vulgare*), na kořenech nebo kmenech velkých stromů přistavěné bočně, či okolo stonků mladých stromů a lián (do průměru 4 cm) rostoucích v pralesním podrostu. Velmi často byly rovněž nalézány jako přístavba na

trouchnivějících pařezech nebo na mrtvých větvích ležících na zemi. V některých případech část kolonie zasahovala i do samotné dřevní hmoty, ač nebylo patrné, že by skutečně docházelo k cílenému vyhlubování chodeb dělníky nebo spíše k využívání prasklin a děr v trouchnivějícím materiálu a jejich zaobalování hliněnou hmotou ve formě galerií.

Velká část kolonií byla navíc vybudována odděleně 10 – 15 cm nad pralesním půdním horizontem, s nímž byla propojena pouze krytými hliněnými galeriemi. Tento fenomén byl pozorován spíše na vlhčích lokalitách, zatímco na suchých stanovištích byly kolonie zbudovány přímo na zemi. Povrch kolonie pokrývala ve všech případech tvrdá hliněná krusta, vnitřek hnízda byl pak z porézně strukturovaného hliněného materiálu a vždy zpevněn sítí kořenů, které vypadaly morfologicky velmi podobně ve všech koloniích. Hmotnosti hnízd byly velmi variabilní a to i v rámci stejně velkých kolonií a spíše byly spojeny s její momentální vlhkostí a hustotou.

Průměrná hodnota pH, kterou jsme měřili v 55 koloniích, byla 6,875 (SD = 0,834) a pohybovala se v rozmezí od 6,5 do 8. Hodnota pH byla dosti variabilní a signifikantně se nelišila od kontrolních měření pH pralesního substrátu, jehož průměrná hodnota byla 6,625 (SD = 0,270)(t-test, df = 108, t = -1.891, p = 0,062, Levenův test homogenity, p=0,285). Teplota v 52 koloniích se pohybovala od 26 do 28 °C a její průměr 26,25 °C (SD = 0,947) byl signifikantně nižší než teplota okolí, která dosahovala 25 až 29 °C, při průměru 27,5 °C (SD = 1,06)(t-test, df=100, t = -3,53, p = 0,00063, Levenův test homogenity, p=0,206).

Vlhkost v koloniích se velmi razantně lišila v rámci období i lokalit. V obdobích s malým množstvím srážek se pohybovala od 16 do 39% v koloniích a od 23 do 42% mimo ně. V období vysokých srážek vlhkost téměř nikdy neklesala pod 60%.

Hnízda byla v některých případech kohabitoována s dalším druhem termita. Často šlo o velká hnízda v paždí palem rodu *Astrocaryum*, které poskytují díky otrněnému stonku velmi dobrou ochranu a množství zachycené biomasy pro založení kolonií. Ve vzorku 164 kolonií jsme ve 3 případech našli hnízdo kohabitoované s rodem *Subulitermes*, v 6 případech s rodem *Anoplotermes*, ve 2 případech s druhem *Silvestritermes heyeri* a v jednom případě s rodem *Anhangatermes* a *Nasutitermes*. Vzácně jsme též ve dvou případech našli hnízdo sdílené s tropickými mravenci *Pachycondyla harpax*. Ve všech zmíněných případech byly ale chodby našeho modelového druhu a kohabitoovaného druhu znatelně odděleny. Při rozebrání takového hnízda na sebe většinou zástupci obou rodů začali v krátké době útočit. Přímou v hnízdě bylo nalézáno velké množství inkviliního hmyzu z řádů Diptera, Hymenoptera a Zygentoma. Téměř ve všech sekundárních koloniích bylo pozorováno velké množství isopodních korýšů, kteří nápadně připomínali zbarvením mladé neotenické královny a často byli i přítomni v královské komoře. V některých koloniích jsme též našli štírky.

5. Diskuze

V této práci jsme si kladli základní otázku na možný výskyt čtvrtého případu unikátní smíšené reprodukční strategie zvané Asexual Queen Succession (AQS) ve skupině vyšších termitů u druhu *Silvestritermes minutus*. Dále jsme si kladli za cíl podrobně popsat životní cyklus a pojmenovat možný dopad AQS na životní strategie druhu. Na samém počátku byl náhodný objev jednoho hnízda s atypickou sociální strukturou, v níž byl nalezen primární král spolu s harémem fyzogastrických neotenických královen. Tato situace však sama o sobě neznamená nutně využívání AQS v její plné šíři, jelikož jevy spojené se smrtí jednoho z rodičů a jeho nahrazení jedním nebo více sekundárními pohlavními jedinci jsou u termitů běžné (Roisin 1990, Atkinson a Adams 1997, Myles 1999). My sami jsme byli svědky takové situace i v terénu u několika druhů, které nebyly naším cílovým druhem (osobní pozorování – *Anoplotermes banksii*, *Subulitermes* sp., *Constrictotermes cavifrons*, *Inquilinitermes inquilinus*). Sociální uspořádání tak není spolehlivou známkou využívání strategie AQS a může se jednat pouze o akcidentální využití možného vývojového potenciálu sekundárních pohlavních jedinců v reakci na disturbanci. Strategie AQS však v sobě snoubí použití pohlavního rozmnožování pro produkci sterilních jedinců a disperzních pohlavních jedinců a thelytokní partenogeneze pro produkci neotenických královen, což vede k výše zmíněné sociální struktuře. Tato jedinečná strategie nesporně vznikla vícekrát nezávisle, a to pravděpodobně třikrát v rámci jediného rodu nižších termitů *Reticulitermes* (Dedeine *et al.* 2016) a poté opakovaně ve dvou liniích vyšších termitů, tedy u *Cavitermes tuberosus* a jemu příbuznému druhu z dosud nepopsaného nového rodu (oba Termitinae) (Fournier *et al.* 2016, Hellemans *et al.* 2016) na straně jedné a *Embiratermes neotenicus* (Syntermitinae) na straně druhé (Fougeyrollas *et al.* 2015).

V případě dvou zástupců z podčeledi Termitinae, kteří AQS využívají, však pro zevrubné studium ekologie či životního cyklu panují velmi ztížené podmínky. U druhu *Cavitermes tuberosus* je sice rozvinuta AQS strategie ve velmi markantní formě, jelikož počty neotenických samiček v harémech u nich dosahují přes šest set jedinců, jeho studium je však velmi složité kvůli způsobu jeho života. Ten spočívá především v obsazování prázdných hnízd druhu *Labiotermes labralis*, která jsou ovšem často v rozpadajícím se stavu a někdy i těžko dostupná, jelikož reprodukční centrum se někdy nalézá i hluboko v paždí listů vzrostlých palem rodu *Astrocaryum* spp., kde se nesnadno vyhledává i odděluje. Neotenické samičky jsou po zásahu rozptýleny ve větší části hnízda. Sociální struktura a věk kolonie se navíc těžko odečítá z velikosti hnízda, protože jde o hnízdo jiného stavitele (Fournier *et al.* 2016). Přesto je z pozorování více než dvou set kolonií *C. tuberosus* a několika desítek kolonií příbuzného zástupce sesterského rodu zřejmé, že k nahrazení primární královny dochází relativně pozdě a primární kolonie se mnohdy před nahrazením zakladatelky rojí. K samotnému nahrazení tedy dochází až poté, co kolonie alespoň částečně splní svou rozmnožovací úlohu (Fournier *et al.* 2016, Hellemans *et al.* 2016). Výzkum životního cyklu je velmi složitý i u dalšího AQS druhu vyšších termitů, kterým

je *Embiraermes neotenicus* z podčeledi Syntermitinae. Jeho kolonie totiž dosahují velikých rozměrů a hnízdo mnohdy váží desítky kilogramů a navíc je většinou částečně pod úrovní terénu. Rovněž v případě sběru disperzních jedinců a stanovování skutečné investice do biomasy při rojení je takový výzkum téměř nemožný.

Jinak je tomu u druhu *Silvestritermes minutus*, který z hlediska ekologie má typicky relativně malá a dobře ohraničená hnízda s velkou lokální abundancí. U těchto hnízd byla téměř vždy jistota, že při jeho sběru v terénu získáváme kompletní kolonii a tedy k téměř úplné jistotě, že sociální struktura byla určena správně. Tento druh tak byl pro nás tak naprosto ideálním modelem pro veškeré studie týkající se dynamiky sociální struktury AQS druhu. Díky detailnímu popisu životního cyklu jsme mohli zjistit, že u tohoto druhu je strategie AQS naprosto nezbytná a je v něm obligátně zakořeněna. Primární královna žije nejčastěji jen 12 až 18 měsíců, po kterých vždy dojde k jejímu nahrazení neotenickými královnami a teprve poté začne kolonie investovat do produkce disperzních jedinců. Neotenické královny sice nejsou tak početné jako u ostatních vyšších termitů s AQS (Fougeyrollas *et al.* 2015, Fournier *et al.* 2016, Hellemans *et al.* 2016), ale zato dosahují mnohem větší úrovně fyzogastrie a tedy plodnosti, přičemž v maximálním stavu může být fyzogastrie dokonce větší, než je tomu u královn primární. Tento fakt může být způsoben také tím, že zatímco u rodů z podčeledi Termitinae vznikají neotenické královny většinou z nymf třetího stadia, u druhu *Silvestritermes minutus* i jeho příbuzného druhu *Embiraermes neotenicus* vznikají z nymf čtvrtého stadia (Fougeyrollas *et al.* 2015). Zároveň je zajímavé připomenout, že druh *C. tuberosus* je nejčastěji obyvatelem cizích hnízd a ztratil schopnost budovat hnízda a královské komory. Prakticky žádná fyzogastrie neotenických královen kompenzovaná jejich vysokým počtem tak může být adaptací k vysoké mobilitě v cizím hnízdě a rozmnožování mimo královskou komoru (Fournier *et al.* 2016).

