

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta lesnická a dřevařská**  
**Katedra ochrany lesa a entomologie**



## **Hlavové žlázy termitů a funkční význam jejich sekrecí**

**Cephalic Glands of Termites and the Functional Significance of their Secretions**

Disertační práce

Autor: Ing. Jiří Synek

Školitel: doc. Ing. Oto Nakládal, Ph.D.

Konzultant: doc. Mgr. Jan Šobotník, Ph.D.

2019

"Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma *Hlavové žlázy termitů a funkční význam jejich sekrecí* vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací a doporučení školitele. Souhlasím se zveřejněním disertační práce dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby."

V Praze dne

Podpis autora

**Poděkování:**

Touto cestou si dovoluji poděkovat všem spoluautorům odborných článků za jejich podíl na úspěšném přijetí rukopisů a nepřímou spoluúčasť na vzniku této dizertační práce. Největší díky patří mému školiteli doc. Ing. Oto Nakládalovi, PhD. a doc. Mgr. Janu Šobotníkovi, PhD. za odborné vedení dizertační práce, věcné konzultace k metodice, pomoc při realizaci analýz, poskytnuté materiály a společně strávený čas při tvorbě rukopisů. Dále bych také chtěl poděkovat všem členům Fakulty lesnické a dřevařské ČZU; katedry ochrany lesa a entomologie a Termite Research Teamu za poskytnutí zázemí a ochotu při laboratorních a terénních pracích.

## Abstrakt

V současné době je popsáno zhruba 3 000 druhů termitů, kteří tvoří v tropických oblastech jednu z nejpočetnějších skupin bezobratlých, jež svojí biomasou předčí například i mravence. Termiti se především v tropických oblastech obrovskou měrou podílejí na rozkladu rostlinné biomasy a dají se považovat za ekosystémové inženýry. Významně přispívají ke změnám struktury půdy, světové produkci skleníkových plynů a pravděpodobně jsou zodpovědní i za zastavení tvorby uhelných slojí. Určité rody nebo druhy můžeme považovat za významné škůdce polních plodin nebo lidských staveb. Jejich kastovní systém, některé potravní nebo obranné strategie, sociální chování nebo anatomické modifikace jsou bezprecedentní v celé živočišné říši. Přes všechny tyto faktory hovořící o významu termitů se stále jedná o velmi málo prozkoumanou skupinu hmyzu, a to z hlediska taxonomického, morfologického, anatomického i behaviorálního. Předložená práce se zaměřuje na hlavové žlázy termitů a skládá se ze čtyř publikací: (I) Orální žláza, nový exokrinní orgán termitů (Synek et al., 2019), popisuje zcela nový exokrinní orgán termitů, který byl pojmenován *orální žláza*, protože se nachází na dorsální a ventrální straně hypofarynxu v blízkosti ústního otvoru. Ačkoli jsou všechny ostatní známé žlázy termitů tvořeny stovkami až tisíci buněk, tuto žlázu tvoří pouze několik desítek sekrečních buněk I. třídy. Žláza byla popsána u dělníků a vojáků „nižších“ i „vyšších“ termitů, dřevožravých i hlínožravých druhů, je tedy pravděpodobné, že se jedná o žlázu s velkým rozšířením napříč druhovým spektrem. Sekrece žlázy je olejovitá, ale vzhledem k velikosti a umístění žlázy není možné zjistit její složení. Práce (II) Labrální žláza termitů vojáků (Palma-Onetto et al., 2018) a (III) Labrální žláza termitů: evoluce a funkce (Palma-Onetto et al., 2019) jsou zaměřeny na labrální žlázu. V první z nich (II) byla zkoumána struktura a ultrastruktura labra vojáků 28 druhů. Bylo prokázáno, že žláza se vyskytuje u všech druhů termitů a skládá se ze dvou sekrečních regionů na ventrálním labru a dorzálním hypofaryngu. Žláza je tvořena sekrečními buňkami I. třídy; buňky III. třídy byly zjištěny jen u několika zástupců. Povaha sekrece a ultrastruktura žlázy také naznačuje funkci komunikační, a nikoliv funkci obranou, jak bylo tvrzeno v předešlých pracích. V druhé práci (III) bylo zkoumáno labrum dělníků 28 druhů a imago 33 druhů napříč systémem termitů. Labrální žláza byla opět přítomna u všech zkoumaných druhů a její ultrastruktura byla velmi podobná vojákům, což potvrzuje teorii o komunikační funkci. Poslední článek (IV) Chemické a vibrační signály používané při poplašné komunikaci termita *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae) (Delattre et al., 2018) je zaměřena na poplašné chování *R. flavipes*. Reakce na poplašné signály by měla být taková, že zranitelné

kasty prchají od zdroje poplašného signálu, zatímco vojáci aktivně vyhledávají zdroj signálu. V této práci bylo zjištěno, že jak vojáci, tak dělníci *R. flavipes* reagují na různé stresové stimuly vibroakustickými a chemickými poplašnými signály. Nejsilnější odezva byla na závan vzduchu, který simuloval prolomení stěny hnízda. Nejdelší dobu trvání poplašného chování bylo dosaženo vložím rozmáčkuté hlavy vojáka, zatímco odezvy na ostatní stimuly měly jen krátké trvání. Vypuštění poplašného feromonu zvyšovalo vibrační komunikaci vojáků a dělníků. Studie prokázala, že poplašné signály jsou odlišně vyjádřeny mezi kastami a odezva se liší dle typu stimulu.

**Klíčová slova:** Termiti, Isoptera, Hlavové žlázy, Exokrinní žlázy, Chemická komunikace, Elektronová mikroskopie

## Abstract

There are over 3 000 known species of termites, which represent one of the most abundant invertebrate groups in the tropical regions, and in terms of biomass surpass, among others, even ants. They are also substantially contributing to plant biomass decomposition process, especially in the tropical regions, and can be therefore considered ecosystem engineers. Termites are significantly influencing changes in soil structure, world production of greenhouse gases, and they are likely responsible for discontinuity in creation of coal deposits. Some genera and/or species are considered severe threat for field production or buildings. The caste system, certain feeding and defensive strategies, social behavior, and anatomical modifications are unique among all animals. Despite all these indications of importance, termites remain very poorly examined insect group in terms of taxonomy, morphology, anatomy and etology. This thesis focuses on cephalic glands of termites and consists of four publications: (I) The oral gland, new exocrine organ of termites (Synek et al. 2019), describing a new exocrine gland, named oral gland, because it can be found on dorsal and ventral side of hypopharynx in oral cavity. Although all other known termite glands consist of hundreds to thousands cells, this gland is formed only by few dozen I. class secretory cells. The gland was observed in workers of both „lower“ and „higher“ termites, including soil-feeding as well as wood-feeding species. This indicates the gland is a common feature across the species spectrum. The secretion is oily, however, the size and position of the gland makes analysis of its composition very complicated. The publications (II) The labral gland in termite soldiers (Palma-Onetto et al., 2018) and (III) The labral gland in termites: evolution and function (Palma-Onetto et al., 2019) focus on the labral gland. The earlier paper (II) examined structure and ultrastructure of labrum of soldiers from 28 species. It has been proven the gland is present in all species and consists of two secretory regions. The gland contains I. and III. class secretory cells. In contrast to previously published information regarding its defensive function, the type of secretion and ultrastructure of the gland indicate communication function. The later paper (III) examined workers from 28 species and imagos from 33 species across the species spectrum. The labral gland was found in all species and its ultrastructure was identical with the ultrastructure found in soldiers, confirming its communication function. The last publication (IV) Chemical and vibratory signals used in alarm communication in the termite *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae) (Delattre et al., 2018) examined alarm communication of *R. flavipes*. In reaction to the alarm signal the vulnerable castes should flee from the source of the signal

while the defensive caste approaches the source. The study found out, that both soldiers and workers of *R. flavipes* react to variable alarm stimuli by creating vibro-acoustic and chemical alarm signals. The strongest response was detected for flow of air, which simulated breach in the wall of the nest. The longest duration of an alarm signal was observed after crushing head of a soldier, while reactions to other stimuli were short-term. The release of alarm feromon also increased vibratory communication of soldiers and workers. The study proved the alarm signals differ for each caste, and the reaction varies, based on the stimulus.

**Key words:** Termites, Isoptera, Cephalic glands, Chemical communication, Exocrine glands, Electron microscopy

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>11</b>
<b>Zadávací list</b> .....	<b>13</b>
<b>Cíle práce</b> .....	<b>15</b>
<b>1) Rozbor problematiky (literární rešerše)</b> .....	<b>16</b>
1.1. Eusocialita termitů a kastovní systém .....	16
1.2. Polymorfismus termitů .....	20
1.3. Fylogeneze a ontogeneze .....	26
1.4. Ekologie termitů .....	30
1.5. Potrava a trávení .....	36
1.6. Způsob života termitů.....	39
1.7. Systematika termitů .....	42
1.7.1. Mastotermitidae.....	42
1.7.3. Archotermopsidae a Stolotermitidae .....	42
1.7.4. Hodotermitidae .....	44
1.7.5. Kalotermitidae .....	44
1.7.6. Stylotermitidae .....	45
1.7.7. Serritermitidae.....	46
1.7.8. Rhinotermitidae.....	47
1.7.9. Termitidae .....	49
1.8. Exokrinní žlázy termitů .....	52
1.8.1. Klasifikace žláz .....	52
1.8.2. Orální žláza .....	53
1.8.3. Labrální žláza .....	53
1.8.4. Frontální žláza.....	54
1.8.5. Labiální žláza .....	56
1.8.6. Mandibulární žláza .....	58
1.8.7. Akcesorické mandibulární žlázy.....	59
1.8.8. Intramandibulární žláza .....	59
1.8.9. Tazální žláza.....	59
1.8.10. Sternální žláza.....	60



1.8.11. Tergální a posteriorní sternální žláza.....	61
1.8.12. Klypeální žláza.....	62
1.8.13. Hypofaryngeální žláza.....	62
1.8.14. Rostrální žláza.....	62
1.8.15. Dehiscentní žláza.....	63
1.8.16. Nasální žláza.....	63
1.8.17. Krystalová žláza.....	64
1.8.18. Laterothorakální žláza.....	65
1.8.19. Epidermální tegumentální žláza.....	65
1.8.20. Spermathekální žláza.....	66
1.8.21. Integumentální žláza.....	66
1.8.22. Pleuroabdominální žláza.....	66
1.8.23. Posteriorní tergální žláza.....	67
<b>2) Metodika.....</b>	<b>68</b>
2.1. Použitý materiál.....	69
2.2. Mikroskopie.....	70
2.2.1 Příprava vzorků.....	70
2.2.2. Optická a elektronová mikroskopie.....	70
2.3. Behaviorální pokusy.....	71
2.4. Chemické analýzy.....	73
2.5. Vibroakustické pokusy.....	74
<b>3) Výsledky.....</b>	<b>76</b>
Část I - <b>Orální žláza, nový exokrinní orgán termitů</b> .....	77
Část II - <b>Labrální žláza termitích vojáků</b> .....	85
Část III - <b>Labrální žláza termitů: evoluce a funkce</b> .....	101
Část IV - <b>Chemické a vibrační signály používané při poplašné komunikaci termita</b>	
<b><i>Reticulitermes flavipes</i> (Rhinotermitidae)</b> .....	117
<b>4) Diskuse.....</b>	<b>128</b>
Část I - <b>Orální žláza, nový exokrinní orgán termitů</b> .....	128
Část II - <b>Labrální žláza termitích vojáků</b> .....	130
Část III - <b>Labrální žláza termitů: evoluce a funkce</b> .....	133
Část IV - <b>Chemické a vibrační signály používané při poplašné komunikaci termita</b>	
<b><i>Reticulitermes flavipes</i> (Rhinotermitidae)</b> .....	135

<b>5) Závěr a doporučení pro praxi .....</b>	<b>138</b>
<b>6) Seznam literatury a použitých literárních zdrojů .....</b>	<b>140</b>
<b>7) Přílohy.....</b>	<b>164</b>
7.1. Přehled použitého názvosloví termitů.....	164

## Úvod

V současné době je popsán více než milion druhů živočichů a zhruba 80 % z nich tvoří hmyz. Odhady však uvádějí, že několikanásobně větší počet druhů hmyzu zůstává stále nepopsán. První paleontologické nálezy hmyzu pocházejí ze siluru, tedy z doby zhruba před 400 miliony let. Mezi vývojově nejstarší hmyzí řády patří například jepice, vážky, rovnokřídílí a další, jejichž stáří je v současné době odhadováno na zhruba 300 milionu let. Recentní skupiny hmyzu (včetně termitů) se začaly vyvíjet od křídly do počátku třetihor, tedy zhruba před 150 až 100 miliony let. Ačkoli je možné pro hmyz vytvořit obecné morfologické schéma, např. dělení těla na hlavu, hrud' a zadeček, během svého vývoje se rozvinul morfologicky i ekologicky do často velmi extrémních forem, které tomuto dělení neodpovídají. Jedná se o skupinu s velkým potenciálem. Hmyz je kromě slaných vod a arktických oblastí masivně rozšířen ve všech biotopech světa a velmi často vykazuje obrovský reprodukční potenciál, takže je vysoká nejen jeho diverzita, ale i abundance. Významně se tedy podílí na funkci nejrůznějších ekosystémů, na jejich dynamice a produktivitě. To samé platí i o lesních ekosystémech, kde je hmyz součástí všech trofických skupin, ale jako nejvýznamnější se jeví právě ekologická skupina dekompozitorů (Křístek a Urban, 2013).

Termiti (dříve řád Isoptera z řeckého *isos* – stejný, *pteron* – křídlo) jsou vnitřní skupinou švábů (nadčeleď Termitoidea, Blattodea) a zahrnují zhruba 3 000 platně popsaných druhů (Lo et al., 2007; Šobotník a Dahlsjö, 2017). Termiti patří mezi nejvýznamnější dekompozitory mrtvé rostlinné hmoty a hrají významnou roli jak v přírodních, tak v hospodářských biotopech. Jejich dopad na ekosystémy v tropických oblastech je obrovský, protože v tropických ekosystémech stráví 50 až 100 % surové rostlinné biomasy (Bignell a Eggleton, 2000; Bignell, 2016). Termiti se pravděpodobně podíleli na redukci objemu světových zásob uhlíku v pevné formě a zastavení tvorby uhelných slojí, když došlo k jejich světovému rozšíření na začátku třetihor (Engel et al., 2009). Také významně přispívají ke globální produkci a uvolňování skleníkových plynů, oxidu uhličitého a metanu do atmosféry (Sugimoto et al., 2000). Termiti jsou často nazýváni ekosystémovými inženýry, a to kvůli jejich dopadu na terestrické ekosystémy zahrnující uvolňování živin z mrtvé rostlinné hmoty, provzdušňování půdy, přemísťování materiálu v řádech jednotek tun na hektar za rok, a tím pádem se také významně podílejí na tvorbě heterogenity půdy (Jouquet et al., 2006; Eggleton, 2011; Evans et al., 2011). Význam termitů je umocněn jejich abundancí, která v tropických regionech často přesahuje 1 000 jedinců na m<sup>2</sup> (Dahlsjö et al., 2014). Termiti také představují důležitý zdroj

potravy pro široké spektrum predátorů (Deligne et al., 1987; Redford a Dorea, 1984). Překvapivě se však jedná o relativně málo prozkoumanou skupinu a v současné době jsou stále popisovány nejen nové druhy, ale i rody (Scheffranh et al., 2018). Stejně tak stále existuje řada parafyletických, či dokonce polyfyletických rodů, podčeledí i čeledí (viz Bourguignon et al. 2015, 2017), a vyšší klasifikace termitů do budoucna dozná řadu změn.

Exokrinní žlázy a jejich sekrece mohou mít řadu funkcí, obranných i komunikačních, ale mohou rovněž produkovat antibiotika, lubrikanty nebo trávicí enzymy (Chapman, 2013). Jsou to významné orgány pro veškerý hmyz, ale v největším množství existují právě u sociálního, respektive eusociálního hmyzu (Billen a Šobotník, 2015). Zatím bylo u sociálního hmyzu popsáno celkem exokrinních 149 žláz, z toho nejvíce 84 (sic!) u mravenců (Hölldober a Wilson, 1990; Billen a Šobotník, 2015). U termitů bylo zatím popsáno pouze 22 (respektive 23; viz tato práce, část I) exokrinních žláz. Existují žlázy, které jsou přítomny u všech kast, ale u larválních stádií jsou často neaktivní, a také některé jsou samozřejmě přítomny jen u některých druhů nebo kast. Například žlázy ovlivňující sexuální chování jsou přítomny pouze u okřídlených dospělců (Šobotník a Hubert, 2003; Šobotník et al. 2004). I naše vlastní výzkumy ukazují, že existují značné mezery v pochopení struktury a funkce sekrečních orgánů termitů a jejich výzkum je nezbytný pro pochopení života těchto jedinečných, a pro stabilní ekosystémy nepostradatelných, živočichů.

## UNIVERZITNÍ INFORMAČNÍ SYSTÉM

Přihlášen: Jiří Synek

0 zpráv 27 dokumentů 0 úkolů

### Zadání závěrečné práce – Ing. Jiří Synek – FLD D-LI-XOCHMY4 prez [roč 4]

Aplikace umožňuje zobrazit náhled zadání závěrečné práce a zkontrolovat jeho úplnost. Zobrazení je pouze informativní a neodpovídá tiskovému výstupu.