Díky genetické analýze se nám podařilo zjistit, že stejně jako u dalších AQS druhů, jsou sterilní kasty i alati produkováni pohlavní cestou, zatímco neotenické královny pomocí automiktické thelytokní partenogeneze. Genetická data přesvědčivě ukazují, že princip obnovy diploidie je automixis s centrální fúzí. Je tedy jiný než u rodu *Reticulitermes* (terminální fúze) (Matsuura *et al.* 2009) a u dvou druhů podčeledi Termitinae (duplikace gamet) (Fournier *et al.* 2016, Hellemans *et al.* 2016). Shoduje se naopak s pozorováním u *Embiraermes neotenicus*, tedy druhu příbuznému *S. minutus*, z podčeledi Syntermitinae (Fougeyrollas *et al.* 2015).

Tak jako je zjevně nezávislý původ AQS u tří zmíněných linií, jeví se rozmanitý i její adaptivní význam. Zatímco u ostatních linií tato strategie funguje především pro prodloužení životnosti již úspěšné kolonie pomocí neotenických královen, které mohou vznikat po libovolně dlouhou dobu dokud existuje kolonie a činí tak genotyp primární královny potenciálně nesmrtelným, u druhu *Silvestritermes minutus* má podle nás nahrazení zakladatelky odlišný význam. Namísto prodloužení

života kolonie slouží AQS k co nejrychlejšímu populačnímu růstu v co nejranějším stadiu životního cyklu, po kterém následuje nejčastěji jediný, masivní rozmnožovací proces kolonie, tedy produkce maximálního množství okřídlených jedinců. Zvýšená plodnost je využita nejen pro produkci alátů, ale samozřejmě také velkého množství dělníků pro péči o vyvíjející se nymfy a výstavbu velikých difuzních struktur, které vznikají před rojením a slouží především jako místo pro dozrávání nymf a alátů. Podobné struktury, zvané *pseudoécie*, jsou známé i u jiných termitů, kteří staví hnízda pro svá imaga (Grassé 1938). Přestože kolonie po tomto masivním vyrojení pravděpodobně zaniká, stihne efektivně rozšířit svou genetickou informaci pomocí tisíců imag vyslaných do okolí zakládat nové kolonie. Dovolíme si tedy na tomto místě navrhnout, že hlavní význam AQS u *S. minutus* spočívá právě v maximálním urychlení životního cyklu s cílem co nejrychlejšího, byť jediného, rojení. Tato strategie se jeví jako optimální s ohledem na zjevně nízké kompetiční a obranné schopnosti druhu, dané jeho malou velikostí a hnízdní biologii (relativně měkká nadzemní hnízda velmi blízko země), ve velmi kompetitivním prostředí tropického lesa se silným predačním tlakem.

Specializaci na krátký životní cyklus mimo jiné podporuje i fakt, že zatímco u ostatních druhů se strategií AQS bylo pozorováno vychýlení poměru pohlaví alátů ve prospěch samic, které nastává po nahrazení primárního krále králem neotenickým, u *S. minutus* pozorujeme na populační úrovni přesné poloviční rozložení u investičního poměru pohlaví a reálnou intervenci neotenických samců do reprodukce kolonie jsme nikdy nepozorovali. Jinými slovy, zatímco ostatní AQS druhy jsou spíše dlouhodobě žijící, *Silvestritermes minutus* má cyklus krátkodobý a nahrazení primárního krále sekundárním se takřikajíc nestihne.

Z našich pozorování tedy plyne, že tak jako došlo k evoluci AQS několikrát nezávisle na sobě (Dedeine *et al.* 2016, Fournier *et al.* 2016), mohou také jednotlivé linie termitů využívat výhody AQS odlišným způsobem. Společným jmenovatelem pro námi známé AQS druhy vyšších termitů však je jejich ekologický úspěch. Nesporný je kupříkladu u *C. tuberosus* ve srovnání s dalšími zástupci rodu *Cavitermes*. Zatímco čtyři další druhy (*C. parvicavus*, *C. rozeni*, *C. parmae*, *C. simplicinervis*) jsou výskytem omezeny jen na menší areály v Brazílii, tento druh se strategií AQS se vyskytuje na mnohem větším areálu pokrývajícím Brazílii, Venezuelu, Francouzskou Guyanu, Trinidad a Tobago (Emerson 1925, Constantino 2016). Je tedy velmi pravděpodobné, že je to právě AQS, která v kombinaci s oportunistickým způsobem života, stojí za širokým rozšířením tohoto druhu.

Rovněž v podčeledi Syntermitinae, z níž pocházejí další dva druhy se strategií AQS se setkáváme se stejným fenoménem jako u *C. tuberosus*. Rod *Embiratermes* obsahuje v současnosti 14 různých druhů, 13 z nich se vyskytuje na poměrně malých areálech, zatímco jediný druh se strategií AQS má oproti nim až nápadně velký areál pokrývajícím velkou část jihoamerického kontinentu od Brazílie až po Venezuelu (Constantino 2016). To, že k nahrazení primárních pohlavních jedinců dochází

pravděpodobně v raných fázích koloniálního vývoje, umožňuje kolonii větší reprodukční potenciál i stabilitu a pravděpodobně tak stojí za jeho neobyčejnou ekologickou úspěšností (Fougeyrollas *et al.* 2015). I geografické rozšíření druhu *Silvestritermes minutus* je oproti většině ostatních druhů tohoto rodu nápadně větší (viz kapitola 4.6, Emerson 1925, Constantino 2016). Zároveň z našich zkušeností můžeme říci, že jde o druh velmi rozšířený v širokém spektru biotopů, jelikož na všech 13ti lokalitách, které se podmínkami často lišily, bylo většinou jen otázkou několika minut, než jsme první hnízda tohoto druhu našli, což rozhodně neplatí o ostatních zkoumaných druzích. Na některých lokalitách se pak *S. minutus* vyznačoval skutečně obdivuhodnou abundancí a jeho jednotlivá hnízda mnohdy dělily pouhé jednotky metrů, což jej řadí mezi lokálně nejabundantnější druhy termitů.

Právě pro zjevnou úspěšnost AQS strategie je až podivuhodné, jak málo druhů jí ve svém životním cyklu používá. Dalo by se totiž očekávat, že bude na světě mnohem více rozšířena. Myslím si nicméně, že tento fakt je způsoben především tím, že většina druhů termitů žije skrytě a jejich zevrubnému studiu tak zatím nebylo dopřáno dostatečné pozornosti. Jelikož během posledních čtyř let byly ve Francouzské Guyaně na omezeném území čítajícím jen několik km² nalezeny hned čtyři druhy s touto smíšenou reprodukční strategií, lze očekávat, že i ve zbytku tropů a subtropů celého světa, kde žije cca 2000 druhů vyšších termitů, kteří jsou však pramálo prozkoumaní z hlediska své ekologie, bude tato strategie mnohem více rozšířena. Zejména pak v mimořádně zajímavých tropech Afriky, kde je největší diverzita termitů, a rovněž Austrálie, lze čekat nálezy nových smíšených strategií. Na obou těchto kontinentech žije i velká část druhů z podčeledi Termitinae (v nichž byly již dva AQS druhy nalezeny), tedy skupiny jež je mimořádně rozmanitá a druhově bohatá, přesto velmi málo prozkoumaná jak z fylogenetické a taxonomické, tak především biologické a ekologické stránky. Další druhy s touto strategií tak mohou čekat na své odhalení v mnoha dalších rodech.

6. Závěry

- Studium sociální struktury ukázalo, že kolonie procházejí tříletým životním cyklem, během kterého dochází k časnému nahrazení primární královny už v prvním roce kolonie sekundárnímí neotenickými královnami, které zvyšují reprodukční potenciál kolonie. Ta se v průběhu třetího roku vyrojí a pravděpodobně zanikne.
- Asymetrii v produkci okřídlených jedinců jsme u našeho druhu na populační úrovni nepozorovali, což však nerozporuje hypotézu o vlivu příbuzenského výběru na poměr pohlaví, protože narozdíl od ostatních AQS druhů jsme u *S. minutus* nepozorovali kolonie s inbrední reprodukční strukturou, při níž se s neotenickými královnami rozmnožuje neotenický král.
- Pohlavní dimorfismus okřídlených pohlavních jedinců se nám na základě morfometrické analýzy podařilo jednoznačně prokázat. Samičky jsou větší téměř ve všech měřených strukturách, největší rozdíl oproti samcům však jednoznačně vykazuje délka křídel. Oproti tomu u samců je delší tibia. Pohlavní dimorfismus nacházíme i v hmotnosti, kde je vyšší hmotnost samiček napříč koloniemi stabilním znakem.
- Zatímco primární královny vznikají po svatebním letu z okřídlených imag, která úspěšně založily kolonie, u neotenických královen se na základě přímých pozorování, dlouhodobých pokusů s oddělenými nymfami i morfometrické analýzy ukázalo, že pocházejí z nymf čtvrtého stadia, které jsou v kolonii přítomny celoročně a plní tak funkci případných zásobních pohlavních jedinců.
- Genetická analýza ukázala, že pohlavní cestou vznikají dělníci, vojáci a až na výjimky i okřídlení disperzní jedinci, zatímco neotenické královny vznikají téměř ve všech případech pomocí thelytokní partenogeneze. Jelikož se ukazuje vysoká míra zachování heterozygoty princip obnovy diploidie je s největší pravděpodobností automixie s centrální fúzí.
- Ve srovnání s AQS druhy z podčeledi Termitinae neslouží Asexual Queen Succession u *S. minutus* k prodloužení života kolonie, nýbrž k maximalizaci investice do okřídlených pohlavních jedinců pro pravděpodobně jediné rojení v rámci velmi krátkého životního cyklu kolonií.