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

#### ZADÁNÍ DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:	Ing. Jiří Synek
Studijní program:	Lesní inženýrství
Obor:	Ochrana lesů a myslivost
Vedoucí práce:	doc. Ing. Oto Nakládal, Ph.D.
Garantující pracoviště:	Katedra ochrany lesa a entomologie
Jazyk práce:	Čeština
Název práce:	<b>Hlávové žlázy termitů a funkční význam jejich sekrecí</b>
Název anglicky:	<b>Cephalic glands of termites and the functional significance of their secretions</b>
Cíle práce:	Cíle práce: 1) Vypracovat literární rešerši na zvolené téma 2) Popsání stavby nově objevené orální žlázy termitů 3) Popsání struktury a funkce labrální žlázy u vojáků, dělníků a okřídlených dospělců termitů 4) Funkce sekrece frontální žlázy termita <i>Reticulitermes flavipes</i> v populační komunikaci
Metodika:	Termiti (dříve řád Isoptera) jsou vnitřní skupinou švábů (nadčeleď Termitoidea, Blattodea) a zahrnují zhruba 3.000 platně popsáných druhů. Ačkoliv jde o malou skupinu z taxonomického hlediska, jedná se o nejvýznamnější dekompozitory odumřelé rostlinné hmoty, kteří v tropických ekosystémech stráví 50 až 100 % vyprodukované biomasy, s čímž je spojena i jejich vysoká abundance často přesahující 1.000 jedinců na m <sup>2</sup> . Překvapivě se však jedná o relativně málo prozkoumanou skupinu a v současné době jsou stále popisovány nejen nové druhy, ale i celé rody. Jako u většiny eusociálního hmyzu je i u termitů velmi důležitá chemická komunikace. V rámci disertační práce bude zkoumána struktura a funkce několika hlavových žláz termitů včetně nově objevené orální žlázy. Pro popsání stavby a struktury žláz bude použit materiál (řádově desítky druhů) nachytnaný v terénu nebo z fakultních chovů, kdy se bude jednat o druhy napříč fylogenetickým spektrem a pocházející minimálně ze tří kontinentů. Materiál bude zafixován v 2% glutaraldehydu, 2,5% formaldehydu a 0,1M fosfátovém pufru na 24 hodin, následně

fixován ve 2% osmium tetroxidu, následně odvodněn v 50% až 100% acetonu (koncentrace zvyšována po 10 % každých 30 minut) a poté zalit v pryskyřici (standardní pro elektronovu mikroskopii). Takto zafixované vzorky budou následně nařezány na ultramikrotomu (Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome), tloušťky řezů 0,5 µm budou použity pro optický mikroskop (Nikon Eclipse Ni) a řezy tloušťky 70 nm pro transmisní elektronový mikroskop. Řezy budou následně nařezány v optickém mikroskopu se zvětšením 100 až 1000 a elektronovém mikroskopu (JEOL - JEM-1011) se zvětšením 5 000 až 150 000 a z pořízených snímků (Veleta camera and ITEM 5.1 software) za pomoci měřicího softwaru (Nikon NIS-Elements) bude popsána stavba a struktura žláz, zhodnoceny velikosti a tloušťky buněk, kutikuly, mitochondrií, přítomnost mikrovil, SER, RER atd. a tato data budou porovnána jak mezidruhově, tak mezi jednotlivými zkoumanými kastami. Pro popsání funkcí žláz budou provedeny behaviorální testy s následnou chemickou analýzou sekretů, pokusy budou probíhat v laboratorních podmínkách v Petriho miskách s různými typy stimulů a také budou sledovány a vyhodnoceny vibroakustické signály. Chemické analýzy budou probíhat metodou extrakce do hexanu nebo metodou SPME s následným vyhodnocením na plynovém chromatografu typu 6890N.

Doporučený rozsah práce: 100-200 stran

Klíčová slova: Termiti, Isoptera, Hlavové žlázy, Exokrinní žlázy, Chemická komunikace, Elektronová mikroskopie

Doporučené zdroje informací:

1. Billen J, Šobotník J. 2015. Insect exocrine glands. *Arthropod Structure & Development* 44: 399-400
2. Eggleton P. 2011. An introduction to termites: biology, taxonomy and functional morphology. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N, eds. *Biology of termites: a modern synthesis*. Dordrecht: Springer, 1-26
3. Engel MS, Grimaldi DA, Krishna K. 2009. Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *American Museum Novitates* 3650: 1-27
4. Křížková B, Bourguignon T, Vytisková B, Šobotník J. 2014. The clypeal gland: a new exocrine gland in termite imagoes (Isoptera: Serritermitidae, Rhinotermitidae, Termitidae). *Arthropod Structure & Development* 43: 537-542
5. Noiroit C, Quennedey A. 1974. Fine structure of insect epidermal glands. *Annual Review of Entomology* 19: 61-80
6. Sillam-Dussès D, Krasulová J, Vrkoslav V, Pytelková J, Cvačka J, Kotalová K, Bourguignon T, Miura T, Šobotník J. 2012. Comparative study of the labial gland secretion in termites (Isoptera). *PLoS One* 7: e46431
7. Stuart AM, Satir P. 1968. Morphological and functional aspects of an insect epidermal gland. *The Journal of Cell Biology* 36: 527-549
8. Šobotník J., Bourguignon T., Hanus R., Demianová Z., Pytelková J., Mareš M., Foltýnová P., Preisler J., Cvačka J., Krasulová J. & Roisin Y. 2012: Explosive backpacks in old termite workers. *Science* 337: 436.
9. Šobotník J, Bourguignon T, Hanus R, Sillam-Dussès D, Pfliegerová J, Weyda F, Kotalová K, Vytisková B, Roisin Y. 2010b. Not only soldiers have weapons: evolution of the frontal gland in imagoes of the termite families Rhinotermitidae and Serritermitidae. *PLoS One* 5: e15761

Předběžný termín: 2018/19 LS - FLD - SDZ

Elektronicky schváleno: 20. 11. 2017

**prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.**  
Vedoucí katedry

- [Zpět na závěrečnou práci](#)
- [Zpět na moje studium](#)
- [Zpět na osobní administrativu](#)

## Cíle práce

- 1) Vypracovat literární rešerši na zvolené téma
- 2) Popsání stavby nově objevené orální žlázy termitů
- 3) Popsání struktury a funkce labrální žlázy u vojáků, dělníků a okřídlených dospělců termitů
- 4) Funkce sekrece frontální žlázy termita *Reticulitermes flavipes* v poplašné komunikaci

# 1) Rozbor problematiky (literární rešerše)

## 1.1. Eusocialita termitů a kastovní systém

Pravé sociální uspořádání hmyzích společností (tzv. eusocialita) je definováno třemi hlavními znaky: dělba práce, vzájemná péče o potomstvo a překryv generací (Wilson, 1971). Celý koncept eusociality je ale založen na pozorování blanokřídých (především včel a mravenců), přičemž jiné eusociální taxony často nesplňují všechna uvedená kritéria kvůli rozdílům v genetice či způsobu života. Toto je případ všech diploidních skupin (termiti, mšice, rod *Synalpheus*, rypoši), které se od blanokřídých skupin zásadně liší nejen geneticky, ale i ekologicky. Příkladem mohou být mšice, které nesplňují kritérium péče o potomstvo, protože všechna jejich vývojová stádia včetně vojáků si obstarávají potravu sama (Stern a Foster, 1997). V porovnání s blanokřídým hmyzem se termitům dostává mnohem méně pozornosti, a to i přesto, že se jedná o skupinu, která tvoří komplexní a obrovské kolonie a vykazuje nejvyšší kastovní diversitu (Choe a Crespi 1997; Thorne, 1997). Termiti se také liší v některých aspektech definice eusociality, například v potravě založené na rostlinném materiálu, jehož trávení vyžaduje specifickou symbiotickou mikroflóru, která musí být jedincem aktivně znovuzískána po každém svleku (Bignell, 2000).

Tyto odlišnosti jsou různým způsobem reflektovány v teoriích vzniku eusociality termitů. První z nich je „Hypotéza přenosu symbiontů“ (Cleveland et al., 1934; Nalepa, 1994), která poukazuje na závislost termitů na jejich symbiotických komunitách, která zabraňuje solitérnímu způsobu života. Čerstvě svlečení termiti musí být „infikováni“ symbiotickými organismy anální trofolaxií od ostatních jedinců v hníždě, jinak nejsou schopni trávit potravu. Tato jasná závislost termitů na jejich symbiontech vedla Bignella k argumentaci, že „sociální organizace termitů se vyvinula primárně pro umožnění přenosu symbiontů mezi jedinci a generacemi“ (Bignell, 2011). Další teorie více zdůrazňují jiné specifické znaky termitů. Například teorie „cyklického inbreedingu“ (Bartz, 1979) je založena na vysoké úrovni inbreedingu v termitích koloniích, který zvyšuje příbuznost členů kolonie a podporuje tedy vzájemný altruismus. Přestože je základní pozorování této teorie správné, interpretace selhává, neboť popisuje situaci po vzniku eusociálního uspořádání, a nikoliv evoluci této novinky. Analogie k sexuální asymetrii u blanokřídého hmyzu a jejího vztahu ke genetice byla shrnuta v hypotéze „Chromozomové provázanosti“ (Lacy, 1980). Tato hypotéza zdůrazňuje přítomnost chromozomových řetězců napojených na chromozom Y, jež můžou zahrnovat až polovinu termitího genomu a způsobit značné odchylky od předpokládané příbuznosti jedinců v kolonii. Na druhou stranu existence



tohoto chromozomového spojení byla prokázána pouze u některých skupin termitů, z nichž žádná nepatří mezi bazální linie termitů. Rodičovská a sourozenecká péče je zdůrazňována v hypotéze „vnitroskupinového konfliktu“ (Roisin, 1994), která vidí jako základní faktor poškozování křídel. To vede k odložení vzniku imaginálních znaků a tedy k prodloužení doby fungování jedinců uvnitř kolonie a ultimátně tedy ke vzniku kasty dělníka. Tato teorie bývá často podceňována s vysvětlením, že mutilace vznikají následkem stresu z manipulace (Korb, 2005), zatímco tato situace je relativně běžná i u kolonií v přirozených podmínkách (Šobotník, osobní sdělení). Velmi zajímavé recentní pozorování prokázalo vliv rodičovské manipulace vybranými larvami tak, aby se z nich stali první vojáci (Maekawa et al., 2012). Bohužel ani jedna teorie dostatečně nevysvětluje evoluci eusociality termitů, protože jistou roli pravděpodobně hrála řada faktorů různým způsobem zdůrazněných ve výše zmíněných teoriích.

Kastu jako takovou definuje Šobotník a Dahlsjö (2017) jako skupinu jedinců v kolonii, která je jak morfologicky odlišná, tak i specializovaná svým chováním. A dále uvádí následující výčet (obr. 1):

**Alát** (imago, okřídlený, později odkřídlený dospělec) – adultní stádium nesoucí křídla či jejich základy.

**Dělník** (pravý dělník) – Jedinec vznikající nevratnou odchylkou z vývoje v imago, který zajišťuje chod kolonie. Dělníci jsou primárně charakterizováni ztrátou schopnosti přeměny v okřídlené imago, nicméně mohou být schopni se množit jako ergatoidní neotenici.

**Interkast** – jedinec, který nese specifické znaky 2 či více kast. Obvykle se jedná o vývojovou abnormalitu, nicméně vznik interkastů lze zajistit vnějším zásahem do hormonální regulace jedince (např. aplikace juvenilního či svlékacího hormonu).

**Královna a král** (královský pár) – Odkřídlený samec a samice, kteří založili novou kolonii a aktivně se rozmnožují.

**Larva** – Nedospělý jedinec bez vnějších křídel nebo vojenské anatomie.

**Neotenik** – Sekundární pohlavní jedinec s juvenilními morfologickými znaky. Neotenici vznikají z larev, nymf, pseudergátů nebo dělníků přes minimálně jeden specializovaný svlek. Podle původu rozlišujeme brachypterní nymfoidní neoteniky a apterní ergatoidní neoteniky.

**Plodný voják** – Jedinec necoucí znaky vojáka, který nicméně zajišťuje v kolonii reprodukci buď jako samec nebo jako samice. Plodní vojáci jsou známi u několika druhů čeledi Archotermopsidae.

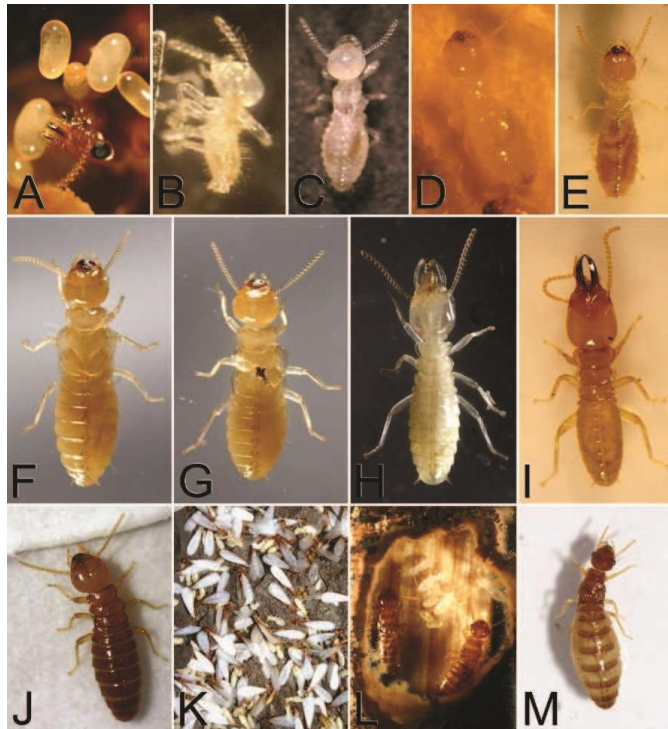
**Primární pohlavní jedinec** (primární král nebo královna) – Odkřídlený pohlavní jedinec, který založil novou kolonii po disperzním letu (obr. 2).

**Předvoják** – Přechodný instar mezi larvou, pseudergátem nebo dělníkem a vojákem, jedná se o nesklerotizovaného jedince s vojenskou anatomií.

**Pseudergát** (nepravý dělník) – Jedinec, který v kolonii funguje jako dělník, nicméně udržuje si schopnost vzniku křídel a založení vlastní kolonie po disperzním letu.

**Sekundární pohlavní jedinec** – Pohlavní jedinec, který vznikl ve funkční kolonii. Podle funkce rozlišujeme náhradní (nahrazují uhynulého krále či královnu) a doplňkové pohlavní jedince, jež koexistují s původním královským párem. Sekundární pohlavní jedince můžeme klasifikovat jako adultoidy (odkřídlení jedinci, kteří neprodělali disperzní let a nahradili uhynulé pohlavní jedince v mateřské kolonii), nymfoidy (nymfoidní neotenici) a ergatoidy (ergatoidní neotenici).

**Voják** – Jedinec se silně sklerotizovanou hlavou, vykazující další obrané adaptace, jako například zvětšené mandibuly, tvar hlavy blokující chodbu nebo frontální žlázu produkující obrané látky.



Obr.1: Kastovní a vývojová stadia rodu *Prorhinotermes* (Rhinotermitidae) (fotky nejsou ve stejném měřítku). 9A: Vejce *P. simplex*; 9B: Larva prvního instaru *P. canalifrons*; 9C: Larva druhého instaru *P. canalifrons*; 9D: Larva třetího instaru *P. simplex*; 9E: Pseudergát *P. simplex*; 9F: Nymfa *P. canalifrons*; 9G: Nymfa *P. canalifrons* s poničenými křídelními základy; 9H: Předvoják *P. canalifrons*; 9I: Voják *P. canalifrons*; 9J: Starý neotenický samec *P. simplex*; 9K: Rojení okřídlených jedinců *P. simplex*; 9L: Královský pár *P. simplex* s mladými larvami; 9M: 9 let stará hlavní královna *P. simplex* (převzato z Šobotník, 2015)



Obr. 2: Příklad rozdílů mezi kastami u druhu *Macrotermes michaelseni* (Termitidae: Macrotermitinae). V pozadí primární král a královna, která je obklopena dělníky; v popředí vojáci. Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

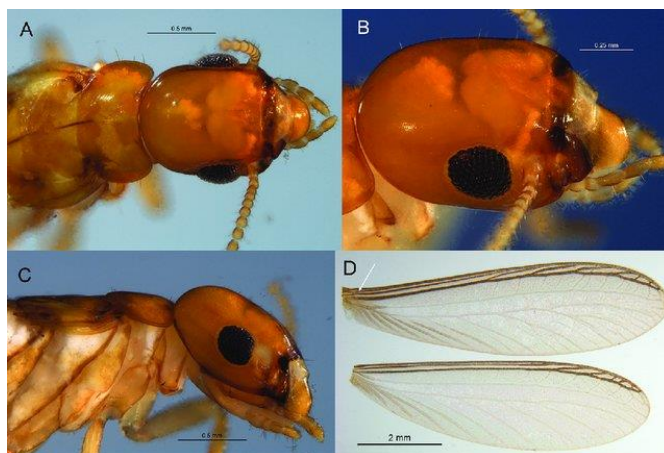
## 1.2. Polymorfismus termitů

Termiti vykazují obrovský polymorfismus, kasty jsou zcela odlišeny morfologicky, ontogenetickou historií a také chováním (Grassé, 1982; Eggleton, 2011). Přítomnost kast vojáků je považována za synapomorfii pro celý řád, zmizela sekundárně pouze v případě Termitidae: Apicotermitinae. Vojáci se většinou vyvíjejí z apterních jedinců přinejmenším druhého instaru, a to vždy přes stádium předvojáka. Na druhou stranu kasta pravých dělníků vznikla nezávisle alespoň dvakrát, pravděpodobně tomu ale bylo vícekrát (Noirot a Pasteels, 1987).

Úkoly jsou rozděleny mezi několik kast: pohlavní jedince (okřídlená imaga, nymfoidní neoteniky a ergatoidní neoteniky), vojáky a dělníky. Kromě těchto funkčních jednotek jsou zde ještě brzká nebo střední stádia bez jakéhokoli funkčního významu, jako například larvy, brachypterní nymfy (vývojová stádia na cestě k okřídleným dospělcům), předvojáci (přechodné, krátkodobé stádium mezi kastou dělníka a vojáka) a také preneotenici (přechodné krátkodobé stádium mezi kastou dělníka a neotenika) (Büchli, 1958; Thorne, 1996). Tento polymorphismus je realizován odlišnými způsoby postembryonálního vývoje a kastovní systém každého druhu je tvořen více či méně flexibilní sítí možností ontogenetického vývoje. Kastovní systém a základní vývoj byl studován u řady druhů ze všech čeledí (Noirot, 1969; Roisin, 2000; Roisin a Korb, 2011), kromě čeledi Stylotermitidae, kde je ontogeneze rovněž lineární (Šobotník, osobní sdělení). Okřídlení dospělci se vyvíjejí klasickou hemimetabolní cestou z apterních larev přes brachypterní nymfální stádia. Další kasty (vojáci, dělníci a neotenici) mají odlišný vývoj. Základním rozdílem od blanokřídlých je, že všichni jedinci v kolonii včetně terminálních stádií (voják, neotenic, dělníci u některých druhů) jsou immaturní (mají zachované svlékací žlázy), s výjimkou okřídlených imag (obr. 1, 3 a 7) (Noirot a Pasteels, 1987).