7. Seznam použité literatury

- Atkinson, L. & Adams, E. S.** (1997). The origins and relatedness of multiple reproductives in colonies of the termite *Nasutitermes corniger*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 264: 1131-1136.
- Betzig, L.** (2014). Eusociality in history. *Human Nature*, 25: 80-99.
- Bourke, A. F. & Franks, N. R.** (1995). *Social Evolution in Ants*. Princeton University Press, Princeton.
- Bourguignon, T., Scheffrahn, R. H., Křeček, J., Nagy, Z. T., Sonet, G. & Roisin, Y.** (2010). Towards a revision of the Neotropical soldierless termites (Isoptera: Termitidae): redescription of the genus *Anoplotermes* and description of *Longustitermes*, gen. nov. *Invertebrate systematics*, 24: 357-370.
- Cagniant, H.** (1979). La parthénogenèse thélytoque et arrhenotoque chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonsc. (Hym. Form.), cycle biologique en élevage des colonies avec reine et des colonies sans reine. *Insectes Sociaux*, 26: 51-60.
- Constantino, R.** (2016). Termite Database (<http://164.41.140.9/catal/>).
- Costa-Leonardo, A. M., Barsotti, R. C. & Soares, H. X.** (1999). Morphology of the nymphoid replacement reproductives in the neotropical termite *Armitermes euamignathus* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). *Journal of Morphology*, 239: 131-141.
- Crespi, B. J.** (1994). Three conditions for the evolution of eusociality: are they sufficient? *Insectes Sociaux*, 41: 395-400.
- Darlington, J. P. E. C.** (1985). Multiple primary reproductives in the termite *Macrotermes michaelseni* (Sjostedt). In *Caste Differentiation in Social Insects* (pp. 187-200). Pergamon Press, Oxford.
- Darlington, J. P. E. C.** (1988). Multiple reproductives in nests of *Macrotermes herus* (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology*, 14: 347-351.
- Dedeine, F., Dupont, S., Guyot, S., Matsuura, K., Wang, C., Habibpour, B., ... & Luchetti, A.** (2016). Historical biogeography of *Reticulitermes* termites (Isoptera: Rhinotermitidae) inferred from analyses of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94: 778-790.
- Emerson, A. E.** (1925). The termites of Kartabo, Bartica District, British Guiana. *Zoologica*, 6: 291-459.
- Emerson, A. E.** (1933). Conditioned behavior among termites. *Psyche*, 40: 125-129.
- Engel, M. S.** (2011). Family-group names for termites (Isoptera), redux. *ZooKeys*, 148: 171-184.
- Fisher, R. A.** (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection: A Complete Variorum Edition*. Oxford University Press, Oxford.

- 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 of London B: Biological Science*, 282: 20150260.
- Fournier, D., Foucaud, J., Loiseau, A., Cros-Arteil, S., Jourdan, H., Orivel, J., ... & Estoup, A.** (2005). Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the invasive ant *Wasmannia auropunctata*. *Molecular Ecology Notes*, 5: 239-242.
- 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 of London B: Biological Science*, 283: 20160196.
- Funk, V. A., Berry, P., Alexander, S., Hollowell, T. H. & Kelloff, C. L.** (2007). *Checklist of the plants of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolivar, Delta Amacuro; Guyana, Surinam, French Guiana)*. National Museum of Natural History, Washington.
- Gay, F. J.** (1971). The Termitinae (Isoptera) of temperate Australia. *Australian Journal of Zoology*, 19: 1-36.
- Giorgini, M., Bernardo, U., Monti, M. M., Nappo, A. G. & Gebiola, M.** (2010). *Rickettsia* symbionts cause parthenogenetic reproduction in the parasitoid wasp *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2589-2599.
- Grassé, P. P.** (1938). Les faux nids ou pseudoécies, constructions probables des *Anoplotermes*. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 43: 195-196.
- Gruber, M. A. M.** (2012). *Genetic Factors Associated With Variation in Abundance of the Invasive Yellow Crazy Ant (Anoplolepis gracilipes)* (Doctoral dissertation). Victoria University of Wellington.
- Gruber, M. A. M., Hoffmann, B. D., Ritchie, P. A. & Lester, P. J.** (2013). The conundrum of the yellow crazy ant (*Anoplolepis gracilipes*) reproductive mode: no evidence for dependent lineage genetic caste determination. *Insectes Sociaux*, 60: 135-145.
- Haifig, I., Vargo, E. L., Labadie, P. & Costa-Leonardo, A. M.** (2016). Unrelated secondary reproductives in the neotropical termite *Silvestritermes euamignathus* (Isoptera: Termitidae). *The Science of Nature*, 103: 1-8.
- Hamilton, W. D.** (1964). The genetical evolution of social behaviour. II. *Journal of Theoretical Biology*, 7: 17-52.
- Hanus, R.** (2008). *Biology of the Soldier Caste in the Termite Genus Prorhinotermes (Isoptera: Rhinotermitidae)* (Doctoral dissertation). Charles University in Prague.
- Hanus, R. & Šobotník, J.** (2004). Ontogeneze termitů (Isoptera) v kontextu ekologických strategií. *Biologické listy*, 69: 29-57.
- Hanus, R., Fougeyrollas, R., Dolejšová, K., Sillam-Dussès, D., Poteaux, C., Roisin, Y. & Roy, V.** (2014). Asexual queen succession in the Neotropical higher termite *Embiratermes neotenicus*. XVII Congress of the International Union for the Study of Social Insects, 13.-17.2014, Cairns.

- Hanus, R., Šobotník, J., Valterová, I. & Lukáš, J.** (2006). The ontogeny of soldiers in *Prorhinotermes simplex* (Isoptera, Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux*, 53: 249-257.
- Hartke, T. R. & Rosengaus, R. B.** (2013). Costs of pleometrosis in a polygamous termite. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 280: 20122563.
- Hellemans, S.** (2015). *Stratégies Reproductives et Sex-Ratio chez le Terme Cavitermes tuberosus (Emerson, 1925)* (Master's thesis). Université Libre de Bruxelles.
- Hellemans, S., Fournier, D., Hanus, R. & Roisin, Y.** (2016). Investigating key traits for AQS emergence in Termitinae. European IUSSI Conference, 8.-11.8.2016, Helsinki.
- Holmgren, N.** (1906). Studien über südamerikanische Termiten. *Zoologische Jahrbücher Abteilungen Systematik*, 23: 521-676.
- Huigens, M. E., De Almeida, R. P., Boons, P. A. H., Luck, R. F. & Stouthamer, R.** (2004). Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing wolbachia in trichogramma wasps. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271: 509-515.
- Husseneder, C., Grace, J. K., Messenger, M. T., Vargo, E. L. & Su, N. Y.** (2003). Describing the spatial and social organization of Formosan subterranean termite colonies in Armstrong Park, New Orleans. *Sociobiology*, 41: 61-66.
- Chapman, T. W., Crespi, B. J. & Perry, S. P.** (2008). The evolutionary ecology of eusociality in Australian gall thrips: a 'model clades' approach. In *Ecology of Social Evolution* (pp. 57-83). Springer Berlin Heidelberg.
- Inoue, T., Kitade, O., Yoshimura, T. & Yamaoka, I.** (2000). Symbiotic associations with protists. In *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology* (pp. 275-288). Springer Netherlands, Dordrecht.
- Inward, D. J., Vogler, A. P. & Eggleton, P.** (2007). A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 953-967.
- Kahn, F.** (2008). El género *Astrocaryum* (Arecaceae). *Revista Peruana de Biología*, 15: 31-48.
- Kambhampati, S. & Eggleton, P.** (2000). Taxonomy and phylogeny of termites. In *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology* (pp. 1-23). Springer Netherlands, Dordrecht.
- Kawatsu, K. & Matsuura, K.** (2013). Preadaptation for parthenogenetic colony foundation in subterranean termites *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Ethology*, 31: 123-128.
- Keller, L.** (1998). Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites. *Insectes Sociaux*, 45: 235-246.
- Kent, D. S. & Simpson, J. A.** (1992). Eusociality in the beetle *Austroplatypus incompertus* (Coleoptera: Curculionidae). *Naturwissenschaften*, 79: 86-87.

- Kirkendall, L. R. & Normark, B. B.** (2003). Parthenogenesis. In *Encyclopedia of Insects* (pp. 851-856). Academic Press.
- Kobayashi, K., Hasegawa, E., Yamamoto, Y., Kawatsu, K., Vargo, E. L., Yoshimura, J. & Matsuura, K.** (2013). Sex ratio biases in termites provide evidence for kin selection. *Nature Communications*, 4: 2048.
- Kol-Maimon, H., Mendel, Z., Franco, J. C. & Ghanim, M.** (2014). Paternal inheritance in mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *Naturwissenschaften*, 101: 791-802.
- Krishna, K., Grimaldi, D. A., Krishna, V. & Engel, M. S.** (2013). Treatise on the Isoptera of the World: Volume 4 Termitidae (Part One). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 377: 973-1495.
- Kyjaková, P., Roy, V., Jirošová, A., Krasulová, J., Dolejšová, K., Křivánek, J., Hadravová, R., Pohl, R., Roisin, Y., Sillam-Dussès, D. & Hanus, R.** (in press). Coevolution of mechanical and chemical defences in snapping soldiers of Neotropical termites (Termitidae: Termitinae). *Zoological Journal of the Linnean Society*.
- Leeson, C. R. & Leeson, T. S.** (1970). Staining methods for sections of epon-embedded tissues for light microscopy. *Canadian Journal of Zoology*, 48: 189-191.
- Li, Z. Q., Liu, B. R., Zeng, W. H., Xiao, W. L., Li, Q. J. & Zhong, J. H.** (2013). Character of cellulase activity in the guts of flagellate-free termites with different feeding habits. *Journal of Insect Science*, 13: 37.
- Liebig, J., Eliyahu, D. & Brent, C. S.** (2009). Cuticular hydrocarbon profiles indicate reproductive status in the termite *Zootermopsis nevadensis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63: 1799-1807.
- 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.
- Lüscher, M.** (1961). Social control of polymorphism in termites. In *Insect Polymorphism* (pp. 57-67). Royal Entomological Society, London.
- Maeterlinck, M.** (1929). *Život vřekazů*. F. Topič, Praha.
- Matsuura, K.** (2010). Sexual and asexual reproduction in termites. In *Biology of Termites: A Modern Synthesis* (pp. 255-277). Springer Netherlands, Dordrecht.
- Matsuura, K.** (2012). Multifunctional queen pheromone and maintenance of reproductive harmony in termite colonies. *Journal of Chemical Ecology*, 38: 746-754.
- Matsuura, K. & Nishida, T.** (2001). Comparison of colony foundation success between sexual pairs and female asexual units in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Population Ecology*, 43: 119-124.
- Matsuura, K., Fujimoto, M. & Goka, K.** (2004). Sexual and asexual colony foundation and the mechanism of facultative parthenogenesis in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera, Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux*, 51: 325-332.

- Matsuura, K., Himuro, C., Yokoi, T., Yamamoto, Y., Vargo, E. L. & Keller, L.** (2010). Identification of a pheromone regulating caste differentiation in termites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 12963-12968.
- Matsuura, K., Vargo, E. L., Kawatsu, K., Labadie, P. E., Nakano, H., Yashiro, T. & Tsuji, K.** (2009). Queen succession through asexual reproduction in termites. *Science*, 323: 1687-1687.
- Maynard Smith, J.** (1971). The origin and maintenance of sex. In *Group Selection* (pp. 163-175). Aldine-Atherton, Chicago.
- Maynard Smith, J.** (1978). *The Evolution of Sex*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mayr, E.** (1963). *Animal species and evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- Mill, A. E.** (1983). Observations on Brazilian termite alate swarms and some structures used in the dispersal of reproductives (Isoptera: Termitidae). *Journal of Natural History*, 17: 309-320.
- Miller, E. M.** (1942). Problem of castes and caste differentiation in *Prorhinotermes simplex* (Hagen). Bulletin of the University of Miami, 15: 1-27.
- Miura, T.** (2004). Proximate mechanisms and evolution of caste polyphenism in social insects: From sociality to genes. *Ecological Research*, 19: 141-148.
- Moran, N. A.** (1992). The evolution of aphid life cycles. *Annual Review of Entomology*, 37: 321-348.
- Moura, F. M. S., Vasconcellos, A., Silva, N. B. & Bandeira, A. G.** (2011). Caste development systems of the Neotropical termite *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae). *Insectes Sociaux*, 58: 169-175.
- Myles, T. G.** (1986). Reproductive soldiers in the Termopsidae (Isoptera). *The Pan-Pacific Entomologist*, 62: 293-299.
- Myles, T. G.** (1999). Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution. *Sociobiology*, 33: 1-43.
- Myles, T. G. & Chang, F.** (1984). The caste system and caste mechanisms of *Neotermes connexus* (Isoptera: Kalotermitidae). *Sociobiology*, 9: 163-319.
- Nagin, R.** (1972). Caste determination in *Neotermes jouteli* (Banks). *Insectes Sociaux*, 19: 39-61.
- Nalepa, C. A. & Bandi, C.** (2000). Characterizing the ancestors: paedomorphosis and termite evolution. In *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology* (pp. 53-75). Springer Netherlands, Dordrecht.
- Neoh, K. B.** (2010). *Development, Swarming, Colony Orphaning and Fly Parasitism in Subterranean Termites, Macrotermes Gilvus (Hagen) and Macrotermes carbonarius (Hagen)(Blattodea: Termitidae)* (Doctoral dissertation). Universiti Sains Malaysia.
- Noirot, C.** (1969). Formation of castes in the higher termites. In *Biology of termites 1* (pp. 311-350), Academic Press, New York.

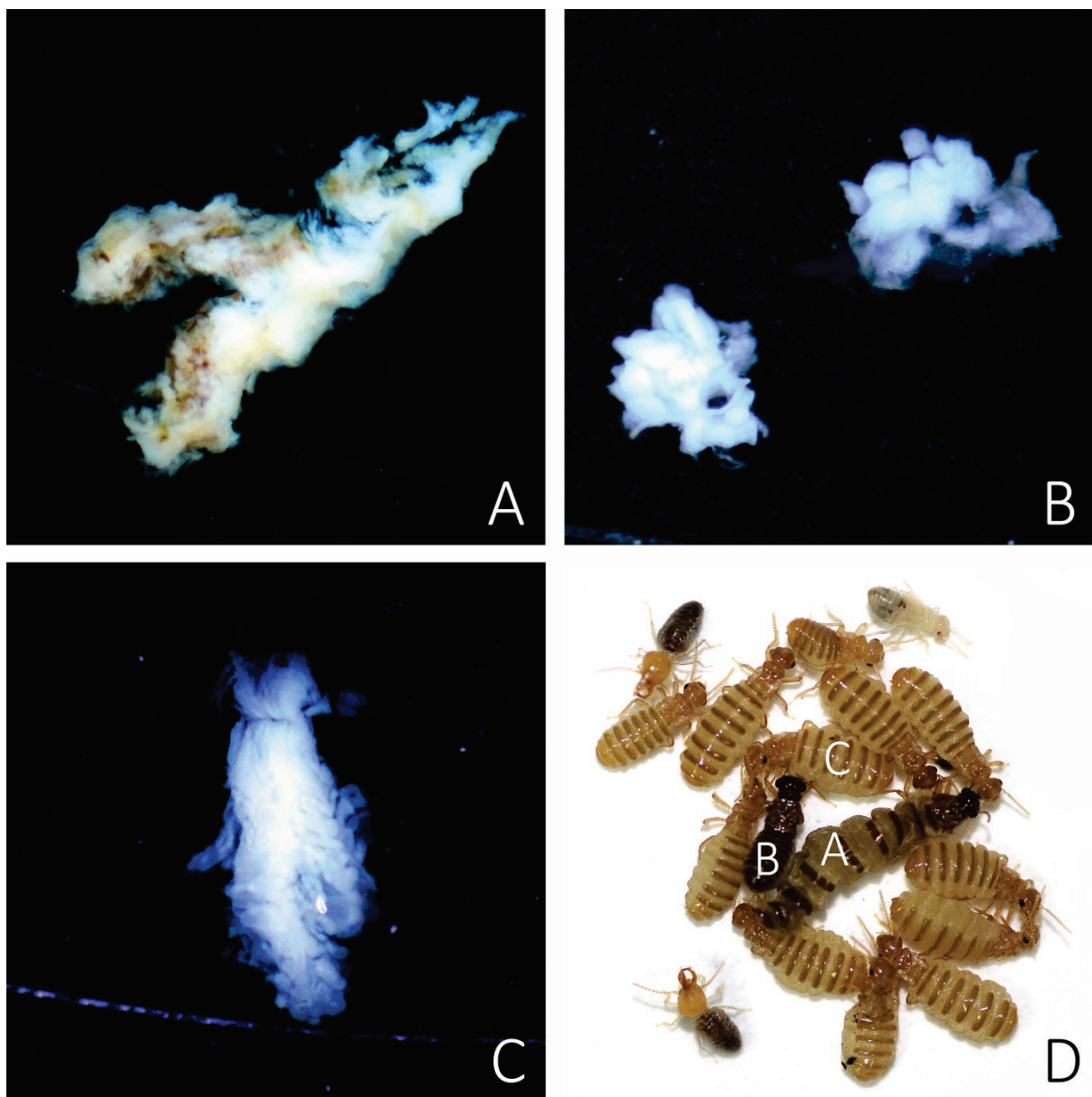
- Noirot, C.** (1985). Differentiation of reproductives in higher termites. In *Caste Differentiation in Social Insects* (pp. 177-186). Pergamon Press, Oxford.
- Normark, B. B.** (2003). The evolution of alternative genetic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 48: 397-414.
- Ohkawara, K., Nakayama, M., Satoh, A., Trindl, A. & Heinze, J.** (2006). Clonal reproduction and genetic caste differences in a queen-polymorphic ant, *Vollenhovia emeryi*. *Biology Letters*, 2: 359-363.
- Ohkuma, M., Noda, S., Hongoh, Y., Nalepa, C. A. & Inoue, T.** (2009). Inheritance and diversification of symbiotic trichonymphid flagellates from a common ancestor of termites and the cockroach *Cryptocercus*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276: 239-245.
- Oldroyd, B. P., Allsopp, M. H., Gloag, R. S., Lim, J., Jordan, L. A. & Beekman, M.** (2008). Thelytokous parthenogenesis in unmated queen honeybees (*Apis mellifera capensis*): central fusion and high recombination rates. *Genetics*, 180: 359-366.
- Parmentier, D. & Roisin, Y.** (2003). Caste morphology and development in *Termitogeton* nr. *planus* (Insecta, Isoptera, Rhinotermitidae). *Journal of Morphology*, 255: 69-79.
- Pearcy, M., Clémencet, J., Chameron, S., Aron, S. & Doums, C.** (2004). Characterization of nuclear DNA microsatellite markers in the ant *Cataglyphis cursor*. *Molecular Ecology Notes*, 4: 642-644.
- Pearcy, M., Goodisman, M. A. & Keller, L.** (2011). Sib mating without inbreeding in the longhorn crazy ant. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 278: 2677-2681.
- Pearcy, M., Hardy, O. & Aron, S.** (2006). Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant. *Heredity*, 96: 377-382.
- Roisin, Y.** (1990). Queen replacement in the termite *Microcerotermes papuanus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 56: 83-90.
- Roisin, Y.** (1999). Philopatric reproduction, a prime mover in the evolution of termite sociality? *Insectes Sociaux*, 46: 297-305.
- Roisin, Y.** (2000). Diversity and evolution of caste patterns. In *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology* (pp. 95-119). Springer Netherlands, Dordrecht.
- Roisin, Y. & Korb, J.** (2011). Social organisation and the status of workers in termites. In *Biology of Termites: A Modern Synthesis* (pp. 133-164). Springer Netherlands, Dordrecht.
- Roisin, Y. & Pasteels, J. M.** (1985). A new *Nasutitermes* species from New Guinea (Isoptera: Termitidae). *Indo-Malayan Zoology*, 2: 325-330.
- Roisin, Y. & Pasteels, J. M.** (1986). Reproductive mechanisms in termites: Polycalism and polygyny in *Nasutitermes polygynus* and *N. costalis*. *Insectes Sociaux*, 33: 149-167.
- Roisin, Y. & Pasteels, J. M.** (1987). Caste developmental potentialities in the termite *Nasutitermes novarumhebridarum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 44: 277-287.