Termiti v rámci polyfenismu předčí takřka jakýkoli jiný hmyz, snad s výjimkou některých eusociálních mšic či brouka *Micromalthus debilis* (Coleoptera: Archostemata: Micromalthidae, LeConte (1878)) (Stern a Foster 1997, Pollock a Normark 2002). Jedinou dobře prozkoumanou skupinou hmyzu se srovnatelnou ontogenetickou plasticitou jsou nicméně eusociální mšice, u kterých se v rámci ročního období liší vývoj křídel dospělců a vojáci vznikají z časných larválních instarů (Stern a Foster, 1997). Jednotlivé kasty termitů jsou definovány ontogeneticky, morfologicky i behaviorálně (obr. 2 a 7). Na rozdíl od eusociálních blanokřídlých jsou všichni jedinci (kromě okřídlených dospělců – imag) nedospělí, ačkoliv se může jednat o terminální instary neschopné dalšího svlékání (např.

vojáci, neoteničtí pohlavní jedinci, dělníci u některých zástupců čeledi Termitidae) (Noirot & Pasteels 1987). Zatímco polymorfismus dělníků se manifestuje především velikostí těla a strukturou trávicího traktu, ostatní kasty (imaga, larvy a nymfy) vykazují v tomto ohledu zanedbatelné rozdíly, především v rámci příbuzných skupin, i když i zde nalezneme výjimky. Příkladem mohou být imaga druhu *Roisinitermes ebogoensis* (Kalotermitinae), jimž, jakožto u jediného druhu termitů, zcela chybí ocelli (Scheffran et al., 2018).



Obr. 3: Imago druhu *Roisinitermes ebogoensis* (Kalotermitinae), nově popsany rod termita z Kamerunu. Převzato z Scheffran et al. (2018)

Všechny ostatní kasty jsou oproti vojákům mnohem zranitelnější, a to i přes to, že okřídlení dospělci musí absolvovat let při zakládání nové kolonie. To je jednoznačně nejriskantnější moment jejich života, a také ho většina jedinců nepřežije. U vyspělejších druhů jsou okřídlená imaga ročně produkována v tisících kusech v každé kolonii. Pokud má zůstat populace druhu stabilní, potom každá kolonie dá během života průměrně vznik pouze jedné nové kolonii, která přežije do dospělosti a je schopná tvořit další okřídlené jedince. Z toho nutně plyne, že tisíce, desítky tisíc, či dokonce stovky tisíc imág v tomto zápase neuspějí. Jako obrana před predátory slouží okřídleným dospělcům především synchronizace disperzních letů, i když u většiny druhů Neoisoptera najdeme frontální žlázu, která může být velikostně srovnatelná s frontálními žlázami vojáků (Šobotník et al., 2010a, Kotalová et al., 2013).

Přestože jsou primárními obránci kolonií vojáci, defenzivní mechanismy se často vyvinuly i u ostatních kast. Dělníci se vždy zapojují do obrany hnízda či jiných konfliktů s jejich obranná role spočívá především v následujících funkcích: (i) stavba obranných struktur (hnízda a chodby); (ii) u hlínožravých druhů, které mají obecně méně vojáků a u některých skupin kasta vojáků zcela chybí, dělníci vykazují některé znaky typické pro vojáky (vysokou agresivitu, přítomnost obranných žláz), a kasta dělníků částečně nebo zcela nahrazuje kasty vojáků; (iii) konflikty u druhů s chemickou obranou vedly ke vzniku

specifických autodetoxikačních mechanismů, které činí vojáky chemicky se bránících druhů prakticky bezcennými v konfliktech mezi koloniemi téhož druhu a dělníci zde tvoří jedinnou účinnou obranu (Deligne et al., 1981; Prestwich, 1984; Šobotník et al., 2010b).

Nejvíce polymorfní kastou termitů jsou jednoznačně vojáci, jichž rozlišujeme řadu typů a anatomických adaptací (obr. 5). Evoluce kasty vojáků je jednou ze základních charakteristik evoluce termitů a představuje autapomorfii termitů (Hare, 1937; Noirot a Pasteels, 1987; Roisin a Korb, 2011). Ztráta kasty vojáků se během vývoje nezávisle na sobě objevila minimálně třikrát, a to u „*Anoplotermes-group*“ (Termitidae: Apicotermatinae; Sands, 1972). Nicméně moderní fylogeneze předpokládají vyšší počet nezávislých zániků kasty vojáků v rámci této skupiny (viz Bourguignon et al., 2017), *Orientotermes* a *Protohamitermes* (Termitidae: Termitinae Ahmad, 1976) a *Invasitermes* (Termitidae: Termitinae; Miller, 1984). Morfologické adaptace vojáků zahrnují silně zvětšené a sklerotizované hlavy, delší a silnější končetiny a celkově vyšší stupeň sklerotizace celého těla. Dalším specifikem je vývoj speciálních obranných žláz a především různé typy mandibul. Vývojově primitivním typem jsou vojáci s kousacími/drtícími mandibulami, které najdeme u čeledí Mastotermitidae, Archotermopsidae, Hodotermitidae, Stolotermitidae, většiny Kalotermitidae a rodu *Psammotermes* (Rhinotermitidae) (Deligne et al., 1981; Prestwich, 1984). Tento typ mandibul se vyznačuje bohatší denticí a jen malým překryvem konců mandibul. Jsou tedy uzpůsobeny k tomu, aby oponenta zranily zmáčknutím nebo proražením kutikuly. Nejblíže k tomuto typu má fragmotický typ vojáků, který je charakterizován zkrácením mandibul, které sice znemožňují zranit oponenta, ale jsou uzpůsobeny k tomu, aby se zakously do stěny hnízda a voják tak silně sklerotizovanou hlavou ucpal chodbu. Tento typ najdeme u Kalotermitidae (*Cryptotermes*, *Eucryptotermes*, *Calcaritermes*, *Glyptotermes*) (Deligne et al., 1981; Prestwich 1984; Engel et al., 2009; Šobotník, osobní sdělení) a několika rodů Termitidae: Apicotermatinae (*Coxotermes*, *Heimitermes*, *Duplidentitermes*, *Indotermes*, *Euhamitermes*; Šobotník, osobní sdělení). Dalším typem jsou stříhací mandibuly, kdy vojáci disponují dlouhými srpovitými mandibulami, které se výrazně překrývají a mohou oponentovi způsobit těžší zranění i s mnohem menším stiskem. Nižší mandibulární síla potřebná pro obrannou akci rovněž znamená i menší objem mandibulárních svalů ve srovnání s drtícími mandibulami. Ten poskytuje více prostoru uvnitř crania a tím umožňuje vznik frontální žlázy (Šobotník et al., 2010a). Tento typ mandibul se vyskytuje u řady zástupců Rhinotermitidae (*Prorhinotermes*, *Termitogeton*, *Reticulitermes*, *Heterotermes*, *Coptotermes*), *Glossotermes* (Serritermitidae) a mnoha rodů čeledi Termitidae (Deligne et al., 1981; Prestwich, 1984). Specifická obranná strategie se vyvinula u Rhinotermitidae:

Rhinotermitinae a skládá se z labrálního kartáčku na konci prodlouženého labra, jež nese drážku vedoucí sekreci frontální žlázy směrem k labrálnímu kartáčku. Tato modifikace je používána pro nanesení kontaktních jedů produkovaných frontální žlázou na oponenta. Zatímco bazální rod *Parrhinotermes* vykazuje pouze monomorfní vojáky s velmi dobře vyvinutými mandibulami (drtícími) a labrálním kartáčkem, ostatní rody mají vojáky většinou dimorfní. Oba typy, malí i velcí vojáci, jsou plně mandibulátní u rodu *Schedorhinotermes*, nicméně u neotropických skupin (*Dolichorhinotermes*, *Rhinotermes*) došlo u malých vojáků k atrofii mandibul a tito jsou odkázáni pouze na chemické zbraně (tzv. nasutoidní vojáci, nasutoidi). Nasutoidi jsou vysoce mobilní, početní a rychlí, aplikují jedovaté sekrece na nepřítele a rychle ustupují, zatímco velcí vojáci jsou robustní a pomalí, mají redukovanou frontální žlázu a bojují pouze pomocí mandibul (Prestwich a Collins, 1982). U nejodvozenějšího rodu *Acorhinotermes* vymizela subkasta velkých vojáků a aktivní obranu zabezpečují pouze nasutoidi (Prestwich, 1984).

Nejvíce modifikací vojáků nalezneme v rámci čeledi Termitidae, která je celkově nejvíce diversifikovanou skupinou mezi všemi termity. Mimo existence drtících mandibul („*Apicotermes*-group“, Syntermitinae a Termitinae) je zde mnoho dalších modifikací mandibul, které najdeme pouze zde (Deligne et al., 1981, Prestwich, 1984). Propichovací mandibuly se vyskytují u vojáků Syntermitinae, *Amitermes*, *Globitermes* či *Drepanotermes* (všichni Termitinae). Tento typ se vyznačuje dlouhými ostrými výběžky umístěnými hroty mandibul namířenými proti sobě, jejichž funkcí je se pevně zakousnout do oponenta (prorazit kutikulu), a tím prodloužit dobu, kdy je do vzniklé rány vypouštěna jedovatá sekrece frontální žlázy (Deligne et al., 1981; Prestwich, 1984; Šobotník et al., 2010a, b). Mezi pokročilými obrannými strategiemi je velice dobrým příkladem i podčeď Nasutitermitinae, u které se vyvinul frontální konus, tzv. „nasus“, a vojáky této skupiny označujeme za nasuty. Nasutní vojáci mají pouze malé a zakrnělé mandibuly, které nedisponují žádnou funkcí, podobně jako nasutoidní vojáci Rhinotermitinae, a místo nich obranou roli plní frontální žláza, jejíž sekrece je vystřikovávána na špičce nasu. Sekrece je vystřikovávána ve formě vláken lepivé a dráždivé sekrece, která je tvořena diterpeny naředěnými monoterpeny. Zatímco diterpeny po expozici na vzduchu tuhnou a jsou zodpovědné za znehybňující účinky, monoterpeny jsou repelentní či iritativní, nutí oponentky ke škrábání a čištění a mohou hrát rovněž funkci poplašných feromonů (Prestwich, 1984; Šobotník et al., 2010b).

Posledním typem jsou luskací mandibuly, které jsou dlouhé, štíhlé a vysoce elastické. Svalovou kontrakcí je kumulována elastická energie, která je naráz uvolněna „lusknutím“, kdy levá mandibula vždy přeskočí přes pravou. Výsledný úder dopadá

s devastující silou a bezobratlý oponent je doslova knock-outován nebo zabit, často roztrhán na kusy (obr. 3) (Deligne et al., 1981, Prestwich, 1984, Seid et al., 2008; detailní rozbor tohoto chování je k vidění ve filmu „Svět podle termitů“ z roku 2018). Podle tvaru mandibul můžeme rozlišovat takzvané symetrické a asymetrické luskací vojáky. U prvního typu je zásah veden konci obou mandibul a směřuje spíše do stran, zatímco u druhého je veden pouze koncem levé asymetrické mandibuly a směřuje spíše dopředu. Symetrické luskací mandibuly existují i u jediného druhu „nižšího“ termita, konkrétně *Roisinitermes ebogoensis* (Kalotermitidae), nalezeného pouze na jedné lokalitě v Kamerunu. Tento objev (viz Scheffrahn et al., 2018) patří mezi nejprekvapivější zjištění posledních dekád (obr. 3 a 4), neboť luskací strategie byla tradičně přisuzována pouze jedné skupině odvozených hlínožravých termitů ze skupiny Termitidae: Termitinae (Deligne et al. 1981, Prestwich 1984), zatímco *Roisinitermes* patří mezi bazální dřevožravé skupiny.

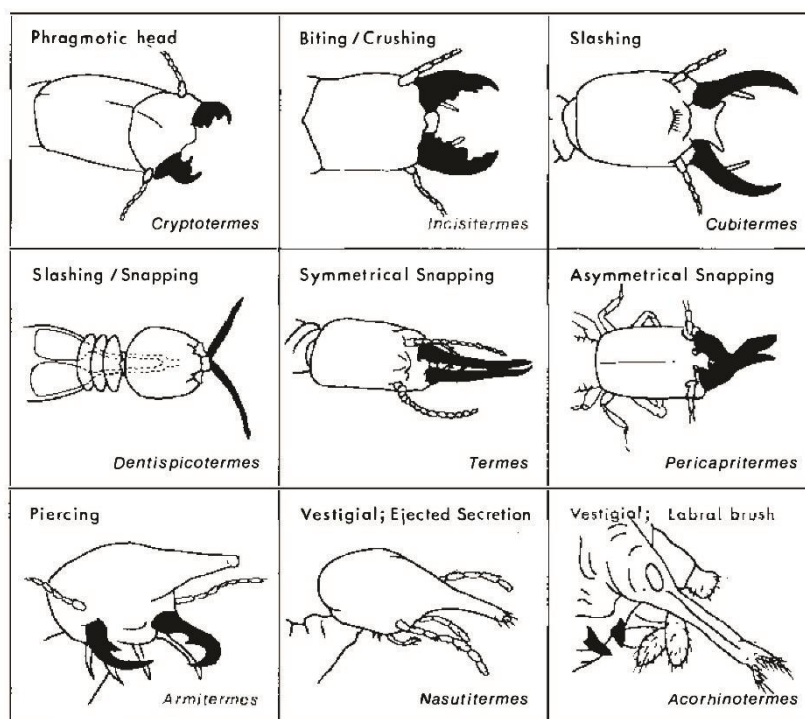


Obr. 4: *Roisinitermes ebogoensis* (Kalotermitinae) - jediný zástupce „nižších“ termitů u kterého najdeme luskací typ mandibul. Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

Luskací obrana je považována za vůbec nejefektivnější způsob obrany, protože u jiných typů existují značná omezení. Voják se kousnutím protivníka sám vystavuje značnému riziku, a proto v evoluci dochází k omezení trvání těchto rizikových situací, ať již rychlou aplikací jedu u nasutoidů, nebo vystřikováním obranné sekrece u nasutů. Jakkoliv jsou tyto strategie velmi úspěšné, je nutné si uvědomit, že voják, který již použil veškerou obrannou sekreci, je naprosto bezbranný (Šobotník et al. 2010b). V případě luskání však dochází pouze k minimálnímu kontaktu s oponentem, a zároveň nedochází k vyplývání sekrecí, takže lusknutí může být s minimálním výdejem energie provedeno



mnohokrát za sebou (Deligne et al., 1981). U „vyšších“ termitů se luskací typ mandibul vyvinul minimálně pětkrát nezávisle: (i) u *Termes*-group; (ii) *Neocapritermes*-group; (iii) *Pericapritermes*-group; (iv) *Promirotermes*; (v) *Dentispicoterme*s-group. Posledně jmenovaná skupina tvořená rody *Orthognathotermes* a *Dentispicoterme*s představuje přechod mezi luskacími a kousacími mandubulami a vojáci jsou schopni oponenta kousnout, udeřit lusknutím či zkombinovat oba jevy do jediné obranné akce (Šobotník et al., 2019).



Obr. 5: Typy mandibul u vojáků termitů (převzato z Prestwich 1984).

Horní řada zleva: Fragmotický typ; Drtící; Střihací

Prostřední řada zleva: Střihací/luskací; Symetrické luskací; Asymetrické luskací

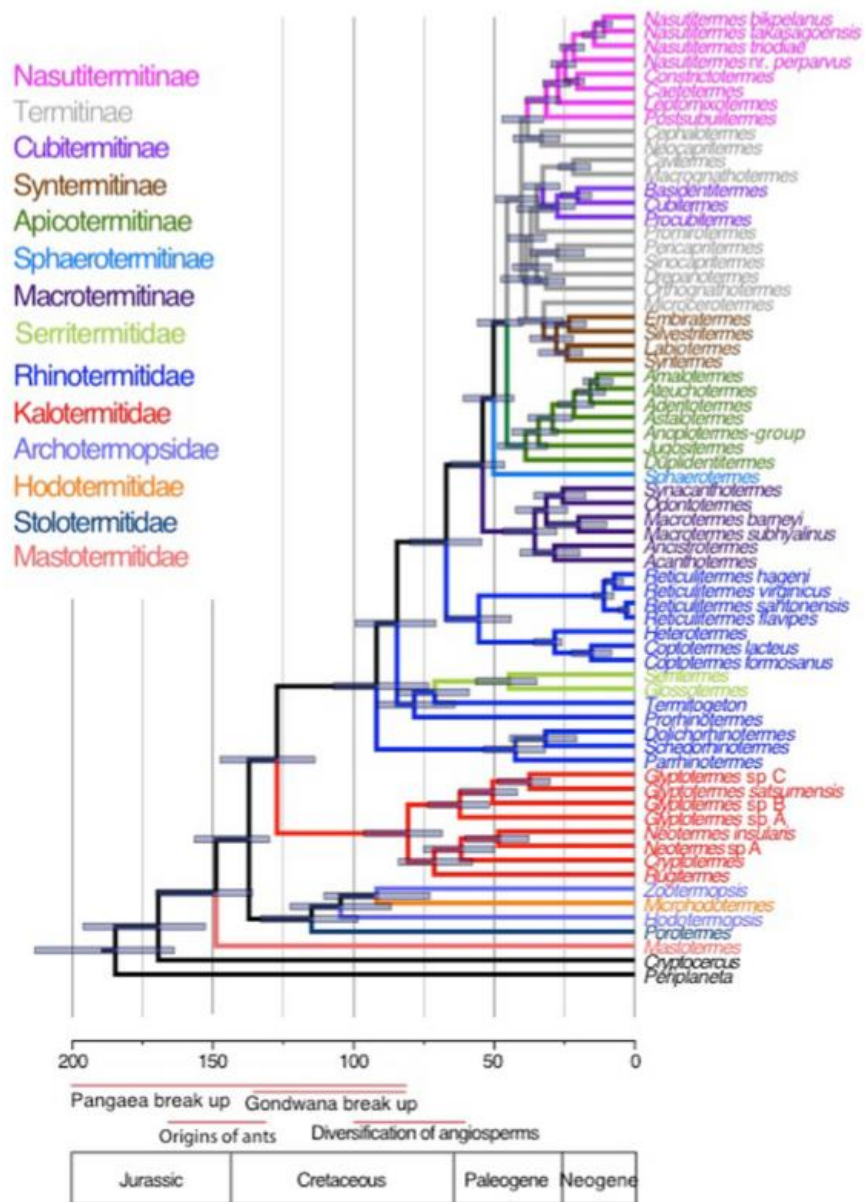
Spodní řada zleva: Propichovací; Nasuti; Nasutoidi

### 1.3. Fylogeneze a ontogeneze

Termiti (Isoptera, respektive Blattodea: Termitoidea; Inward et al., 2007; Lo et al. 2007) patří do skupiny Dictyoptera, spolu se šváby (Blattodea) a kudlankami (Mantodea) (obr. 6). Termiti byli dlouho chápáni jako samostatná skupina (Nalepa a Bandi, 2000; Kambhampati a Eggleton, 2000), nicméně později bylo jednoznačně prokázáno, že jsou vnitřní skupinou švábů se sesterským rodem *Cryptocercus* Scudder, 1862 (Lo et al., 2000; Inward et al., 2007; Che et al., 2016) a v současné době jsou tedy termiti řazeni jako nadčeleď švábů. Poslední společný předek termitů a švábů rodu *Cryptocercus* se vyskytoval v pozdní juře zhruba před 170 miliony let (Che et al., 2016). To vedlo Inwarda et al. (2007) k degradaci termitů na čeleď švábů. Tento krok byl velmi rychle opraven a termiti z čeledi povýšili na nadčeleď, která se stala nově používanou klasifikací této skupiny a je v současné době dominantně přijímána mezi vědci (Lo et al. 2007).

Fylogenetické hypotézy o příbuznosti termitích skupin doznaly v posledních letech značných změn, především vzhledem k bouřlivému rozvoji moderních sekvenačních platforem, které umožňují zpracování gigantických datasetů. Současná fylogeneze se většinou shoduje na struktuře fylogenetického stromu termitů (obr. 6) (Miura et al., 1998; Lo et al., 2000; Donovan et al., 2000; Austin et al., 2004; Inward et al., 2007; Legendre et al., 2008; Davis et al. 2009, Engel et al., 2009; Cameron et al., 2012; Bourguignon et al. 2015; Šobotník a Dahlsjö, 2017), ale i zde najdeme výjimky. Čeleď Mastotermitidae je sesterskou skupinou zbytku termitů (Euisoptera *sensu* Engel et al., 2009). Archotermopsidae, Hodotermitidae a Stolotermitidae tvoří monofyletický taxon, v němž je čeleď Hodotermitidae vnitřní skupinou Archotermopsidae. Další větví stromu je monofyletická čeleď Kalotermitidae, sesterská ke skupině Neoisoptera, charakterizovaná přítomností frontální žlázy. Stylotermitidae je bazální skupinou Neoisoptera (Wu et al., 2018). Rhinotermitidae jsou polyfyletickou skupinou, neboť čeledi Serritermitidae a Termitidae jsou jejími vnitřními skupinami. Další větví na fylogenetickém stromě po Stylotermitidae je podčeleď Rhinotermitinae, která bude v rámci uspořádání vyšší klasifikace povýšena na čeleď (Šobotník, osobní sdělení). Další větví stromu je monofylum tvořené rody *Prorhinotermes*, *Psammotermes*, *Termitogeton* a čeledí Serritermitidae (získá pravděpodobně jméno Psammotermitidae podle nejdříve popsaného rodu, Šobotník, osobní sdělení). Další skupinou formálně řazenou do současné čeledi Rhinotermitidae je monofyletická skupina tvořená rody *Reticulitermes*, *Coptotermes* a *Heterotermes* (který je parafyletický vzhledem k rodu *Coptotermes*) a tato skupina (do budoucna velmi pravděpodobně pojmenovaná Heterotermitidae, Šobotník, osobní

sdělení) je sesterskou skupinou Termitidae. V rámci čeledi Termitidae tvoří Macrotermitinae sesterskou skupinu zbytku a další skupina Sphaerotermitinae je buďto sesterskou skupinou Macrotermitinae (viz Buček et al., in press) nebo další nezávislou větví odštěpenou později (Bourguignon et al. 2015, 2017). Další nezávislou větví je podčeď Foraminitermitinae, po níž se odvětvila podčeď Apicotermitinae. Podčeď Termitinae je dalším neuralgickým bodem klasifikace termitů, neboť se opět jedná o polyfyletický soubor, v jehož rámci vznikly všechny další v současnosti uznávané skupiny Termitidae, tj. podčeďi Cubitermitinae, Syntermitinae a Nasutitermitinae. Zjednodušená fylogenetická hypotéza příbuznosti termitů podle mitogenomů je uvedena na obr. 6.

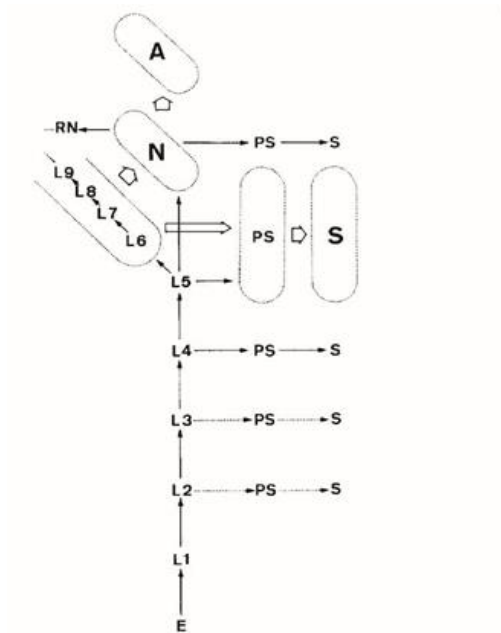


Obr. 6: Fylogenetický vývoj termitů. Zde je poměrně jasné, že hned několik skupin termitů je polyfyletických. Převzato z Bourguignon et al. (2015).

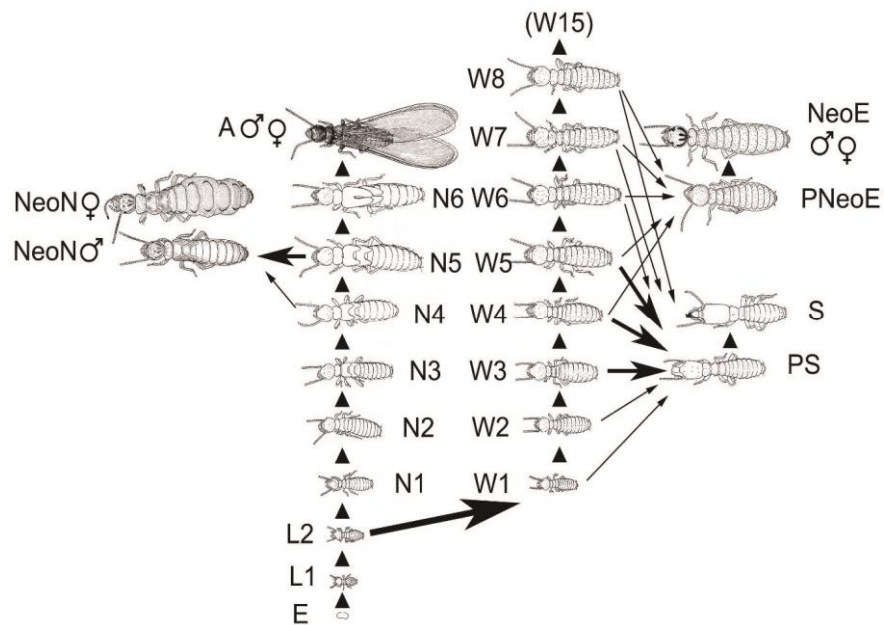
U termitů lze rozlišit dva způsoby ontogenetického vývoje. Lineární vývoj je primitivní a je velmi podobný vývoji švábů (obr. 7). Po prvním larválním instaru následuje několik dalších instarů, které se progresivně zvětšují a vedou ke kastě nepravého dělníka, pseudergáta *sensu lato* (*sensu* Roisin a Korb 2011). Termín pseudergát je používán pro všechny starší larvy které pracují, protože v praxi nelze odhalit ontogenetickou historii jedince. Počet těchto apterních instarů je nestabilní, nicméně později se jedincům vyvinou základy křídel a jako takoví jsou označováni jako „nymfa“. Nymfy mají stále možnost se vyvinout do rozdílných forem, mohou během svleku ztratit křídla a stát se pseudergátem *sensu stricto* (*sensu* Roisin & Korb 2011). Nymfy si zachovávají možnost křídla znovu získat (Roisin, 1990), změnit se v předvojáka, neotenického pohlavního jedince nebo pokračovat ve vývoji v okřídlené imago (kde vývoj křídel obvykle trvá dva nebo tři instary).

U druhů s lineární ontogenezí sdílejí sociální povinnosti obě pohlaví stejně (Roisin, 2000), s výjimkou čeledi Serritermitidae, kde jsou všichni pseudergáti samci a samice se objevují jen před rojením a rychle dávají vznik nymfám a okřídleným dospělcům (Bourguignon et al., 2009; Barbosa & Constantino, 2017). Druhy s lineárním postembryotickým vývojem patří do čeledí Archotermopsidae, Stolotermitidae, Kalotermitidae, Serritermitidae a rodů *Prorhinotermes*, *Termitogeton* a *Psammotermes* (Rhinotermitidae) (Roisin & Korb, 2011). Tyto skupiny tvoří relativně malé kolonie (s výjimkou rodu *Psammotermes*), většinou maximálně v počtu tisíců jedinců. Cesta lineárního vývoje je spojena s nestabilitou zdrojů potravy a hnízdního materiálu, a umožňuje všem nediferencovaným jedincům opustit hnízdo jako okřídlení dospělci a pokusit se o založení vlastní kolonie (Shellman-Reeve, 1997).

Druhý typ postembryotického vývoje, větvená ontogeneze (obr. 8), je charakterizován přítomností takzvaného „bodu rozhodnutí“ (angl. *decision point*) – tedy nevratného rozlišení ve vývoji mezi imaginální a dělničí vývojovou linií. Rozdělení těchto linií se vyskytuje po prvním nebo druhém svleku. Imaginální linii tvoří sled nymfálních instarů, které vykazují progresivní růst základů křídel, jež končí dosažením stádia okřídleného imaga. Dělničí linie pak dává vznik všem dělníkům a vojákům. Polymorfismus u dělníků a vojáků vývojově pokročilých druhů je většinou založen na pohlaví či instarové specializaci. Kolonie druhů s větveným ontogenetickým schématem mohou mít až několik milionů jedinců, kteří obývají obrovská hnízda spojená se zdrojem potravy v naprosté většině případů dlouhými chodbami (galeriemi). Mezi druhy s větveným vývojem patří příslušníci čeledí Mastotermitidae, Hodotermitidae, Rhinotermitidae: Rhinotermitinae a Heterotermitinae a Termitidae.



Obr. 7: Schéma lineárního vývoje termitů (*Prorhinotermes*). Převzato z Roisin (1990). Vysvětlivky: E: Vajíčko; L1 až L9: larvální instary; N: nymfy; A: Okřídlení dospělci; PS: Předvojáci; S: Vojáci; RN: Nymfy s redukovanými základy křídel. Tečkované šipky: Výskyt pouze u mladých kolonií. Tečkované linie: Okolo funkčních skupin složených z několika instarů rozeznatelných pouze podle nepatrných morfologických rozdílů.



Obr. 8: Schéma větveného vývoje termitů (*Reticulitermes*)

Tlusté šipky indikují vyšší pravděpodobnost přechodu. A: Okřídlený dospělec; L: Larva; E: Vajíčko; N: Nymfa; NeoE: Ergatoidní neotenik; NeoN: Nymfoidní neotenik; PNeoE: Ergatoidní preneotenik; PS: Předvoják; S: Voják; W: Dělník. (Převzato z Šobotník 2015 – zde upraveno z Büchli, 1958).

#### 1.4. Ekologie termitů

V současné době je popsáno zhruba 3 000 druhů termitů, kteří se řadí do 9 čeledí: Mastotermitidae, Archotermopsidae, Stolotermitidae, Hodotermitidae, Kalotermitidae, Stylotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae a Termitidae (Krishna et al., 2013). Prvních osm čeledí je souhrnně označováno jako „nižší“ termiti a jsou charakterizováni potravou ve formě dřeva či suché trávy a přítomností střevních symbiotických bičíkovců (Hypermastigida). „Vyšší“ termiti (Termitidae) jsou schopni trávit rostlinnou hmotu v libovolné fázi dekompozice a ve střevě mají jen symbiotické bakterie (Archaea).

Termiti obývají teplejší části světa, v Evropě se vyskytují v celém středomoří a podél pobřeží Atlantského oceánu na jih od ústí řeky Loiry (Francie) (Clément, 1977). Tvoří významnou složku biomasy a jsou v lokalitách svého výskytu dominantními rozkladači organické hmoty (Fittkau a Klinge, 1973; Martius, 1994; Eggleton et al., 1996) a navíc bývají označováni za „ekosystémové inženýry“ (Holt a Lapage, 2000; Sugimoto et al. 2000; Jouquet et al. 2006). Termiti velmi silně ovlivňují své habitaty, mění strukturu půdy, chemické složení půdy a také výrazně ovlivňují růst rostlin (obr. 11) (Jouquet et al., 2006; Fox-Dobbs et al. 2010; Evans et al., 2011). Termiti dosahují v tropických regionech impozantní početnosti (Eggleton et al., 1996; Bignell 2016), díky níž je jejich ekologický dopad minimálně srovnatelný s další extrémně významnou skupinou – mravenci (Holldöbler a Wilson, 1990). Předpokládá se, že termiti jsou zodpovědní za zastavení tvorby uhlí, protože se jedná o stejnou dobu, kdy se celosvětově rozšířili na začátku třetihor (obr. 9 a 10; Engel et al., 2009). V kontrastu s mnoha druhy hmyzu, které žijí v úzké asociaci se svými hostitelskými rostlinami (Novotný et al., 2002; Weiblen, 2002), jsou termiti generalisty, co se týče taxonů rostlin, které jim slouží za potravu. Na druhou stranu každý druh se specializuje na jeden typ organické hmoty od zdravého dřeva, suché trávy, microepifytů, přes listový opad, mrtvé nebo rozkládající se dřevo až po organické zbytky roztroušené v půdě nebo dokonce vysoce rozložené organické zbytky v půdě (obr. 11 a 17). Nejvyšší diverzitu vzhledem k typu potravy najdeme u čeledi Termitidae (tzv. „vyšší“ termiti), jež konzumují prakticky jakýkoli rostlinný zdroj potravy nebo dokonce houby, které jsou schopni pěstovat v hnízdech. Ostatní skupiny („nižší“ termiti) se živí pouze mrtvým dřevem, popřípadě suchou trávou (Hodotermitidae) či mohou být inkviliny termitů (Serritermitidae: *Serritermes serrifer*) (Abe, 1979, Shellman-Reeve 1997). Tyto různé potravní zdroje očividně nejsou náhodně rozdělené v rámci fylogenetického dělení termitů, protože určité skupiny termitů vykazují nezpochybnitelnou specializaci na

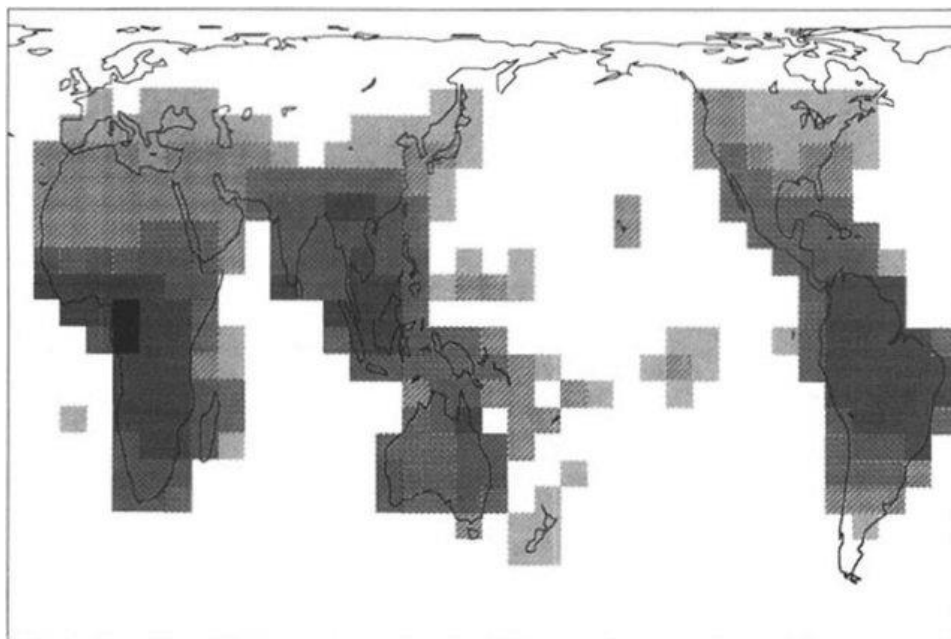
určité skupiny potravy (Inward et al., 2007), a k jemné diferenciaci nik dochází i mezi blízce příbuznými taxony (Bourguignon et al. 2011).