- Rupf, T. & Roisin, Y.** (2008). Coming out of the woods: do termites need a specialized worker caste to search for new food sources? *Naturwissenschaften*, 95: 811-819.
- Scali, V., Passamonti, M., Marescalchi, O. & Mantovani, B.** (2003). Linkage between sexual and asexual lineages: genome evolution in *Bacillus* stick insects. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 137-150.
- Sewell, J. J. & Watson, J. A. L.** (1981). Developmental pathways in Australian species of *Kaloterme*s Hagen (Isoptera). *Sociobiology*, 6: 243-342.
- Schmitt-Wagner, D., Friedrich, M. W., Wagner, B. & Brune, A.** (2003). Phylogenetic diversity, abundance, and axial distribution of bacteria in the intestinal tract of two soil-feeding termites (*Cubiterme*s spp.). *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6007-6017.
- Schlupp, I.** (2005). The evolutionary ecology of gynogenesis. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36: 399-417.
- Schön, I., Martens, K. & Van Dijk, P. (Eds.).** (2009). *Lost sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*. Springer Science & Business Media, Dordrecht.
- Sieber, R.** (1985). Replacement of reproductives in Macrotermitinae (Isoptera, Termitidae). In *Caste Differentiation in Social Insects* (pp. 201-207). Pergamon Press, Oxford.
- Stansly, P. A. & Korman, A. K.** (1993). Parthenogenic development in *Velociterme*s spp. (Isoptera: Nasutiterminae). *Sociobiology*, 23: 13-24.
- Stille, B. & Dävring, L.** (1980). Meiosis and reproductive strategy in the parthenogenetic gall wasp *Diplolepis rosae* (L.) (Hymenoptera, Cynipidae). *Hereditas*, 92: 353-362.
- Strand, M. R. & Grbić, M.** (1997). The development and evolution of polyembryonic insects. *Current Topics in Developmental Biology*, 35: 121-159.
- Thorne, B. L.** (1983). Alate production and sex ratio in colonies of the Neotropical termite *Nasutiterme*s *corniger* (Isoptera; Termitidae). *Oecologia*, 58: 103-109.
- Thorne, B. L.** (1996). Termite terminology. *Sociobiology*, 28: 253-263.
- Thorne, B. L., Breisch, N. L. & Muscedere, M. L.** (2003). Evolution of eusociality and the soldier caste in termites: influence of intraspecific competition and accelerated inheritance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 12808-12813.
- Thorne, B. L. & Noirot, C.** (1982). Ergatoid reproductives in *Nasutiterme*s *corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 11: 213-226.
- Thorne, B. L., Breisch, N. L. & Haverty, M. I.** (2002). Longevity of kings and queens and first time of production of fertile progeny in dampwood termite (Isoptera; Termopsidae; *Zootermopsis*) colonies with different reproductive structures. *Journal of Animal Ecology*, 71: 1030-1041.
- Thorne, B. L., Grimaldi, D. A. & Krishna, K.** (2000). Early fossil history of the termites. In *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology* (pp. 77-93). Springer Netherlands, Dordrecht.

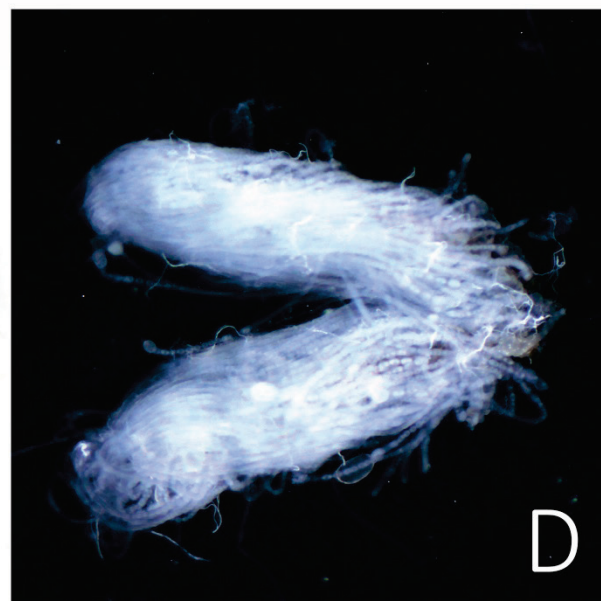
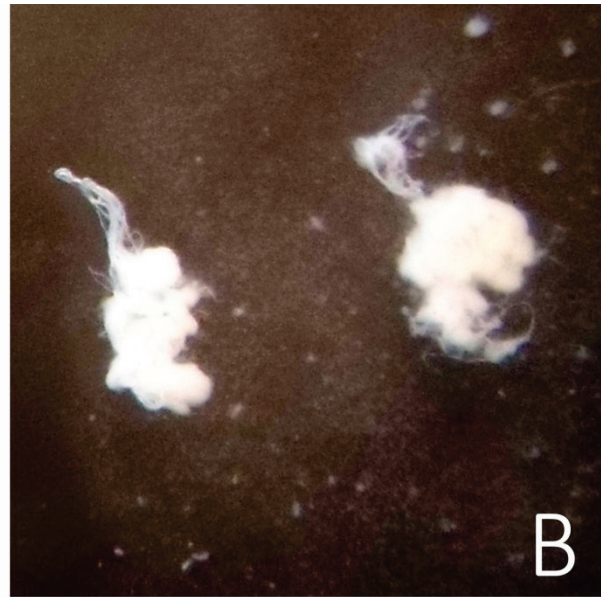
- Tian, L., & Zhou, X.** (2014). The soldiers in societies: defense, regulation, and evolution. *International Journal of Biological Sciences*, 10: 296.
- Tojo, K., Sekiné, K. & Matsumoto, A.** (2006). Reproductive mode of the geographic parthenogenetic mayfly *Ephoron shigae*, with findings from some new localities (Insecta: Ephemeroptera, Polymitaarcyidae). *Limnology*, 7: 31-39.
- Vargo, E. L. & Husseneder, C.** (2010). Genetic structure of termite colonies and populations. In *Biology of Termites: A Modern Synthesis* (pp. 321-347). Springer Netherlands, Dordrecht.
- Vargo, E. L., Labadie, P. E. & Matsuura, K.** (2012). Asexual queen succession in the subterranean termite *Reticulitermes virginicus*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279: 813-819.
- Watanabe, D., Gotoh, H., Miura, T. & Maekawa, K.** (2014). Social interactions affecting caste development through physiological actions in termites. *Frontiers in Physiology*, 5: 127.
- Watson, J. A. L. & Abbey, H. M.** (1985). Development of neotenicis in *Mastotermes darwiniensis* Froggatt: an alternative strategy. In *Caste Differentiation in Social Insects* (pp. 107-124). Pergamon Press Oxford
- Weil, T., Hoffmann, K., Kroiss, J., Strohm, E., & Korb, J.** (2009). Scent of a queen-cuticular hydrocarbons specific for female reproductives in lower termites. *Naturwissenschaften*, 96: 315-319.
- Wenseleers, T., & Van Oystaeyen, A.** (2011). Unusual modes of reproduction in social insects: shedding light on the evolutionary paradox of sex. *BioEssays*, 33: 927-937.
- Williams, G. C.** (1975). *Sex and Evolution*. Princeton University Press, New Jersey.
- Yashiro, T., & Matsuura, K.** (2014). Termite queens close the sperm gates of eggs to switch from sexual to asexual reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 17212-17217.