Donovan et al. (2001) porovnála morfologické znaky (vývoj mandibul dělníků a strukturu střev) s mikroskopickým rozbořením obsahu střev a vyčlenila následující ekologické skupiny: (i) termiti, kteří se živí mrtvým dřevem nebo trávou a vykazují jednoduchou stavbu střev (jen „nižší“ termiti); (ii) termiti, kteří se živí dřevem, trávou, listovým opadem nebo microepifyty a vykazují složitější stavbu střev (Termitidae: Sphaerotermitinae, Macrotermitinae, Termitinae, Syntermitinae, Nasutitermitinae); (iii) termiti živící se rozloženým dřevem, humusem nebo zbytky vykazujícími struktury rostlinných buněk (Termitidae: Apicotermitinae, Foraminitermitinae, Termitinae, Syntermitinae, Nasutitermitinae); (iv) termiti živící se materiálem na bázi hlíny s vysokým obsahem anorganické složky a s nerozpoznatelným rostlinným materiálem (Termitidae: Apicotermitinae, Termitinae, Cubitermitinae). Přestože je tato klasifikace platná z morfologického pohledu, tak biochemické studie isotopů dusíku ukázaly, že základní rozdělení tkví mezi dřevožravými termity na jedné straně (skupiny I a II) a hlínožravými termity na straně druhé (skupiny III a IV) (Bourguignon et al., 2011).

<i>Division</i>	<i>Distribution</i>
Family Mastotermitidae	
<i>Mastotermes</i>	Australian
Family Archotermopsidae	
<i>Archotermopsis</i> , <i>Hodotermopsis</i>	Oriental, Temperate Zone Nearctic
Family Hodotermitidae	
<i>Hodotermes</i> , <i>Microhodotermes</i>	African
<i>Anacanthotermes</i>	Oriental, African
Family Stolotermitidae	
<i>Stolotermes</i>	African, Australian
<i>Porotermes</i>	African, Australian, Chile
Family Kalotermitidae	
<i>Kalotermes</i>	Worldwide
<i>Marginitermes</i>	Nearctic, Neotropical
<i>Cryptotermes</i>	Worldwide
<i>Neotermes</i>	Worldwide
<i>Glyptotermes</i>	Worldwide
<i>Rugitermes</i>	Neotropical, Papuan
<i>Calcaritermes</i>	Nearctic, Neotropical, Oriental
<i>Incisitermes</i>	Worldwide
<i>Blitiditermes</i>	Worldwide
Family Rhinotermitidae	
<i>Parrhinotermes</i>	Oriental, Australian
<i>Schedorhinotermes</i>	Oriental, African, Australian
<i>Dolichorhinotermes</i> , <i>Acorhinotermes</i> , <i>Rhinotermes</i>	Neotropical
<i>Psammotermes</i>	African, Oriental
<i>Protrhinotermes</i>	Cosmotropical, islands and sho
<i>Termitogeton</i>	Oriental, Papuan
<i>Coptotermes</i>	Cosmotropical
<i>Heterotermes</i>	Cosmotropical
<i>Reticulitermes</i>	Paleartic, Nearctic
Family Serritermitidae	
<i>Serritermes</i>	Neotropical
<i>Glossotermes</i>	Neotropical
Family Termitidae	
Subfamily Macrotermitinae	
<i>Acanthotermes</i> , <i>Allodonotermes</i> , <i>Protermes</i> , <i>Pseudacanthotermes</i> , <i>Synacanthotermes</i>	African
<i>Ancistrotermes</i> , <i>Macrotermes</i> , <i>Microtermes</i> , <i>Odontotermes</i>	African, Oriental
Subfamily Sphaerotermiinae	
<i>Sphaerotermes</i>	African
Subfamily Foraminitermiinae	
<i>Foraminitermes</i>	African
<i>Labritermes</i>	Oriental
Subfamily Apicotermiinae	
<i>Apicotermes</i> , <i>Coxotermes</i> , <i>Duplidentitermes</i> , <i>Jugositermes</i> , <i>Machadotermes</i> , <i>Phoxotermes</i> (basal soldiered genera)	African
<i>Euhamitermes</i> , <i>Indotermes</i> , <i>Speculitermes</i> (soldiered or soldierless genera)	Oriental
<i>Adaiaphrotermes</i> , <i>Aderitermes</i> , <i>Allognathotermes</i> , <i>Alyscotermes</i> , <i>Amicotermes</i> , <i>Anentotermes</i> , <i>Astalotermes</i> , <i>Astratotermes</i> , <i>Ateuchotermes</i> , <i>Skatitermes</i> (soldierless genera)	African
<i>Anoplotermes</i> , <i>Aparotermes</i> , <i>Grigiotermes</i> , <i>Longustitermes</i> , <i>Ruptitermes</i> , <i>Tetinatermes</i> (soldierless genera)	Neotropical
Subfamily Termitinae	
<i>Ahamitermes</i> , <i>Cristatitermes</i> , <i>Drepanotermes</i> , <i>Ephelotermes</i> , <i>Incolitermes</i> , <i>Invasitermes</i>	Australian
<i>Lophotermes</i> , <i>Macroglyphotermes</i> , <i>Procapritermes</i>	Australian, Papuan
<i>Gnathamitermes</i>	Nearctic, Neotropical
<i>Pericapritermes</i>	Oriental, African, Papuan
<i>Cephalotermes</i> , <i>Promiotermes</i>	African
<i>Cavitermes</i> , <i>Crepitermes</i> , <i>Cylindrotermes</i> , <i>Dentispicotermes</i> , <i>Inquilinitermes</i> , <i>Neocapritermes</i> , <i>Orthognathotermes</i> , <i>Spinitermes</i>	Neotropical
<i>Amitermes</i> , <i>Microcerotermes</i> , <i>Termes</i>	Cosmotropical
<i>Angulitermes</i> , <i>Eremotermes</i>	African, Oriental, Palearctic
<i>Dicuspititermes</i> , <i>Globitermes</i> , <i>Homallotermes</i> , <i>Procapritermes</i> , <i>Pseudocapritermes</i> , <i>Sinocapritermes</i>	Oriental
<i>Capritermes</i> , <i>Quasitermes</i>	Madagascar
Subfamily Cubitermitinae	
<i>Apilitermes</i> , <i>Basidentitermes</i> , <i>Cubitermes</i> , <i>Euchilotermes</i> , <i>Furculitermes</i> , <i>Noditermes</i> , <i>Ophiotermes</i> , <i>Proboscitermes</i> , <i>Procubitermes</i> , <i>Thoracotermes</i> , <i>Unguitermes</i>	African
Subfamily Syntermitinae	
<i>Armitermes</i> , <i>Cornitermes</i> , <i>Curvitermes</i> , <i>Cyrlilotermes</i> , <i>Embiratermes</i> , <i>Labiatermes</i> , <i>Procornitermes</i> , <i>Rhynchotermes</i> , <i>Silvestritermes</i> , <i>Syntermes</i>	
Subfamily Nasutitermitinae	
<i>Agnathotermes</i> , <i>Angularitermes</i> , <i>Araujotermes</i> , <i>Atlantitermes</i> , <i>Coatitermes</i> , <i>Constrictotermes</i> , <i>Cortaritermes</i> , <i>Diversitermes</i> , <i>Obtusitermes</i> , <i>Parvitermes</i> , <i>Subulitermes</i> , <i>Velocitermes</i>	Neotropical
<i>Aciculitermes</i> , <i>Afrosulitermes</i> , <i>Eutermes</i> , <i>Fulleritermes</i> , <i>Grallatotermes</i> , <i>Mimeutermes</i> , <i>Postsubulitermes</i> , <i>Verrucositermes</i> , <i>Trinervitermes</i>	African
<i>Hospitalitermes</i>	Oriental, Papuan
<i>Grallatotermes</i> , <i>Trinervitermes</i>	African, Oriental, New Guinea
<i>Tenuostriatermes</i>	Nearctic, Neotropical
<i>Diwaatermes</i> , <i>Tumulitermes</i>	Australian, Papuan
<i>Australitermes</i> , <i>Occasitermes</i> , <i>Occulitermes</i>	Australian
<i>Nasutitermes</i>	Cosmotropical

Obr. 9: Seznam čeledí a základních rodů termitů s jejich výskytem v základních geografických regionech. Převzato z Krishna et al. (2013)





Obr. 10: Druhová distribuce termitů v rámci světa. Čím tmavší čtverec, tím větší druhová diverzita. Největší diverzita je zaznamenána v jižním Kamerunu. Převzato z Eggleton (2000)

Jakkoliv jsou termiti v běžné populaci známi především jako ničiví škůdci, pouze u 10 % druhů (tj. cca 300) byly zaznamenány způsobené škody člověku a pouze zlomek z nich lze považovat za významné škůdce. V této souvislosti je nutné si uvědomit, že zhruba 60 % druhů termitů je hlínožravých a žádné škody nepáchají. Další přibližně třetina druhů vykazuje dřevožravou potravní strategii a zbylých několik procent připadá na minoritní potravní strategie (potrava je suchá tráva, listový opad, mikroepifyty atp.). Některé druhy termitů mohou nicméně poškodit lidské majetky zásadním způsobem (obr. 12). Důležité škůdce můžeme rozdělit na dvě kategorie: (i) škůdci dřeva (nebo dalších materiálů bohatých na celulózu, například papíru) (obr. 11), nebo (ii) škůdce plodin. Škůdci dřeva napadají především strukturní elementy lidských staveb, většinou části dotýkající se země, a patří do čeledí Rhinotermitidae a Termitidae. Rod *Coptotermes* (Rhinotermitidae) je nejvýznamnějším z těchto škůdců. Nejvážnější škody působí *Coptotermes formosanus* a *C. gestroi*, kteří byli zavlečeni do USA i na další místa (Gay, 1969; Rust a Su, 2012). Další zásadním škůdcem z čeledi Rhinotermitidae je *Reticulitermes flavipes*, který patří mezi nejvýznamnější škůdce dřeva v USA a byl také zavlečen na několik dalších míst po celém světě, kde se stal invazivním druhem (dříve popsán jak *R. santonensis*) (Evans et al., 2011). Dalším významným škůdcem stavebního dřeva v suchých oblastech starého světa je rod *Psammodermes* (např. *P. allocerus*) rozšířený v celé severní

Africe (Mitchell, 2002). Škůdci napadající dřevo bez kontaktu se zemí se rekrutují z čeledi Kalotermitidae a nejvýznamnějším z nich je rod *Cryptotermes*, a především *C. brevis*, vyskytující se hlavně na pobřeží jižní Afriky (Mitchell, 2002). Zástupci podčeledi Macrotermitinae (Termitidae), známí pěstováním hub, jsou zodpovědní za značnou část poškození polí termity (především v Africe a Austrálii), živí se suchou trávou, ale v případě nedostatku nepohrdnou ani živou. Mezi polní škůdce můžeme také zařadit zástupce čeledi Hodotermitidae (především *Hodotermes* sp.), kteří často jsou nazýváni “harvester termite”, protože jsou schopni zcela “sklidit” velké polní nebo travní plochy, které jsou následně velmi náchylné k erozi, podobně jako rod *Drepanotermes* (Termitidae: Amitermitinae) rozšířený v Austrálii (Su, 1994; Mitchell, 2002). O významu termitích škůdců hovoří například i fakt, že pouze v USA je ročně utraceno až 32 miliard USD za „boj“ proti termitům (Rust a Su, 2012).



Obr. 11: Vlevo hnízdo rodu *Acanthotermes* (Termitidae), v dolní části jsou viditelné houbové zahrádky.

Vpravo Poškození dřeva termity druhu *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae). Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka



Obr. 12: Zhroucený krov po napadení termitem rodu *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae). Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

## 1.5. Potrava a trávení

Termiti dosahují maximální druhové diverzity a abundance ve vlhkých tropických oblastech a jejich početnost koreluje s produktivitou ekosystémů (Eggleton et al., 1996). Fascinující fakt je, že zhruba 20 % z čisté primární produkce biomasy (v teplých oblastech) je zkonzumováno právě termity, jejichž hlavní složkou potravy je celulóza. Termiti se primárně živí na mrtvém dřevě, ale sekundárně se vyvinula spousta dalších rozdílných potravních strategií (Sugimoto et al. 2000). Dřevo a všechny další rostlinné materiály mají jednu společnou vlastnost – jsou tvořeny lignocelulózovou maticí, tzn. obsahují celulózu, hemicelulózu a lignin. Celulóza je nejběžnějším polymerem na Zemi a představuje zhruba 40 % rostlinného materiálu (Eggert et al., 1990). Z chemického hlediska se jedná o polysacharidové vlákno tvořené mezi 500 a 14 000 D-glukózovými bloky spojenými dohromady  $\beta$ - (1–4) vazbami (Sjostrom, 1993). Lignin se vyskytuje především ve dřevě, kde tvoří zhruba 30 % organické hmoty. Lignin je heterogenní biopolymer postrádající definovanou strukturu, ale všeobecně vzato se skládá z phenylpropanoidových jednotek (p-hydroxyphenyl, guiacyl, syringyl, sinapyl a další), vždy se jedná o aromatická jádra s hydroxylovanými bočními řetězci spojenými dohromady C-C nebo jinou vazbou (Freudenberg a Nash, 1968). Hemicelulóza, třetí nejběžnější skupina rostlinných polymerů, je také polysacharid skládající se z pestré škály D-pentosových cukrů, které tvoří rozvětvené polymery až do 3 000 jednotek (Sjostrom, 1993). Schopnost dekompozice lignocelulózové matice rostlinných tkání je vzácná v celé živočišné říši, nicméně dekompozitori často dosahují vysokých abundancí díky velkému přísunu energie. Mezi bezobratlími jsou dekompozitory například měkkýši (Suzuki et al., 2006), hlístice (Smant et al., 2003), brouci (Girard a Jouanin, 1999), nebo dokonce sumka rodu *Ciona* (Chordata: Tunicata; Fleming, 1822) (Dehal et al., 2002). Trávení lignocelulózy je umožněno kombinací efektů vlastních celuláz a pestré škály dalších enzymů produkovaných střevními mikroorganismy (Ohkuma a Brune, 2011). Střevo je bezpochyby největším orgánem termitích dělníků (obr. 13), a zatímco u „nižších“ termitů je to spíše jednoduchý trávicí trakt, který najdeme například u švábů, u „vyšších“ termitů (Termitidae) už se jedná o značně složitější orgán uzpůsobený pro dokonalejší trávení rostlinných materiálů, včetně těch ve vyšších fázích dekompozice (Noirot, 1995, 2001; Bignell 2011). Trávicí systém vykazuje obrovskou variabilitu funkčních částí, jež se projevují různými způsoby rozvoje jednotlivých kompartmentů, především v rámci zadního střeva, stejně jako způsobu připojení Malpighických trubic. Délka zadního střeva, speciálně u hlínožravých taxonů, několikrát přesahuje délku těla a jeho nezvyklé uspořádání nemá v celé hmyzí říši obdoby

(Bignell, 2011). Tyto vlastnosti poskytují velice dobré taxonomické znaky, a je to především enterická valva, která nahrazuje anatomické znaky vojáků u bezvojákých (i dalších hlínožravých) taxonů (Sands, 1972, 1998). Zatímco přední střevo slouží hlavně k průchodu a dočasnému skladování potravy, jejímu smíchání s trávicími enzymy produkovány labiální žlázou, a k jejímu rozmělnování ve žvýkacím žaludku, tak ve středním střevu dochází k produkci a působení vlastních trávicích enzymů a vstřebávání živin. Zadní střevo pak slouží pro trávení potravy s pomocí symbiotických mikroorganismů a štěpení nejodolnějších makromolekul. To je důvodem, proč se zadní střevo vyvinulo do tolika odlišných tvarů a různých komor, ve kterých najdeme například různé pH, jež slouží pro fungování různých enzymů zodpovědných za rozklad konkrétních látek obsažených v potravních složkách (Bignell, 2011). Trávení termitů je velice účinné – až 90 % polysacharidických složek organické hmoty může být ztráveno během jednoho průchodu střevem (Breznak a Brune, 1994). Toto dokonalé trávení je umožněno bohatou flórou symbiotických mikroorganismů (až  $10^{11}$  buněk v jednom ml), které nacházíme především v přední části zadního střeva, ačkoliv se mikroorganismy vyskytují i v dalších částech střeva (Noirot a Noirot-Timothee, 1969; Brune, 2009). Kromě řady prokaryot žijících volně v lumenu střeva jsou další významnou a bohatou skupinou mikrobiálních symbiontů specializovaní bičíkovci (Flagellata) (Tokura et al., 2000; Hongoh et al., 2006; Radek a Nitsch, 2007; Inoue et al., 2008). Všichni „nižší“ termiti (včetně rodu *Cryptocercus*, sesterské skupiny termitů; Lo et al., 2000, Inward et al. 2007, Bourguignon et al. 2015) disponují unikátními bičíkovci patřícími do skupin Parabasalia nebo Oxymonadida (kmen Preaxostyla), které nenajdeme u žádných dalších živočichů (Cleveland et al., 1934; Inoue et al., 2000; Ohkuma a Brune, 2011). Střevo všech termitů, bez ohledu na taxonomické zařazení, obsahuje také obrovské množství prokaryot, tj. eubakterií a archebakterií. Ty zhusta reprezentují nepopsané rody nebo i čeledi s nejasnou příbuzností k dalším skupinám bakterií. Proto byly definovány tři skupiny bakterií žijících exklusivně v trávicím traktu termitů (tzv. Termite Groups): TG1, TG2 a TG3 (Ohkuma a Kudo 1996; Hongoh et al., 2003, 2005, 2006). Odhadovaná bakteriální diverzita je několik set fylogenetických jednotek (fylotypů) v každém termitím střevě (Hongoh et al., 2003, 2005, 2006), ale tyto dřívější odhady braly v potaz pouze nejběžnější fylotypy, zatímco spousta dalších fylotypů bývá opomíjeno kvůli jejich nízké abundanci (Ohkuma a Brune 2011; Otani et al., 2014).

Podle Bignella (2011) poskytují střevní symbionti alespoň sedm následujících funkcí: (i) disimilační metabolismus cukerných polymerů tvořících buněčné stěny rostlinných pletiv na polysacharidy krátkých řetězců sloužících jako energie pro termity či jejich symbionty; (ii) odbourávání kyslíku, které probíhá především na okraji střeva a

umožňuje vytvořit v jeho středu mikroanaerobní nebo dokonce striktně anaerobní podmínky umožňující zpracování potravy fermentací; (iii) spotřeba vodíku redukční acetogenezí; (iv) recyklace přebytků dusíku; (v) fixace vzdušného dusíku v případě jeho nedostatku, což je důležité především pro dřevožravé druhy; (vi) rozklad aromatických složek obsažených v ligninu (demethylace, deacetylace, dekarboxylace); (vii) humifikace komplexu organických materiálů a mineralizace uhlíku z proteinových složek huminových kyselin, které mají velký význam pro hlínožravé druhy.



Obr. 13: Termiti druhu *Heimitermes laticeps* (Termitidae: Apicotermitinae), jež se vyskytuje pouze v Konžské pánvi. U dělníků je jasně vidět velikost a délka střeva včetně objemu trávené potravy. Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

## 1.6. Způsob života termitů

Životní strategie termitů mohou být kategorizovány několika způsoby. Za jeden z nejdůležitějších parametrů klasifikace můžeme považovat vztah mezi potravním zdrojem a způsobem hnízdění. Potom nejjednodušší způsob života vykazují takzvaní jednokusoví termiti, kterým je jeden kus dřeva hnízdem a zároveň jedinným zdrojem potravy (Abe, 1987; Shellman-Reeve, 1997). Tuto strategii najdeme u čeledí Archotermopsidae, Kalotermitidae, *Glossotermes* (Serritermitidae) a *Termitogeton* a *Prorhinotermes* (Rhinotermitidae) (obr. 14). Tato strategie je velmi nestabilní kvůli omezenému zdroji potravy, a proto je spojena s lineárním ontogenetickým vývojem, kdy mají nediferenciovaní jedinci možnost vyvinutí křídel a opuštění hnízda ve chvíli vyčerpání potravního zdroje. Jednokusoví termiti rovněž vykazují malý počet jedinců v kolonii a, vzhledem k nestabilitě potravních zdrojů, také krátkou životnost kolonie (Abe, 1987; Shellman-Reeve, 1997; Korb a Hartfelder, 2008). Druhým typem životních strategií je mnohokusové hnízdění, které se také objevuje u druhů, jež se dřevem živí a i v něm hnízdí. Kolonie je schopná kolonizovat nové zdroje potravy podzemními chodbami (obr. 15), což zásadním způsobem zvyšuje stabilitu tohoto systému a vede tak k vyššímu počtu jedinců v kolonii. Tuto strategii najdeme u čeledí Mastotermitidae, Stolotermitidae, *Paraneotermes* (Kalotermitidae) a většiny Rhinotermitidae. Druhy s touto strategií často vykazují větvenou ontogenezi se znaky se zachovanou ontogenetickou flexibilitou a pouze menšina jsou druhy s lineární ontogenezí (Stolotermitidae, Kalotermitidae: *Paraneotermes* a Rhinotermitidae: *Psammotermes*) (Abe, 1987; Shellma-Reeve, 1997; Bourguignon et al., 2012). Třetím typem strategie je centrální hnízdění, kdy je definované hnízdo spojeno se zdroji potravy řadou podzemních nebo nadzemních chodeb. Druhy s touto strategií se neživí pouze dřevem, ale dalšími rostlinnými materiály bez ohledu na jejich stupeň dekompozice (obr. 16 a 17). Tento způsob života poskytuje nejstabilnější životní strategii a kolonie mohou žít po desítky let. Tato strategie je spojena s pokročilou větvenou ontogenezí a největšími známými koloniemi. Také je spojena s vysokým polymorfismem dělníků a vojáků, složitou dělbou práce a rozvinutým polyethismem. Centrální hnízda se vyskytují u Hodotermitidae, *Coptotermes* (Rhinotermitidae) a většiny zástupců čeledi Termitidae (Abe, 1987; Shellma-Reeve, 1997; Roisin a Korb, 2011). Posledním typem hnízdění je inquilinismus, což znamená, že jeden druh žije v hnízdě jiného druhu (vždy s centrálním hnízděním) a živí se jeho hnízdním materiálem nebo jeho zásobami potravy v případě trávožravých druhů. Tento způsob života představuje částečnou analogii k jednokusovému typu hnízdění, protože hnízdo hostitelského druhu

představuje výhradní zdroj potravy, který nemůže být rozšířen, ale může být hostitelským druhem stále doplňován. Inquilini žijí v malých koloniích odděleně od chodeb hostitelského druhu (vzájemné setkání je vždy nepřátelské) a jejich ontogeneze je vždy větvená (Termitidae), kromě druhu *Serritermes serrifer* (Serritermitidae) (Abe, 1987; Shellman-Reeve, 1997; Barbosa et al., 2012).



Obr. 14: *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae) patří mezi jedokusové termity, kteří se živí suchým dřevem s červenou hnilobou v neotropích. Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka



Obr. 15: *Mastotermes darwiniensis* (Mastotermitidae) patří mezi dřevožravé termity, kteří si však dokáží rozšiřovat potravní zdroje tak, že je propojují galeriemi. Zároveň se jedná o nejbazálnějšího termity, který tvoří sesterskou skupinu ke všem ostatním skupinám termitů. Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka





Obr. 16: Hnízda termitů neotropické podčeledi Termitidae: Syntermitinae.

Vlevo centralizované arboreální hnízdo druhu *Labiotermes labralis*.

Vpravo průřez hnízdem *Cornitermes cumulans*, na kterém je dobře vidět odlišná stavba vnější ochranné vrstvy (vpravo) a vnitřní části hnízda. Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka



Obr. 17: *Nasutitermes triodiae* (Termitidae: Nasutitermitinae) dokáže díky strategii centrálního hnízdění tvořit obrovská hnízda obsahující až několik milionů jedinců. Jedná se o trávožravého termita běžně se vyskytujícího v severní Austrálii.

Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

## 1.7. Systematika termitů

### 1.7.1. Mastotermitidae

Monotypickou čeledí je čeleď Mastotermitidae, která je sesterskou skupinou ke všem ostatním termitům (tj. Euisoptera) a pravděpodobně se objevila již před 150 miliony let (Ahmad, 1950; Kambhampati et al., 1996; Kambhampati a Eggleton, 2000; Bourguignon et al., 2015). V současnosti existuje z dříve celosvětově rozšířené skupiny jediný platně popsáný druh, *Mastotermes darwiniensis*, původně pouze severoaustralský, který byl člověkem zavlčen i na jižní Papuu (Thorne et al., 2000; Evans et al., 2013). *Mastotermes darwiniensis* si vykazuje plesiomorfnní znaky (například anální lalok zadního páru křídel, pětičlankové tarsi, uložení vajíček v oothéce, kladélko samic, přítomnost symbiotických bakterií rodu *Blattabacterium* v tukovém tělese nebo například nejvyšší počet sternálních a tergálních žláz; Noirot, 1969; Krishna 1970; Watson a Gay 1991, Ampion a Quennedey, 1981), ale zároveň vykazuje odvozené anatomické znaky (vícebičíkaté spermie, které jsou unikátní mezi všemi živočichy) (Baceti a Dallai, 1978), větvenou ontogenezi, velké kolonie dosahující několika milionů jedinců, velmi složité struktury hnízd a potravních galerií, a přítomnost poplašného feromonu produkovaného labiální žlázou (Moore, 1966; Noirot a Pasteels, 1987; Delattre et al., 2015). *Mastotermes* se živí dřevem, které sklízí v potravním teritoriu skrze komplikovanou síť podzemních chodeb. V přirozených podmínkách tvoří středně velké kolonie čítající řádově desítky tisíc jedinců, nicméně u narušených biotopech mohou kolonie dosahovat až stovek tisíc jedinců a být významnými škůdci stavebního dřeva (obr. 12) (Krishna et al., 2013; Bourguignon, osobní sdělení).

### 1.7.3. Archotermopsidae a Stolotermitidae

Zástupců čeledi Archotermopsidae (rody *Archotermopsis*, *Zootermopsis* a *Hodotermopsis*; celkem sedm druhů; Krishna et al., 2013) i Stolotermitidae (*Stolotermes* a *Porotermes*) vykazují primitivní anatomii (například žilnatina křídel, struktura genitálií nebo dlouhé cerky; Weesner 1969) a lineární ontogenezi (Roisin 2000). Kolonie zástupců čeledi Archotermopsidae jsou tvořeny pouze malými počty jedinců (jen okolo 40 kusů u druhu *Archotermopsis wroughtoni*; Roonwal et al., 1984), z nichž velká většina se alespoň pokusí rozmnožit, ať už jako alát, neotenik či plodný voják (Shellman-Reeve 1997). Archotermopsidae mají disjunktní areál, a vyskytují se v Himalájích (*Archotermopsis wroughtoni*), na západě Severní Ameriky od severního Mexika po jižní Kanadu (*Zootermopsis spp.*) a v jihovýchodní Asii (*Hodotermopsis sjöstedti* - hory zadní Indie, Taiwan, jižní ostrovy Japonska).

Stolotermitidae (rody *Stolotermes* a *Porotermes*; celkem deset druhů; Krishna et al., 2013) jsou typickými Gondwanskými relikty, neboť se vyskytují v jižní části Jižní Ameriky (*Porotermes*), v jižní Africe, Austrálii, Tasmánii a na Novém Zélandě (oba rody). Všechny druhy čeledí Archotermopsidae a Stolotermitidae se živí vlhkým mrtvým dřevem (Pearce a Waite 1994, Eggleton 2000), a jakkoliv jsou bez výjimek považovány za jednokusové termity, některé rody jsou schopny kolonizovat nové zdroje potravy pomocí podzemních či nadzemních krytých galerií (*Hodotermopsis* – Bordereau a Pasteels, 2011, *Porotermes* – Šobotník, osobní pozorování) (obr.:18 a 19).



Obr. 18: Termiti *Hodotermopsis sjostedti* (Archotermopsidae). Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka



Obr. 19: Termiti rodu *Porotermes quadricollis* (Stolotermitidae). Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

#### 1.7.4. Hodotermitidae

Hodotermitidae (tři rody, 21 druhů; Krishna et al., 2013) jsou skupinou starého světa specializující se na suché habitaty; mezi „nižšími“ termity se jedná o jedinou skupinu živící se trávou (Shellman-Reeve, 1997; Eggleton 2000). Externí znaky čeledi Hodotermitidae jsou primitivní, podobné čeledím Archotermopsidae a Stolotermitidae (Krishna, 1970), dalším společným je umístění sternální žlázy na čtvrtém sternitu (Noirot, 1995). Sociální systém čeledi Hodotermitidae je vysoce odvozený, obývají centralizovaná podzemní hnízda, ontogenetické schéma je větvené, dělníci jsou obou pohlaví a vykazují pohlavní dimorfismus, zatímco monomorfní vojáci jsou vždy samci (Watson 1973; Watson a Sewell 1981; Grassé 1982; Noirot a Pasteels 1987). Zástupci čeledi tvoří střední až velké kolonie. Všechny druhy této čeledi vyrážejí za potravou do otevřeného prostoru a všechny kasty mají proto vyvinuté oči. Rod *Hodotermes* se vyskytuje v jižní a západní Africe, rod *Microhodotermes* v severní Africe a Izraeli, a rod *Anacanthotermes* se vyskytuje od Maroka po západní Srí Lanku a od Kazachstánu po Severní Súdán (obr. 20) (Sands, 1998).



Obr. 20: Zástupci rodu *Hodotermes* (Hodotermitidae). Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

#### 1.7.5. Kalotermitidae

Všichni zástupci čeledi Kalotermitidae (22 rodů a 457 druhů; Krishna et al., 2013; Scheffrahn et al., 2018) mají stejnou lineární ontogenezi (Roisin 2000) a ekologickou strategii – typicky žijí v mrtvých větvích v korunách stromů, a pouze na okrajích areálu termitů (vyšší zeměpisné šířky, tropická pohoří atp.) dokáží kolonizovat i dřevo ležící na

zemi. Stejně tak jsou i v nížinných tropických lesích konzumovat dřevo, které je pro jiné termity příliš tvrdé (Šobotník, osobní sdělení). Čeleď Kalotermitidae má ze všech skupin největší areál, což vyplývá ze značných disperzních schopností, ale vzhledem k jejich slabým kompetičním schopnostem jsou v tropech relativně vzácní (Pearce a Waite 1994; Eggleton 2000, Krishna, 1961). Z hlediska diverzity se jedná o druhou nejbohatší čeleď (Krishna et al., 2013). Vojáci Kalotermitidae často vykazují fragmotickou obrannou strategii, kdy voják po napadení hnízda uzavře přístupovou chodbičku speciálně tvarovanou hlavou a následně je za ním chodba uzavřena směsí výkalů a sekrece labiálních žláz (obr. 21). Fragmotičtí vojáci se v rámci čeledi Kalotermitidae vyvinuli několikrát nezávisle na sobě (Krishna, 1970).



Obr. 21: *Eucryptotermes* sp. (Kalotermitidae) s typickým fragmotickým vojákem.

Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

#### 1.7.6. Stylotermitidae

Čeleď Stylotermitidae je bezpochyby nejméně prozkoumanou skupinou termitů. Přestože jediný rod čeledi (*Stylotermes*) (obr. 22) obsahuje 45 popsáných druhů žijících v jihovýchodní Asii, tak vzorky zástupců této čeledi jsou extrémně vzácné. Tato zvláštnost je způsobena tím, že se zástupci čeledi živí na velmi tvrdém a většinou živém dřevě. Kromě popisů druhů nejsou známy další detaily o jejich biologii (Krishna et al., 2013), pouze recentně byla jednoznačně odhalena jejich systematická poloha jakožto bazální větve skupiny Neoisoptera (Wu et al., 2018).



Obr. 22: Habitus vojáka a dělníka *Stylotermes halumicus* (Stylotermitidae). Povšimněte si unikátního znaku - zvláštních výrůstků z hrudních pleur dělníka. Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

#### 1.7.7. Serritermitidae

Čeleď Serritermitidae obsahuje dva rody, *Serritermes* s jediným druhem *S. serrifer* (obr. 23) a rod *Glossotermes* se dvěma popsány druhy (Krishna et al., 2013). Oba rody vykazují unikátní ontogenezi, kdy je kombinováno lineární schéma s pohlavní specializací – všichni dělníci i vojáci jsou samčího pohlaví (Bourguignon et al., 2009, Barbosa & Constantino 2017). *S. serrifer* se vyskytuje pouze v Brazílii, a žije pouze ve vnějších stěnách hnízd druhu *Cornitermes cumulans*, kde se živí na zbytcích rostlinného materiálu (Araujo, 1970; Shellman-Reeve, 1997) – jedná se tedy o jediného inkvilína mezi „nižšími“ termity. *Serritermes* vykazuje několik nezvyklých charakteristik, například dlouhé zoubkované mandibuly u vojáků (Emerson a Krishna, 1975), kdežto typický ypsilonový šev na craniu vojáků chybí (Emerson a Krishna, 1975). Dalším unikátním znakem je sekrece labiálních žláz produkovaná a centrálními buňkami acinu v koncentrických granulích (Costa-Leonardo, 1997). Rod *Glossotermes* se vyskytuje v Brazílii a Francouzské Guyaně, a živí se suchým trouchnivým dřevem napadeným červenou hnilobou (osobní pozorování).



Obr. 23: Rod *Serritermes* (Serritermitidae). Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

#### 1.7.8. Rhinotermitidae

Čeď Rhinotermitidae zahrnuje celkem 12 rodů a 315 druhů (Krishna et al., 2013), nicméně se jedná o polyfyletický shluk povrchně podobných rodů, které lze rozdělit na tři monofyla: (i) Rhinotermitinae; (ii) Psammotermitidae (*nomen nudum*), *Prorhinotermes*, *Psammotermes* a *Termitogeton* (k nimž patří rovněž čeď Serritermitidae); (iii) Heterotermitidae (*nomen nudum*), *Reticulitermes*, *Heterotermes* a *Coptotermes* (obr. 24) (Krishna et al., 2013; Bourguignon et al. 2015, 2016). Rhinotermitidae mají velký areál který zahrnuje tropické a subtropické oblasti celého světa; nejvyšší diverzita je známa z jihovýchodní Asie (Pearce a Waite, 1994; Eggleton 2000). Psammotermitidae vykazují lineární vývoj s jedním či dvěma nymfálními instary (Roisin, 1988; Bourguignon et al., 2009; Barbosa a Constantino 2017). U všech dalších zástupců Rhinotermitidae se vyskytuje větvený ontogenetický vývoj. Pohlavní nebo instarová specializace se vyskytuje u mnoha druhů a výsledkem je polymorphysmus dělníků a/nebo vojáků (Roisin, 2000). Vojáci mají vyvinuté mandibuly, ale u podčeďi Rhinotermitinae se vyskytuje specifický druh vojáků s prodlouženým labrem (nasutoidi) (Weesner, 1969; Prestwich 1984). Sekrece frontální žlázy obsahuje především kontaktní jedy (Preswiche, 1984). Cerky jsou vždy dvoučlánekové; další speciální znaky Rhinotermitidae jsou založeny na žilnatině křídel (Grassé, 1986). Kosmotropická skupina Rhinotermitinae obsahuje 6 rodů a 62 druhů. Jedná se o druhy malé (*Parrhinotermes*, *Dolichorhinotermes*), ale i střední či velké (*Schedorhinotermes*, *Rhinotermes*). Všechny

druhy této podčeledi tvoří velké kolonie a živí se dřevem, od zdravého po silně degradované (Krishna et al., 2013). Většina druhů rodu *Prorhinotermes* (celkem 11) žije na tropických ostrovech a záznamy z pevniny jsou velmi vzácné (Štys a Šobotník, 1999), což je pravděpodobně způsobeno jejich značnými schopnostmi kolonizace v kombinaci s nízkým kompetičním potenciálem (Emerson, 1955). Kolonie tohoto rodu jsou středně velké (1 000 až 5 000 jedinců) a živí se trouchnivým dřevem (Bourguignon et al., 2012). Všechny čtyři známé druhy rodu *Psammotermes* žijí v pouštích starého světa (Afrika, Arábie a jihovýchodní Asie), kde tvoří velké kolonie tvořené až stovkami tisíc jedinců, které se živí nejen dřevem, ale i jakýmkoli rostlinným materiálem včetně opadu a živých rostlin (Roonwal, 1988; Krishna et al., 2013). Z hlediska ontogeneze se jedná o velice polymorfní rod, kdy vojáci mohou vznikat z dělníků až 11 různých instarů a zatímco mladší dělníci jsou pseudergáty, starší dělníci *de facto* tvoří kastu pravého dělníka, neboť jejich hmotnost může přesahovat váhu okřídlených dospělců více než desetinásobně (Bourguignon et al., 2012). *Termitogeton* je jedním z nejmenších termitů, který tvoří malé kolonie živící se vlhkým trouchnivým dřevem s červenou hnilobou. Jeden druh je endemitem Ceylonu (Maiti, 2006) a další dva druhy se vyskytují v orientálních regionech a na Papui (Bourguignon a Roisin, 2011). Rod *Reticulitermes* obsahuje 138 popsanych druhů a jedná se tak o jeden z největších rodů termitů (Krishna et al., 2013). Vyskytuje se pouze na severní polokouli od severního Mexika po jižní Kanadu, v jihozápadní Evropě, a v jihovýchodní Asii. Zatímco v mírném a subtropickém pásu žijí spíše v nížinách, v jihovýchodní Asii se vyskytují v tropických pahorkatinách, nicméně jen na pobřeží severovýchodní Číny, Koreje a Japonska (zde až na jižní Hokkaido). Středně velké až velké kolonie se živí zdravým dřevem a postrádají strukturované hnízdo. Rod *Heterotermes* je kosmotropickou skupinou živící se zdravým či částečně trouchnivým dřevem; tvoří většinou středně velké kolonie (Krishna et al., 2013). Zatímco některé druhy (např. *H. aureus* na jihu USA) tvoří centralizovaná hnízda, většina druhů žije pouze ve dřevě a vlastní stavby nestaví. Rod *Coptotermes* zahrnuje 67 popsanych druhů (Krishna et al., 2013) s kosmotropickou distribucí, z nichž nicméně pouze 21 jsou nesporně existující druhy a ostatní jsou nejspíše mladší synonyma těchto druhů (Chouvenc et al., 2016). Jedná se o středně velké termity tvořící kolonie obsahující i přes milion členů. Většina druhů netvoří zjevné struktury hnízda, několik australských druhů (např. *C. acinaciformis*, *C. lacteus*) staví komplexní epigeální hnízda (Noirot, 1970).