8. Podpůrná data

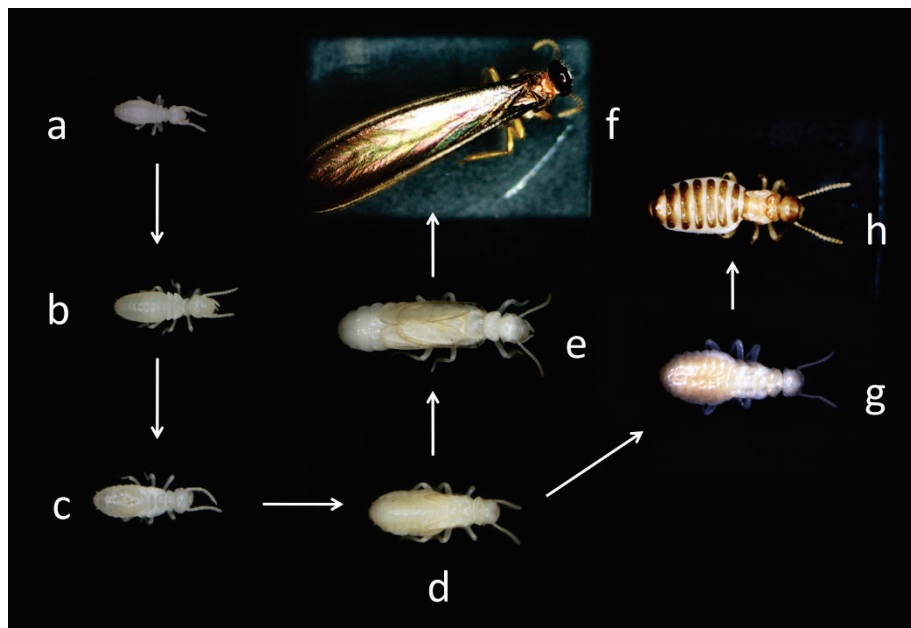




Obr. S2. Pohlavní orgány primárních pohlavních jedinců a mladé neotenické královny v raně sekundární kolonii G14-205 v průběhu nahrazování primární královny harémem neotenických samic přibližně jeden a půl roku po založení kolonie, tedy v říjnu 2014. **A.** Atrofovaná ovaria primární královny. **B.** Dobře vyvinuté testes primárního krále bez známky snížené funkčnosti. **C.** Funkční ovaria mladé neotenické královny. **D.** Fotografie pohlavních jedinců rané sekundární kolonie G14-205 před pitvou s označením jedinců, jejichž gonády jsou vyobrazeny na fotografiích A–C. **A,** primární královna; **B,** primární král; **C,** neotenická samička.



Obr. S3. Ovaria samic různého věku a původu. **A.** Okřídlená samice před svatebním letem. **B.** Její vaječníky. **C.** Neotenická královna v téměř maximálním stupni fyzogastrie. **D.** Její vaječníky.



Obr. S4. Fotografická evidence nymfální vývojové řady ve stejném měřítku. **a**, nymfa 1. stadia; **b**, nymfa 2. stadia; **c**, nymfa 3. stadia; **d**, nymfa 4. stadia; **e**, nymfa 5. stadia; **f**, okřídlené imago; **g**, čerstvě svlečená neotenická královna; **h**, pigmentovaná neotenická královna.

Tabulka S1. Parametry 85 hnízd použitých pro rekonstrukci životního cyklu *S. minutus*, tříděné dle sociální struktury. Kategorizace sociálních struktur je uvedena v kapitole 4.1.3.

Číslo kolonie	Délka (cm)	Šířka (cm)	Výška (cm)	Hmotnost (kg)	Objem (cm ³)	Sociální struktura
G15-267	5	5	4	0,05	52	A
G15-288	9	5	4		94	A
G15-01	19	6	5	0,75	298	B
G15-21	13	15	5		510	B
G15-44	23	7	8		674	B
G15-54	5	4	4		42	B
G15-91	7	12	7	0,2	308	B
G15-93	21	9	10		988	B
G16-37	8	9	7		264	B
G16-50	4	4	5	0,05	42	B
G16-54	12	6	6		226	B
G16-56	10	9	9		424	B
G16-58	10	12	11		690	B
G14-205	18	10	9		847	C
G14-206	13	14	15		1428	C
G14-227	14	9	10		659	C
G14-233	15	15	13		1530	C
G14-263	10	17	12		1067	C
G14-304	17	13	11		1271	C
G14-309	14	12	11		967	C
G14-311	10	14	14		1025	C
G15-220	9	16	10	0,15	753	C
G15-255	7	8	8		234	C
G15-263	14	12	9	0,35	790,8	C
G15-296	10	11	12		690,4	C
G15-103	18	14	13	0,95	1713	D
G15-107	15	13	10	0,55	1020	D
G15-109	20	22	12	0,95	2761	D
G15-111	22	24	10	1,25	2761	D
G15-119	17	10	13	0,6	1156	D
G15-45	24	15	17		3201	D
G15-47	67	24	4		3364	D
G15-59	21	11	10	0,95	1208	D
G15-69	28	15	10	0,35	2197	D
G15-75	27	15	14		2965	D
G15-79	9	31	30	2,45	4378	D
G15-89	25	10	10	0,75	1308	D
G16-02	18	12	16	0,9	1807	D
G16-08	16	10	10	0,4	837	D
G16-09	33	7	10	0,8	1208	D
G16-24	22	18	19		3935	D
G16-48	10	18	16		1506	D
G16-66	15	8	16		1004	D
G16-88	13	11	11		823	D
G14-203	14	15	14		1538	E
G14-204	13	14	11		1047	E
G14-209	20	25	25		6538	E
G14-221	16	15	13		1632	E
G14-242	19	19	10		1888	E
G14-303	26	15	19		3875	E
G15-235	31	17	20		5512	E
G15-280	22	19	21	1,35	4591	E
G15-286	26	16	18		3916	E
G15-291	20	18	12	0,5	2259	E
G15-293	35	10	15		2746	E
G14-204	48	15	15	0,7	5648	F
G15-05	14	17	18	1,05	2241	F
G15-123	20	16	13	0,7	2176	F
G15-15	21	40	35	1,85	15376	F
G15-17	18	9	10	0,9	847	F
G15-27	40	31	20		12970	F
G15-31	20	26	26		7071	F
G15-33	18	6	8	0,35	452	F
G15-39	22	28	26	0,9	8376	F
G15-73	17	13	13		1503	F
G15-83	14	15	10	0,25	1098	F
G16-18	35	26	29		13802	F
G16-20	28	26	32		12184	F
G16-42	20	29	18	1,35	5460	F
G16-60	28	31	26		11803	F
G16-70	17	20	28	0,85	4979	F
G16-80	110	15	15		12944	F
G16-82	40	23	29		13954	F
G16-84	28	23	34		11452	F
G16-86	22	24	27		7456	F
G15-201	42	30	26		17133	G
G15-203	28	24	27		9489	G
G15-205	51	20	26		13870	G
G15-217	30	7	9		988	G
G15-226	26	20	17	0,4	4623	G
G15-229	34	22	31	0,9	12127	G
G15-231	16	10	7	0,2	586	G
G15-233	22	18	15		3107	G
G15-253	39	36	28		20560	G
G15-271	50	21	35		19220	G

Tabulka S2. Počty nymf, alátů a funkčních pohlavních jedinců v koloniích v reprodukčním období.

Číslo kolonie	Primární královna	Primární král	Neotenická královna fyzogastrická	Neotenická královna mladá	Neotenický král	Alát ♀	Alát ♂	Nymfa 5. stadia ♀	Nymfa 5. stadia ♂	Nymfa 4. stadia ♀	Nymfa 4. stadia ♂	Nymfa 3. stadia ♀	Nymfa 3. stadia ♂	Nymfa 2. stadia	Nymfy + aláti ♀	Nymfy + aláti ♂	Všichni jedinci
G14-204						247	261								247	261	508
G15-01	1	1						8						1	8	0	11
G15-05								725	722	39	35				764	757	1521
G15-08								57	56	33	21				90	77	167
G15-101								108	84						108	84	192
G15-103			2					11		27				6	38	0	46
G15-111			10					19	17	16	23		10	35	40	95	
G15-119				2											2	0	4
G15-123				13	1	607	1093			1					608	1093	1715
G15-15								507	424	6					513	424	937
G15-17								69	44	8					77	44	121
G15-21	1	1						4		1					5	0	7
G15-27			1					491	422	1					492	422	915
G15-31								1012	1348						1012	1348	2360
G15-33								103	70	5	4				108	74	182
G15-39						315	346	1	3						316	349	665
G15-41		1	7	2				15	16	4	4				19	20	49
G15-45				2				37	57	2	3				39	60	101
G15-47		1	21	4				4	1						4	1	31
G15-56								420	393	2					422	393	815
G15-59		1	10	1				10							10	0	22
G15-69		1	8					8							8	0	17
G15-70			4					7	101	125	1				102	132	238
G15-73								79	64						79	64	143
G15-75		1	8					2	4						2	4	15
G15-79		1	5					883	1153	11	1				894	1154	2054
G15-83								76	30						76	30	106
G15-89		1	12					23	1	6		2			29	1	45
G15-91	1	1	1					6		3					9	0	12
G15-93	1	1						6		1		2			7	0	11
G16-02		1	11					9		2					11	0	23
G16-08		1	6	2				12		1					13	0	22
G16-09		1	4					8		7	1				15	1	21
G16-18								125	49	233	251	2			360	300	660
G16-20						6	8	167	90	188	368				361	466	827
G16-31								1	105	95					105	96	201
G16-38		1	32			35	8	1102	917	286	390	1			1424	1315	2772
G16-42						2078	2007	238	511	2	1				2318	2519	4837
G16-48		1	20					8	14	1			1		9	15	45
G16-56	1	1								5		2			7	0	9
G16-58	1	1								4					4	0	6
G16-70						1152	1332	114	264	4	1	1			1271	1597	2868
G16-80						51	55								51	55	106

Tabulka S3. Počty nymf a funkčních pohlavních jedinců v koloniích v maturačním období.