Obr. 24: Zástupci druhu *Coptotermes testaceus* (Rhinotermitidae). Osobní archiv Jana Šobotníka

#### 1.7.9. Termitidae

Celá tato skupina je označována jako „vyšší“ termiti, a zahrnuje zhruba 80 % rodů (238) a 70 % druhů (2 072) žijících termitů (Krishna et al., 2013; Šobotník a Dahlsjö, 2017). Obecné charakteristiky této diversifikované skupiny jsou založeny na žilnatině křídel (silná costalizace a redukce radiálního sektoru) a absenci bičíkatých symbiontů v zadním střevu (Noirot a Noirot-Timothee, 1969; Grassé, 1986). Postembryonální vývoj je vždy větvený, rigidní a velmi uniformní, dělníci jsou značně odlišní od larev i nymf, a kastovní systém a sexuální polymorfismus zde dosahuje nejvyšší úrovně (Noirot a Pasteels 1987; Roisin, 2000). Přítomnost neoteniků schopných reprodukce je řídká (Myles, 1999), častěji se objevuje jen u některých rodů Syntermitinae a Termitinae, a je většinou spojena s „asexual queen succession“ (Fougeyrollas et al., 2015). Variabilita vojáku čeledi Termitidae je obrovská a jsou děleni do několika skupin podle typu mandibul (drtící, propichovací, stříhací, luskací symetrické nebo asymetrické, vojáci nasutní či fragmotičtí, obr. 5) (Prestwich, 1984). Zástupci čeledi Termitidae žijí především v tropech a jejich výskyt v temperátní zóně je spíše vzácný (Pearce a Waite, 1994; Eggleton 2000). Čeď Termitidae vykazuje největší diversitu nik, a jednotliví zástupci jsou schopni se živit rostlinným materiálem v jakémkoliv stádiu dekompozice, od živých pletiv nebo hub, až po silně degradované humusové složky v půdě (Donovan et al., 2001). Termitidae se dělí do osmi podčeledí (Krishna et al., 2013): (i) Macrotermitinae (obr. 11 a 25) (termiti pěstující houby) vyskytující se v Africe, v Arábii a jižní Asii, jejich primární potrava je tvořena

mrtvým dřevem, listovým opadem nebo trávou; sekundární jsou pak vždy nepohlavní spory (noduly) symbiotických hub rodu *Termitomyces* (Basidiomycetes: Agaricales); (ii) podčeleď Sphaerotermitinae obsahuje jediný popsaný druh *Sphaerotermes sphaerothorax* žijící se dřevem, žijící v centrální Africe a tvořící unikátní podzemní kulovitá hnízda s bakteriálními zahrádkami (obr. 26); (iii) Foraminitermitinae obsahuje dva rody, Středoafričský rod *Foraminitermes* a jihoasijský rod *Labritermes*, v obou případech se jedná o hlínožravé termity; (iv) Apicotermitynae sestává ze dvou pracovních skupin „*Apicotermes*-group“ žijící ve střední Africe a jižní Asii, a bezvojákaté druhy skupiny „*Anoplotermes*-group“ žijící v Africe a Neotropě, vždy se jedná o hlínožravé termity; (v) Termitinae je podčeleď, jejíž zástupci mají kosmotropické rozšíření a jedná se jak o dřevožravé, tak hlínožravé druhy; (vi) Cubitermitinae je skupina hlínožravých termitů žijících pouze v Africe; (vii) Syntermitinae je neotropická skupina dřevo nebo hlínožravých termitů stejně jako skupina (viii) Nasutitermitinae, jejíž rozšíření je kosmotropické.



Obr. 25: Vojáci druhu *Macrotermes carbonarius* (Termitidae: Macrotermitinae) hlídající vchod do hnízda těsně před rojením okřídlených dospělců. Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka



Obr. 26: Unikátní hnízdní strategie druhu *Sphaerotermes sphaerothorax* (Termitidae: Sphaerotermitinae), kdy je kulovité podzemní hnízdo od okolí navíc izolováno volným prostorem a visí pouze na kořenech. Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

## 1.8. Exokrinní žlázy termitů

### 1.8.1. Klasifikace žláz

Pro klasifikaci epidermálních žláz je používána anatomická nebo funkční klasifikace. Anatomické třídění je založeno na umístění v těle jedince (žlázy hlavové, hrudní, abdominální, nožní atp.), zatímco funkční členění bere v potaz spíše funkci vylučované sekrece (žlázy slinné, snovací, obrané, feromonové atp.). Funkční členění se ukázalo být nedostatečným, neboť stejnou funkci mohou hrát různé žlázy, stejně jako je povaha sekrece řady žláz zatím neznámá. Stejně tak může stejná žláza mít několik funkcí, například sternální žláza termitů vylučuje stopovací feromony u sterilních kast, zatímco u imág vylučuje sexuální feromony. Také slovo „žláza“ je používáno ve více smyslech, a to od epidermálních buněk sekretujících novou kutikulu, přes jednotlivé sekreční buňky rozptýlené v epidermis hmyzu až po komplexy tisíců buněk tvořících komplexní žlázy hmyzu. Noirot a Quennedey (1974, 1981) provedli cytologickou analýzu s cílem vytvořit konzistentní klasifikaci exokrinních žláz hmyzu. Epidermální buňky jsou vždy kryty kutikulou a jejich sekrety musí kutikulární bariérou prostupovat. Tato interpretace vedla k vytvoření klasifikace tří kategorií sekrečních buněk: (i) Buňky I. třídy – přímo sousedí s kutikulou a jejich sekrece přímo prostupuje skrz více či méně modifikovanou kutikulární bariéru; (ii) Buňky II. třídy – nejsou v kontaktu s kutikulou a jejich sekrety jsou pohlcovány buňkami I. třídy, odkud jsou teprve vyloučeny mimo tělo; (iii) Buňky III. třídy – jsou napojeny na kanálkovou buňku, jež vede kutikulárním kanálkem sekreci skrze kutikulu.

U termitů bylo doposud popsáno pouze 22 (23; Synek et al., 2019, viz níže) různých exokrinních žláz, což je sice mnohem více než u solitérních skupin hmyzu, nicméně pořád se jedná o spíše nižší počet ve srovnání s eusociálními blanokřídlými - například u mravenců bylo popsáno takřka 80 žláz (Billen, 2009). Výčet termitích žláz zahrnuje následující orgány: frontální žláza (Prestwich, 1984; Quennedey, 1984; Šobotník et al., 2010a), nasální žláza (Šobotník et al., 2015), labrální žláza (Deligne et al., 1981; Quennedey, 1984; Palma-Onetto et al., 2018, 2019), hypofaryngeální žlázy (Brossut, 1973), klypeální žláza (Křížková et al., 2014), epidermální tegumentální žlázy (Šobotník et al., 2003), integumentální žlázy (Leis a Sbrenna, 1983), mandibulární žlázy (Noirot, 1969), intramandibulární žlázy (Quennedey, 1984), akcesorické mandibulární žlázy (Greenberg a Plavcan, 1986), labiální žlázy (Šobotník & Weyda, 2003; Sillam-Dussès et al., 2012), tarzální žlázy (Bacchus, 1979), laterothorakální žlázy (Gonçalves et al., 2010), dehiscentní žlázy (Costa-Leonardo, 2004), krystalové žlázy (Šobotník et al., 2012, 2014), sternální žláza (Ampion a Quennedey, 1981; Quennedey et al., 2008), posteriorní sternální žlázy

(Quennedey et al., 2004; Šobotník et al., 2005), pleuroabdominální žlázy (Ampion, 1980), tergální žlázy (Ampion a Quennedey, 1981), posteriorní tergální žlázy (Costa-Leonardo a Haifig, 2010), spermatekální žláza (Quennedey, 1975), rostrální žláza (Deligne, 1983) a orální žláza (Synek et al., 2019, část I).

### 1.8.2. Orální žláza

Jedná se o nově popsanou žlázu, která byla popsána u dělníků i vojáků, „nižších“ i „vyšších“ termitů, a to jak u dřevožravých, tak i hlínožravých druhů. Oproti ostatním žlázám je orální žláza velmi malá – je tvořena řádově jen desítkami buněk. Je uložena hned za ústním otvorem ve dvou sekrečních regionech, na dorsální a ventrální straně anteriorního faryngu. Její funkce zůstává neznámá, ale nejpravděpodobnější hypotézou je, že produkuje lubrikanty usnadňující postup potravy do dalších částí trávicího traktu. Detailní popis je uveden ve výsledcích, část I (Synek et al., 2019).

### 1.8.3. Labrální žláza

Tato žláza donedávna patřila mezi málo známé orgány, byla popsána pouze u vojáků několika druhů (Deligne et al., 1981; Quennedey 1984; Šobotník et al., 2010b). Nejnovější práce (Palma-Onetto et al., 2018, 2019) však tuto žlázu popsaly u vojáků, dělníků a imág několika desítek druhů. Palma-Onetto et al. (2018, 2019) prozkoumali strukturu labrální žlázy u vojáků 28 druhů termitů a potvrdili, že tato žláza je přítomna u všech druhů termitů. Žláza se skládá z dvou sekrečních oblastí lokalizovaných na ventrální straně labra a v dorso-apikální části hypofarynxu. Labrum u Neoisoptera často nese tzv. průsvitnou špičku (angl. *hyaline tip*), která byla sekundárně ztracena u Nasutitermitinae, u rodu *Microcerotermes* a u všech druhů s luskacími vojáky. Žláza se rovněž vyskytuje u dělníků a imág všech druhů termitů, které autoři prozkoumali, stejně jako u švába *Cryptocercus punctulatus* Scudder, 1862, zástupce sesterské skupiny termitů, což ukazuje na její fundamentální funkci pro život termitů. Epitel žlázy se většinou skládá ze sekrečních buněk I. třídy a u některých druhů též z buněk III. třídy. Společným znakem buněk je výskyt hladkého endoplasmatického retikula, organely známé produkcí lipidických, často těkavých, látek. Žláza pravděpodobně neplní přímo obranou funkci, jak uváděly starší publikace, ale její funkce bude nejspíše komunikační, nicméně určení přesné funkce a složení produkované sekrece bude námětem budoucích prací. Detailní popis je uveden ve výsledcích, část II a III.

#### 1.8.4. Frontální žláza

Frontální žláza byla studována u mnoha druhů, ale většinou pouze u vojáků. Data o vývoji frontální žlázy u ostatních kast jsou velmi vzácná. První studie frontální žlázy byla provedena Holmgrenem v roce 1909 (Noirot, 1969) a frontální žláza byla také použita jako první kritérium pro vytvoření systematické skupiny Isoptera. Deligne et al. (1981) popsal ultrastrukturu frontální žlázy vojáků u desítek druhů. Quennedey (1984) rozvinul tuto studii o další druhy, ale zároveň popsal mnoho rozdílů pro druhy uvedené Delignem et al. (1981). Frontální žláza představuje jedinečný obraný orgán, jehož ekvivalent nenajdeme u žádné další skupiny živočichů (Noirot, 1969). Frontální žláza je vždy nepárová a představuje většinou vakovitou vchlípeninu ústící na frontální část hlavy pórem zvaným fontanela. Na vnitřní povrch frontální žlázy se připojují tentoriálně-fontanelární svaly, které byly zjištěny u všech zkoumaných druhů a jejich kast (Noirot, 1969), a definují polohu frontální žlázy i v případě, že byla redukována či dokonce zanikla. Frontální žláza představuje synapomorphii Neoisoptera, a byla doposud prozkoumána u zástupců čeledí Serritermitidae, Rhinotermitidae a Termitidae. Je plně vyvinuta u vojáků, u kterých často zasahuje hluboko do abdomenu – největšího rozvoje dosahuje u čeledí Rhinotermitidae a Serritermitidae (Quennedey, 1984; Deligne et al., 1981; Costa-Leonardo a Kitayama, 1991; Costa-Leonardo, 1998), přičemž u *Coptotermes formosanus* může hmota sekrece frontální žlázy dosahovat až 36 % živé váhy vojáka (sic!) (Waller a LaFage 1987). U vojáků čeledi Termitidae je rozvoj frontální žlázy variabilní. Nejmenší frontální žláza se vyskytuje u vojáků podčeledi Macrotermittinae (Termitidae), u kterých je defenzivní role plněna především labiální žlázou (Quennedey 1984; Deligne et al. 1981), a frontální žláza produkuje protihojivé látky (Prestwich, 1984). Značné rozdíly v rozvoji frontální žlázy existují u vojáků Rhinotermitinae, kdy např. malí vojáci rodu *Rhinotermes* spoléhají při obraně výhradně na sekrety frontální žlázy, zatímco velcí vojáci pouze na kusadla a frontální žláza je u nich redukována až zaniklá (Šobotník et al., 2010a). Fontanela chybí u vojáků některých druhů s velmi velkou frontální žlázou (například Serritermitidae; Costa-Leonardo a Kitayama 1991; Šobotník et al., 2010d; *Globitermes sulphureus* – Bordereau et al. 1997) a sekrece je během souboje uvolněna roztržením stěny těla (Prestwich 1984; Mill 1984; Costa-Leonardo a Kitayama 1991; Šobotník et al., 2010d). Frontální žláza se vyskytuje i u dalších kast, například imag, přičemž u některých druhů je žláza velmi velká a může zabírat nejen celou posterodorsální část hlavy, ale může zasahovat až hluboko do abdomenu, zatímco u jiných druhů je značně redukována či úplně vymizela (Noirot, 1969; Šobotník et al., 2010a; Kotalová et al., 2013). Unikátní frontální žláza byla pozorována u dělníků rodu *Aparatermes* (Termitidae: Apicotermittinae). Vlastní žláza je tvořena

extrémně zesílenou sekreční epidermis bez rezervoáru, a celá žláza je od hemocoelu izolována vrstvou specializovaných obalných buněk (Šobotník et al., 2010a). Recentně byla přítomnost frontální žlázy značné velikosti potvrzena rovněž u rodu *Tonsuritermes* (Termitidae: Apicotermitinae) (Constantini et al., 2018). U reprodukčně aktivních neoteniků druhu *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae) je žláza také přítomna jako zesílení sekrečního epitelu exoskeletálních žláz (Šobotník et al., 2003).

Sekreční epitel frontální žlázy je většinou tvořen buňkami I. třídy (dle klasifikace Noirot a Quennedey, 1974) nebo vzácně buňkami I. a III. třídy (zjištěno jen u vojáků a imág rodu *Coptotermes*; Quennedey 1984, Šobotník et al., 2010c). Frontální žláza tvořená sekrečními buňkami uspořádaných do tří vrstev byla popsána u vojáků druhu *Rhinotermes magnificus* (Sannasi, 1969), nicméně se pravděpodobně jedná o chybnou interpretaci, protože se toto pozorování nepodařilo nikdy zopakovat.

Sekreční frontální žlázy slouží k obraně v širokém smyslu slova. Prestwich (1984) rozlišil několik funkčních složek produkovaných frontální žlázou: (i) lipidické nětčkové a nepolární látky zabraňující hojení ran; (ii) dráždivé látky (těkavé mastné kyseliny nebo terpenoidy), které zabraňují predaci bez zjevného toxického efektu; (iii) kontaktní jedy, tj. lipofilické a vysoce reaktivní látky; (iv) znehybňující složky, tj. materiály, které se na vzduchu stanou lepivými (Nasutitermitinae, obr. 27); (v) poplašné feromony, které koordinují obranné aktivity. Produkty frontální žlázy také pravděpodobně hrají antiseptickou roli a inhibují růst patogenních mikroorganismů (Rosengaus et al., 2000). Produkty frontální žlázy mohou dokonce hrát roli *primer* feromonů a ovlivňovat ontogenezi v termití kolonii (Lefeuvre a Bordereau, 1984). U druhů s toxickými sekrecemi byla prokázána existence specifických autodetoxifikačních mechanismů, které zabraňují intoxikaci vlastními obrannými látkami (Spanton a Prestwich, 1981).