Číslo kolonie	Primární královna	Primární král	Neotenická královna fyzogastrická	Neotenická královna mladá	Neotenický král	Nymfa 5. stadia ♀	Nymfa 5. stadia ♂	Nymfa 4. stadia ♀	Nymfa 4. stadia ♂	Nymfa 3. stadia ♀	Nymfa 3. stadia ♂	Nymfa 2. stadia	Nymfy celkem ♀	Nymfy celkem ♂	Všichni jedinci
G14-203		1	11					8	6		3		8	9	29
G14-204			5	3				9					9	0	17
G14-205	1	1	10	4				8	1	1		1	9	1	27
G14-209		1	22	3				4		2	1		6	1	33
G14-221			8	2				10		2			12	0	22
G14-227	1	1		2				3		2			5	0	9
G14-233		1	11					1		2		3	3	0	18
G14-234				1				6	1	1	1		7	2	10
G14-263				5				27		7			34	0	39
G14-277								8	12	2	1		10	13	23
G14-303			5					2	1				2	1	8
G14-304		1	15	5				4		6		3	10	0	34
G14-306								5		5		3	10	0	13
G14-309		1	11					5					5	0	17
G14-311		1	20					11					11	0	32
G15-202				1				3					3	0	4
G15-204								4					4	0	4
G15-208										2			2	0	2
G15-210								1		1			2	0	2
G15-212			18		1			2		2			4	0	23
G15-216				1				12		1			13	0	14
G15-217								3		2			5	0	5
G15-219								1	2				1	2	3
G15-220								8		1			9	0	9
G15-221						5	10	5	6	2			12	16	28
G15-225								2					2	0	2
G15-226								2					2	0	2
G15-228								4		1			5	0	5
G15-229				1				16		6			22	0	23
G15-232		1	14	5				9		1			10	0	30
G15-235		1	4	5				2					2	0	12
G15-236		1	11	1				5		5			10	0	23
G15-237				1				4					4	0	5
G15-239								6		3			9	0	9
G15-243				1				6					6	0	7
G15-253		1	6					17		1			18	0	25
G15-263				2				2		1			3	0	5
G15-265								3		1			4	0	4
G15-269								1		1			2	0	2
G15-279				1				4		4			8	0	9
G15-280								20					20	0	20
G15-281				1				5		1			6	0	7
G15-283				3				9		1			10	0	13
G15-291		1	9	9				103		3		2	106	0	127
G15-293		1	4					11					11	0	16

Tabulka S4. Suchá hmotnost alátů (mg), použitá pro výpočet investičního poměru pohlaví.

kolonie										
G15 - 123		G16 - 70		G15-39		G14-204		G16-42		
♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
0,86	0,746	1,221	0,937	1,237	1,071	1,096	1,14	0,99	0,93	
0,809	0,72	1,219	1,206	1,245	1,191	1,118	1,119	0,979	0,929	
0,762	0,625	1,023	0,996	1,126	1,047	1,159	0,982	1,078	0,9	
0,813	0,648	1,14	0,862	1,371	0,946	1,155	0,948	1,015	0,973	
0,809	0,588	1,094	0,89	1,256	1,135	0,961	0,814	1,095	0,818	
0,869	0,686	1,253	0,96	1,149	1,119	1,231	1,199	1,029	1,098	
0,761	0,677	1,18	0,888	1,295	1,181	1,164	0,867	1,167	1,014	
0,737	0,692	0,998	1,095	1,201	1,145	1,128	0,824	1,012	0,951	
0,764	0,695	1,083	1,064	1,461	1,198	1,278	1,063	1,102	0,981	
0,825	0,684	1,184	0,917	1,492	1,127	1,058	0,965	1,117	0,979	
0,788	0,728	1,021	0,879	1,329	1,201	0,985	1,038	1,038	0,837	
0,813	0,67	1,008	1,022	1,267	1,257	1,336	1,065	1,01	0,895	
0,862	0,728	1,174	0,963	1,457	1,193	1,255	1,02	1,22	1,056	
0,86	0,757	1,222	1,098	1,326	1,22	1,21	0,82	1,072	0,947	
0,805	0,76	1,221	0,922	1,244	1,149	0,959	1,108	1,059	0,913	
0,74	0,744	1,002	0,954	1,309	1,028	1,163	1,058	1,127	0,996	
0,822	0,696	1,26	1,02	1,316	1,012	1,047	0,921	1,131	0,845	
0,813	0,739	1,138	1,001	1,428	1,057	1,096	1,046	1,273	1,103	
0,811	0,747	0,894	1,143	1,095	0,998	1,307	1,039	1,136	0,879	
0,816	0,706	1,225	0,996	1,224	1,051	1,164	0,964	1,105	0,941	
0,787	0,649	1,128	0,991	1,291	1,116	1,144	1,000	1,088	0,949	průměr
0,816	0,668	0,106	0,093	0,111	0,085	0,108	0,110	0,076	0,079	sm. odch.
0,847	0,721		1,1386		1,1569		1,1435		1,1459	poměr
0,839	0,753									
0,856	0,665									
0,84	0,677									
0,743	0,71									
0,878	0,716									
0,734	0,734									
0,776	0,691									
0,809	0,701	průměr								
0,042	0,041	sm. odch.								
	1,1539	poměr								

Tabulka S5. Délka morfologických znaků použitých pro morfometrickou analýzu (mm).

Kód vzorku	Kolonie	Stadium	Pohlaví	Šířka hlavy	Šířka pronota	Délka pronota	Délka křídel/základů celková	Délka křídel/základů od záhybu mesonota	Délka tibie	Délka růstové zóny tykadla
M1	G15-400	NY1	-	0,478	0,398	0,162	0,086	0,000	0,368	0,111
M2	G15-400	NY1	-	0,489	0,375	0,130	0,088	0,000	0,352	0,118
M3	G15-400	NY1	-	0,490	0,369	0,116	0,086	0,000	0,356	0,109
M4	G15-400	NY1	-	0,468	0,365	0,123	0,076	0,000	0,334	0,102
F1	G15-41	NY2	-	0,551	0,446	0,228	0,240	0,005	0,461	0,141
A1	G15-41	NY3	+	0,654	0,593	0,250	0,534	0,255	0,625	0,171
A3	G15-41	NY3	+	0,681	0,568	0,230	0,531	0,268	0,642	0,189
A4	G15-41	NY3	+	0,670	0,576	0,252	0,483	0,198	0,620	0,184
G1	G15-70	NY3	+	0,698	0,570	0,257	0,566	0,296	0,604	0,177
B1	G15-41	NY3	+	0,602	0,581	0,290	0,529	0,224	0,613	0,178
B2	G15-41	NY3	+	0,679	0,562	0,275	0,512	0,217	0,594	0,173
C1	G15-41	NY4	+	0,823	0,681	0,335	1,017	0,592	0,831	0,226
C2	G15-41	NY4	+	0,817	0,682	0,312	0,983	0,615	0,816	0,249
C3	G15-41	NY4	+	0,811	0,677	0,336	1,012	0,615	0,808	0,221
C4	G15-41	NY4	+	0,818	0,703	0,336	1,009	0,693	0,812	0,238
C5	G15-41	NY4	+	0,811	0,686	0,342	0,963	0,571	0,828	0,244
C6	G15-41	NY4	+	0,789	0,730	0,353	0,973	0,588	0,812	0,211
C7	G15-41	NY4	+	0,823	0,712	0,376	1,038	0,646	0,862	0,244
C8	G15-41	NY4	+	0,836	0,692	0,387	1,002	0,629	0,834	0,247
C9	G15-41	NY4	+	0,765	0,710	0,394	0,948	0,551	0,809	0,239
C10	G15-41	NY4	+	0,830	0,688	0,333	1,003	0,625	0,834	0,243
I1	G15-70	NY4	+	0,794	0,666	0,312	1,068	0,652	0,770	0,245
I2	G15-70	NY4	+	0,815	0,708	0,336	1,029	0,617	0,785	0,242
I3	G15-70	NY4	+	0,824	0,713	0,353	1,095	0,696	0,817	0,232
I4	G15-70	NY4	+	0,794	0,693	0,311	1,039	0,616	0,798	0,246
I5	G15-70	NY4	+	0,814	0,693	0,316	1,024	0,608	0,797	0,238
I6	G15-70	NY4	+	0,806	0,700	0,341	1,034	0,639	0,776	0,238
I7	G15-70	NY4	+	0,813	0,708	0,323	1,076	0,689	0,793	0,240
I8	G15-70	NY4	+	0,801	0,693	0,315	1,028	0,639	0,804	0,229
I9	G15-70	NY4	+	0,811	0,681	0,338	1,043	0,634	0,820	0,234
I10	G15-70	NY4	+	0,794	0,681	0,331	1,047	0,644	0,770	0,233
D1	G15-41	NY4	+	0,817	0,674	0,336	0,986	0,563	0,809	0,269
D2	G15-41	NY4	+	0,824	0,676	0,350	0,983	0,569	0,820	0,209
D3	G15-41	NY4	+	0,803	0,691	0,340	0,987	0,581	0,834	0,227
D4	G15-41	NY4	+	0,807	0,691	0,356	0,909	0,549	0,800	0,214
D5	G15-41	NY4	+	0,808	0,723	0,345	0,946	0,554	0,820	0,219
D6	G15-41	NY4	+	0,811	0,688	0,360	1,004	0,590	0,816	0,233
D7	G15-41	NY4	+	0,773	0,679	0,360	0,962	0,550	0,816	0,204
D8	G15-41	NY4	+	0,813	0,699	0,366	0,999	0,591	0,809	0,210
D9	G15-41	NY4	+	0,799	0,678	0,354	0,938	0,576	0,823	0,201
D10	G15-41	NY4	+	0,802	0,665	0,358	0,949	0,542	0,822	0,212
J1	G15-70	NY4	+	0,806	0,708	0,338	1,032	0,621	0,812	0,205
J2	G15-70	NY4	+	0,784	0,668	0,296	0,950	0,559	0,808	0,201
J3	G15-70	NY4	+	0,799	0,698	0,331	0,997	0,581	0,807	0,196
J4	G15-70	NY4	+	0,798	0,667	0,320	0,977	0,586	0,781	0,207
J5	G15-70	NY4	+	0,814	0,664	0,316	0,988	0,611	0,796	0,209
J6	G15-70	NY4	+	0,805	0,672	0,322	0,977	0,603	0,837	0,200
J7	G15-70	NY4	+	0,814	0,694	0,336	1,040	0,665	0,806	0,230
J8	G15-70	NY4	+	0,801	0,673	0,304	0,934	0,537	0,779	0,224
J9	G15-70	NY4	+	0,810	0,679	0,333	0,995	0,598	0,831	0,218
J10	G15-70	NY4	+	0,806	0,664	0,314	0,958	0,561	0,828	0,199
K1	G15-70	NY5	+	0,914	0,784	0,453	2,257	1,681	1,001	0,246
K2	G15-70	NY5	+	0,824	0,715	0,421	2,205	1,622	0,953	0,256
K3	G15-70	NY5	+	0,879	0,750	0,394	2,230	1,679	0,984	0,251
K4	G15-70	NY5	+	0,820	0,759	0,397	2,273	1,702	0,918	0,239
K5	G15-70	NY5	+	0,889	0,763	0,415	2,313	1,708	0,993	0,235
K6	G15-70	NY5	+	0,880	0,742	0,412	2,255	1,649	0,959	0,194
E1	G15-41	neotenik	+	0,882	0,742	0,363	0,526	0,160	0,938	0,255
E2	G15-41	neotenik	+	0,863	0,723	0,353	0,507	0,152	0,888	0,256
E3	G15-41	neotenik	+	0,890	0,769	0,394	0,518	0,144	0,918	0,256
E4	G15-41	neotenik	+	0,894	0,740	0,385	0,533	0,103	0,934	0,261

E5	G15-41	neotenik	HO	0,894	0,763	0,383	0,556	0,157	0,922	0,252
E6	G15-41	neotenik	HO	0,896	0,752	0,403	0,534	0,140	0,916	0,285
E7	G15-41	neotenik	HO	0,889	0,754	0,397	0,566	0,118	0,903	0,267
E8	G15-41	neotenik	HO	0,889	0,732	0,376	0,503	0,132	0,958	0,251
L1	G15-70	neotenik	HO	0,894	0,762	0,367	0,605	0,235	0,928	0,278
L2	G15-70	neotenik	HO	0,892	0,759	0,372	0,595	0,184	0,899	0,260
L3	G15-70	neotenik	HO	0,897	0,750	0,375	0,595	0,243	0,912	0,251
L4	G15-70	neotenik	HO	0,884	0,772	0,397	0,591	0,167	0,920	0,263
U1	G15-123	imago	HO	0,951	0,699	0,395	7,774	7,202	0,985	0,258
U2	G15-123	imago	HO	0,952	0,705	0,408	7,886	7,340	1,012	0,277
U3	G15-123	imago	HO	0,937	0,714	0,371	7,736	7,139	1,021	0,268
U4	G15-123	imago	HO	0,960	0,738	0,432	7,733	7,205	0,989	0,272
U5	G15-123	imago	HO	0,947	0,724	0,400	7,660	7,058	1,030	0,285
U6	G15-123	imago	HO	0,953	0,692	0,354	7,717	7,134	1,051	0,272
U7	G15-123	imago	HO	0,972	0,723	0,385	7,900	7,361	1,045	0,293
U8	G15-123	imago	HO	0,943	0,710	0,382	7,469	6,997	1,004	0,249
U9	G15-123	imago	HO	0,919	0,669	0,367	7,469	6,976	1,034	0,268
U10	G15-123	imago	HO	0,926	0,698	0,390	7,760	7,134	1,020	0,226
U11	G15-123	imago	HO	0,946	0,701	0,382	7,801	7,283	1,023	0,225
U12	G15-123	imago	HO	0,929	0,703	0,392	7,670	7,171	0,959	0,263
U13	G15-123	imago	HO	0,943	0,698	0,392	7,657	7,150	1,024	0,275
U14	G15-123	imago	HO	0,957	0,701	0,402	7,529	7,027	1,005	0,253
U15	G15-123	imago	HO	0,957	0,701	0,397	7,840	7,303	1,060	0,264
U16	G15-123	imago	HO	0,982	0,721	0,405	7,774	7,278	1,055	0,274
U17	G15-123	imago	HO	0,938	0,696	0,399	7,793	7,214	1,010	0,252
U18	G15-123	imago	HO	0,929	0,671	0,363	7,453	6,922	0,983	0,264
U19	G15-123	imago	HO	0,953	0,698	0,389	7,729	7,195	1,013	0,281
U20	G15-123	imago	HO	0,956	0,708	0,392	7,670	7,136	0,986	0,260
U21	G15-123	imago	HO	0,931	0,683	0,387	7,750	7,237	1,000	0,260
U22	G15-123	imago	HO	0,934	0,691	0,385	7,513	6,992	0,996	0,278
U23	G15-123	imago	HO	0,926	0,708	0,390	7,735	7,250	1,069	0,262
U24	G15-123	imago	HO	0,941	0,708	0,395	7,812	7,273	0,967	0,275
U25	G15-123	imago	HO	0,931	0,691	0,382	7,710	7,187	0,987	0,267
U26	G15-123	imago	HO	0,932	0,695	0,407	7,682	7,113	1,022	0,262
U27	G15-123	imago	HO	0,961	0,727	0,407	7,830	7,287	1,011	0,236
U28	G15-123	imago	HO	0,960	0,715	0,399	7,664	7,097	0,989	0,263
U29	G15-123	imago	HO	0,914	0,698	0,392	7,560	7,106	1,022	0,263
U30	G15-123	imago	HO	0,946	0,720	0,399	7,578	7,028	1,000	0,265
U31	G15-123	imago	HO	0,934	0,680	0,378	7,661	7,116	1,005	0,258
U32	G15-123	imago	HO	0,941	0,708	0,399	7,590	7,122	1,042	0,207
U32	G15-123	imago	HO	0,941	0,708	0,399	7,590	7,122	1,042	0,207
T1	G15-123	imago	O3	0,951	0,745	0,377	7,268	6,815	1,066	0,275
T2	G15-123	imago	O3	0,958	0,723	0,387	7,377	6,820	0,998	0,250
T3	G15-123	imago	O3	0,927	0,702	0,385	7,365	6,817	1,059	0,257
T4	G15-123	imago	O3	0,951	0,691	0,370	7,265	6,828	1,078	0,232
T5	G15-123	imago	O3	0,909	0,670	0,380	6,951	6,469	1,040	0,254
T6	G15-123	imago	O3	0,942	0,696	0,377	7,217	6,469	1,058	0,254
T7	G15-123	imago	O3	0,938	0,686	0,382	7,129	6,602	1,077	0,251
T8	G15-123	imago	O3	0,948	0,713	0,407	7,673	7,102	1,094	0,233
T9	G15-123	imago	O3	0,973	0,723	0,389	7,368	6,830	1,083	0,250
T10	G15-123	imago	O3	0,942	0,713	0,405	7,373	6,821	1,075	0,237
T11	G15-123	imago	O3	0,948	0,706	0,378	7,282	6,764	1,047	0,230
T12	G15-123	imago	O3	0,933	0,674	0,393	7,113	6,650	1,049	0,257
T13	G15-123	imago	O3	0,948	0,718	0,389	7,329	6,834	1,071	0,251
T14	G15-123	imago	O3	0,948	0,732	0,392	7,441	6,932	1,104	0,268
T15	G15-123	imago	O3	0,963	0,755	0,416	7,398	6,912	1,111	0,263
T16	G15-123	imago	O3	0,965	0,733	0,408	7,518	6,943	1,095	0,241
T17	G15-123	imago	O3	0,965	0,701	0,387	7,220	6,732	1,091	0,260
T18	G15-123	imago	O3	0,921	0,710	0,397	7,310	6,756	1,080	0,235
T19	G15-123	imago	O3	0,936	0,705	0,393	7,384	6,873	1,105	0,245
T20	G15-123	imago	O3	0,934	0,704	0,375	7,371	6,859	1,079	0,263
T21	G15-123	imago	O3	0,934	0,688	0,390	7,178	6,660	1,044	0,247
T22	G15-123	imago	O3	0,931	0,694	0,397	7,244	6,661	1,024	0,235
T23	G15-123	imago	O3	0,951	0,730	0,396	7,383	6,828	1,061	0,225
T24	G15-123	imago	O3	0,956	0,713	0,404	7,275	6,770	1,100	0,264
T25	G15-123	imago	O3	0,931	0,677	0,394	7,111	6,654	1,059	0,255
T26	G15-123	imago	O3	0,961	0,716	0,412	7,560	7,027	1,057	0,263
T27	G15-123	imago	O3	0,957	0,705	0,394	7,346	6,812	1,068	0,224
T28	G15-123	imago	O3	0,942	0,724	0,396	7,220	6,732	1,038	0,233
T29	G15-123	imago	O3	0,941	0,694	0,407	7,485	6,966	1,066	0,247
T30	G15-123	imago	O3	0,927	0,684	0,414	7,038	6,512	1,039	0,229