Složení sekrece frontální žlázy bylo identifikováno u vojáků značného počtu druhů (Šobotník et al., 2010b). Mezi nejběžnější substance patří následující kategorie látek: mono-, seskvi- a di-terpeny (Rhinotermitidae, Termitidae: Nasutitermitinae, Termitinae); uhlovodíky (Rhinotermitidae: Heterotermitinae, Termitidae: Macrotermitinae); ketony (Termitidae: Termitinae, Rhinotermitidae: Rhinotermitinae) (Šobotník et al., 2010b). Unikátní nitro-sloučenina, *E-1-nitropentadec-1-en* byl poprvé identifikován u vojáků druhu *Prorhinotermes simplex* (Vrkoč a Ubik, 1974) a jedná se o jedinou známou nitrosloučeninu produkovanou hmyzem (Deligne et al. 1981). Stejná látka byla později nalezena také u ostatních druhů rodu *Prorhinotermes*: u vojáků *P. flavus* (Chuah et al. 1990), vojáků druhů *P. canalifrons* a *P. inopinatus* a imág druhu *P. simplex* (Piskorski et al., 2007, 2009).



Obr. 27: Termiti druhu *Nasutitermes octopilis* (Termitidae: Nasutitermitinae), u vojáka je velmi patrný nasus a absence mandibul. Pro celou podčeleď Nasutitermitinae je typické vystřikování lepivých látek frontální žlázou. Foto: Osobní archiv Jana Šobotníka

#### 1.8.5. Labiální žláza

Labiální žláza termitů se neliší od základního schématu Polyneoptera (Noirot, 1969). Každá z párových žláz se skládá ze sekrečních buněk uspořádaných do početných acinů a rezervoárů (tzv. vodní vaky, angl. *water sacs*). Kanálky spojují příslušné části žlázy a ústí na bázi labia, sekrece je vylučována z úst. Veškeré sekreční buňky acinů představují modifikované buňky I. třídy, protože jsou v kontaktu s kutikulární výstelkou labiálních žláz. Jejich sekrece ale neprochází přes kutikulu, ale prochází skrz vstupní otvory umístěné entálně v terminálních větvích kutikulární výstelky. Centrální buňky jsou zodpovědné za syntézu sekrecí, které jsou nesené aktivně pumpovanou vodou do acinů parietálními buňkami (Šobotník a Weyda, 2003). Centrální buňky jsou ve srovnání s jinými sekrečními buňkami mimořádně velké a obsahují velké počty vesikul s nově syntetizovanými sekrety. U *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae) byly popsány tři druhy centrálních buněk. I. typ obsahuje velké množství elektron-lucentních vesikulů a obsah cytoplazmy buňky je nízký (Šobotník a Weyda, 2003). Podle vzhledu jsou tyto buňky označovány jako houbovitě buňky (Noirot, 1969) nebo skladovací buňky (Czolij a Slaytor, 1988). Buňky II. třídy obsahují elektron-denzní vakuoly, často i více typů vesikulů v jedné buňce. Tento typ se u *P. simplex* vyskytuje u všech kast a vývojových stádií s výjimkou nejmladších larev



(Šobotník a Weyda, 2003). U druhu *Serritermes serrifer* (Serritermitidae) existují unikátní buňky II. třídy, které obsahují granule sekrecí uspořádanou do koncentrických vrstev (Costa-Leonardo, 1997). III. třída centrálních buněk se u *P. simplex* vyskytuje běžně u vojáků, nicméně u ostatních kast je vzácný. Jedná se o buňky podobné ultrastruktury jako I. třídy, které jsou nejspíše zodpovědné za produkci obranných látek u vojáků, a u ostatních kast tyto buňky představují raná vývojová stádia buněk I. třídy (Šobotník a Weyda, 2003). Buňky I. třídy byly nalezeny u dělníků všech studovaných druhů, zatímco další typy jsou často omezeny jen na určité kasty. Všechny dosavadní studie rovněž ukázaly, že aciny dělníků obsahují více typů sekrečních buněk oproti ostatním kastám (Billen et al., 1989; Kaib a Ziesmann, 1992; Šobotník a Weyda 2003). Uvolňování sekrece buněk acinů je pod přímou neuronální kontrolou, jelikož volné axony byly často pozorovány uvnitř bazálních invaginací centrálních i parietálních buněk (Šobotník a Weyda, 2003).

Vodní vaky jsou tvořeny plochými buňkami s jen málo organelami (Grube et al., 1997; Šobotník a Weyda, 2003). Sekreční aktivita buněk vodních vaků byla vzácně pozorována pouze u druhu *Prorhinotermes simplex*, nicméně povaha sekrece zůstává neznámá (Šobotník a Weyda, 2003). Zatímco vodní váčky představují tenkostěnné struktury, které slouží pro dočasné ukládání vody u dělníků (Grube et al., 1997; Grube a Rudolph, 1999; Šobotník a Weyda, 2003) nebo pro depozici sekrece produkované aciny u vojáků (Billen et al., 1989), aciny jsou sekrečním orgánem produkujícím vlastní sekreci.

Vývody labiálních žlázy jsou tvořeny dvěma typy buněk. Entální části vývodů uvnitř acinů jsou tvořeny jednoduchými buňkami s řídkými organelami. Jsou kryté jednoduchou kutikulární výstelkou bez perforací (tj. neumožňují průchod sekrece skrz kutikulu – ta se do vývodů dostává pouze entálními perforacemi, viz výše), a nejspíše nemají žádnou další funkci než produkci kutikuly při svlékání (Šobotník a Weyda, 2003). Buňky ektálních částí obsahují vysoké počty mitochondrií spojené hlubokými bazálními invaginacemi, a mají též dlouhé apikální mikrovilly a obsahují i další sekreční organely (např. drsné endoplasmatické reticulum). Na rozdíl od entálních částí je kutikula ektálních vývodů vybavena spirálním taenidiem, které zajišťuje udržení konstantního průměru vývodu i při změně jeho délky. Vzhledem k ultrastrukturním charakteristikám ektálních částí vývodů je pravděpodobné, že tyto jsou zodpovědné za zkoncentrování výsledné sekrece pomocí aktivního transportu vody z vývodů do hemocoelu na základě transportu K<sup>+</sup> iontů z lumenu, podobně jako další vodu-přenášející epitely (viz Berridge a Oschman 1972). Ektální vývody acinů a vodních vaků sdílejí velmi podobnou ultrastrukturu a nejspíše i

funkci, a spojují se v posteriorní části hlavy, a společný vývod ústí na bázi labia v tzv. salivariu (Billen et al., 1989; Šobotník a Weyda, 2003).

Sekrece labiálních žláz může plnit různé funkce: (i) trávicí, jež je speciálně významná u dělníků (Noirot, 1969; Veivers et al., 1991); (ii) nutriční, neboť dělníci řady druhů krmí závislé kasty výhradně sekrety labiálních žláz (Noirot, 1969); (iii) komunikační, neboť labiální žlázy dělníků některých druhů produkují dlouhodobou feromonovou stopu značící potravní zdroje (Kaib a Ziesmann, 1992; Reinhardt a Kaib, 1995; Reinhardt et al., 1997); (iv) obranou, jež je speciálně významná u vojáků (Deligne et al., 1981; Prestwich, 1984), nicméně byla prokázána i u dělníků bezvojákých druhů (Sillam-Dussès et al., 2012); (v) stavební, neboť dělníci často používají sliny jako cement pro stavební aktivity (Noirot, 1969; Grassé, 1982). Feromon značící potravní zdroje byl identifikován jako hydrochinon (Reinhard et al., 2002) a pravděpodobným zdrojem této složky jsou centrální buňky I. typu (Šobotník a Weyda 2003). Další chinonické byly nalezeny v labiálních žlázách vojáků a tyto látky slouží k obraně (Deligne et al., 1981; Prestwich, 1984) a jsou nejspíše produkovány buňkami III. třídy (Šobotník a Weyda 2003).

#### 1.8.6. Mandibulární žláza

Tato žláza se vyskytuje u všech druhů termitů i jejich vývojových stádií, nicméně existuje jen relativně málo dalších informací. Pilotní článek zaměřený na strukturu žláz u jednotlivých kast konstatuje dramatické změny ve vztahu ke svlékání u druhu *Kaloterme flavicollis* (Lambinet, 1959), zatímco práce na stejném druhu popisuje strukturu žláz na ultrastrukturální úrovni (Cassier et al., 1977). Párová mandibulární žláza vykazuje stejnou strukturu u všech druhů termitů, je tvořena shlukem sekrečních buněk III. třídy umístěných blízko ventrálního mandibulárního kondylu. Jednoduchý krátký kanálek jí propojuje s cibariem. Velikost se relativně liší mezi druhy a také mezi kastami v rámci stejného druhu. Nápadně velké mandibulární žlázy se vyskytují u vojáků podčeledi Nasutitermitinae (Termitidae), u kterých jsou mandibuly zcela zakrnělé, a proto bylo spekulováno o obranné funkci těchto žláz (Constantino a Costa-Leonardo, 1997). U druhu *Kaloterme flavicollis* jsou žlázy mnohem větší u pohlavních jedinců (Noirot, 1969). U druhu *Prorhinotermes simplex* jsou žlázy největší u pseudergátů a imag (Šobotník a Hubert, 2003). O původu sekrecí není nic známo, ale Greenberg a Plavcan (1986) poukazují na přítomnost uhlovodíků v mandibulárních žlázách druhu *Zootermopsis angusticollis* (Archotermopsidae). Funkce mandibulárních žláz není známá a pravděpodobně se liší mezi druhy. Především velikost žlázy koreluje s přepokládanou žvýkací aktivitou různých

kast u druhu *Prorhinotermes simplex*, takže se přepokládá prevence poškození mandibulárních kondylů (Šobotník a Hubert, 2003).

#### 1.8.7. Akcesorické mandibulární žlázy

Tyto žlázy byly zatím pozorovány pouze u dvou druhů termitů, *Zootermopsis angusticollis* a *Z. nevadensis* (Archotermopsidae). Tyto žlázy jsou umístěny blízko mandibulárních žláz, a představují invaginace tvaru trojprsté rukavice v kutikule předústní dutiny. Sekrece těchto žláz obsahuje uhlovodíky neznámé funkce (Greenberg a Plavcan, 1986). Kromě výše citovaných autorů, dosud nebyla publikována žádná další práce, a tedy účel žláz nebo například ultrastruktura zůstává neznámá.

#### 1.8.8. Intramandibulární žláza

Tato párová žláza na bázích mandibul byla zatím pozorována pouze u vojáků druhu *Machadotermes inflatus* (Termitidae: Apicotermatinae). Veškerý popis této žlázy je založen na pozorování skenovacím elektronovým mikroskopem, a je jediným známým faktem to, že sekrece je uvolňována z pórů na povrchu bází mandibul (Deligne et al., 1981).

#### 1.8.9. Tarsální žláza

Tarsální žlázy se vyskytují v distální části tibií a na proximálních tarsomerech řady druhů termitů a jsou vždy tvořeny skupinami buněk III. třídy. Vyústění je většinou shloučeno na pórovitých destičkách, které byly popsány u všech zkoumaných druhů na všech končetinách (Bacchus, 1979; Šobotník a Weyda 2001, Costa-Leonardo et al., 2015a). Byly nalezeny u druhu *Kalotermes flavicollis* (u ostatních druhů čeledi Kalotermitidae tento typ žláz chybí), a naopak se vyskytují u všech zástupců Rhinotermitidae a Serritermitidae kromě *Prorhinotermes simplex*. U Termitidae byly nalezeny u všech druhů podčeledi Termitinae, většiny druhů Nasutitermitinae, ale chybí u podčeledí Apicotermatinae a Macrotermatinae.

Žlázy se vždy vyskytují na prvním a/nebo druhém tarsálním článku, někdy také na distální části holeně (Kalotermitidae: *Kalotermes flavicollis*, Rhinotermitidae) nebo i na třetím tarsálním článku (Kalotermitidae: *Kalotermes flavicollis*, Termitidae). Informace o umístění této žlázy jsou poměrně vzácné, protože v současné době bylo prozkoumáno pouze necelých 40 druhů (Bacchus, 1979; Soares a Costa-Leonardo, 2002; Costa-Leonardo, 1994; Šobotník a Weyda, 2001). Články zaměřené na ultrastrukturu tarsální žlázy a její ontogenezi byl napsány o druhu *Reticulitermes lucifugus* (Rhinotermitidae) (Šobotník a Weyda, 2001) a u druhů *Heterotermes tenuis* (Rhinotermitidae), *Coptotermes*

*gestroi* (Rhinotermitidae) a *Silvestritermes euamignathus* (Termitidae) (Costa-Leonardo et al., 2015b).

První práce (Šobotník a Weyda, 2001) ukazuje, že sekreční buňky tarsálních žláz tvoří souvislou vrstvu od distální části holeně do proximální části třetího tarsálního článku. Sekreční buňky obsahují převážně drsné endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát. Tarsální žlázy chybí u larev prvního instaru a během života se zvyšuje počet vývodů žlázy. Počet pórovitých destiček je nižší u nepohlavních kast v porovnání s nymfami, imagy nebo neoteniky. V druhé práci (Costa-Leonardo et al., 2015b) byly destičky s póry nalezeny na distální části holeně a na prvním a druhém tarsomeru druhů *H. tenius* a *C. gestroi*. U druhu *S. euamignathus* byly póry roztroušené na ventrální části prvního, druhé a třetího tarsálního článku a na distální části holeně. U všech třech druhů sekreční póry korespondovaly se sekrečními buňkami III. třídy složených ze sekreční buňky a kanálkové buňky. U všech studovaných druhů byly sekrece elektron-lucentní povahy a vývody žláz byly přítomny na všech párech končetin. V sekrečních buňkách bylo pozorováno velké množství ribozomů a velmi dobře vyvinutý Golgiho komplex, což poukazuje na velkou sekreční aktivitu. U druhu *S. euamignathus* bylo také pozorováno velké množství drsného endoplasmatického retikula. Funkce žlázy stále zůstává diskutabilní, pravděpodobně se nejedná o produkci stopovacího feromonu, jehož sekrece jsou většinou lipidické. Jako možnost se jeví produkce sekrecí k čištění tykadel nebo jak již bylo zmíněno Bacchusem (1979) sekrece tarsálních žláz mohou sloužit jako obrana proti malým predátorům.

#### 1.8.10. Sternální žláza

Sternální žláza je přítomna u všech druhů termitů a jejich kast, a její struktura doznala zajímavých evolučních změn, neboť počet sternálních žláz a jejich umístění se liší mezi jednotlivými taxony (Quennedey et al., 2008). U čeledi Mastotermitidae najdeme tři ekvivalentní sternální žlázy (na třetím, čtvrtém a pátém abdominálním sternitu) složené pouze z buněk I. třídy (Ampion a Quennedey, 1981). U čeledí Archotermopsidae, Hodotermitidae a Stolotermitidae žlázu najdeme na čtvrtém abdominálním sternitu. Je složena z buněk I. a II. třídy u čeledi Archotermopsidae, respektive I., II. a III. třídy u čeledi Hodotermitidae. Sternální žláza je u všech ostatních čeledí na pátém abdominálním článku. U čeledi Kalotermitidae je tvořena buňkami I. a II. třídy. Nejkomplexnější stavba sternálních žláz se vyskytuje u čeledi Rhinotermitidae, kde se žláza skládá z buněk I. a II. třídy a dvou typů buněk III. třídy. U čeledi Termitidae je žláza vždy tvořena buňkami I. a II. třídy a buňky III. třídy najdeme pouze u podčeledí Macrotermitinae a Termitinae (Ampion a Quennedey, 1981; Noirot, 1995). Finální sekrece je ukládána v samostatném zásobníku

tvořeném přední částí 5. sternitu krytém zadní částí 4. sternitu. Skupiny campaniformních sensil jsou ve sternálních žlázách přítomny u všech čeledí termitů. Jejich funkce je informovat o tlaku abdomenu na substrát a kontrolovat tak uvolňování feromonů (Stuart, 1963). Navíc tyto žlázy u čeledi Mastotermitidae, Archotermopsidae a Kalotermitidae jsou přímo involvovány, zatímco u ostatních čeledí involvace chybí a sternální žláza je zřejmě kontrolována pouze hormonálně (Quennedey, 1969).

Sekrece sternální žlázy slouží většinou jako stopovací feromon. U druhů, kterým chybí tergální žlázy také plní funkci sexuálních feromonů. V takových případech je žláza hypertrofovaná, nejvíce v oblasti buněk první a druhé třídy (Ampion a Quennedey, 1981). Nejčastějším stopovacím feromonem je (3Z,6Z,8E)-3,6,8-dodecatrien-1-ol, který byl zjištěn u velkého počtu druhů odvozených čeledí (Howard et al., 1976; Ladugue et al., 1994; Tokoro et al., 1994). Neocembrene byl nalezen v sekreci sternální žlázy některých druhů Nasutitermitinae (Termitidae) (Moore, 1966; McDowell a Oloo, 1984).

#### 1.8.11. Tergální a posteriorní sternální žláza

Tergální žlázy jsou vyvinuté na abdominálních tergitech imag, a pouze u samic u odvozených skupin. Tergální žlázy byly ztraceny několikrát nezávisle, a jejich funkci pak přebírá sternální žláza. Tergální žlázy jsou přítomny na posteriorních tergitech, nejčastěji na posledních dvou nebo třech (Noirot, 1969; Ampion a Quennedey 1981). Vyšší počet tergálních žláz se objevuje u čeledi Mastotermitidae a to na všech abdominálních tergitech a sekundárně u rodu *Macrotermes*, v závislosti na druhu na posledních čtyřech až osmi tergitech (Ampion a Quennedey, 1981).

Posteriorní sternální žláza vždy vykazuje stejnou strukturu jako tergální žláza. Byly nalezeny u obou pohlaví druhu *Mastotermes darwiniensis* (Mastotermitidae), u samců na šestém až devátém sternitu, a na šestém a sedmém u samic. Zatímco u rodů *Porotermes*, *Stolotermes* (Stolotermitidae) a *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae) byly popsány pouze u samců, a to na osmém a devátém sternitu (Ampion a Quennedey, 1981; Šobotník et al., 2005). Buněčná struktura tergálních žláz a posterionálních sternálních žláz se liší mezi druhy, nicméně data poskytnutá Ampionem a Quennedeyem (1981) nemusí být správná, neboť autoři použili pouze metody optické mikroskopie. Na druhou stranu Ampion a Quennedey (1981) studovali sternální, posteriorní sternální a tergální žlázy u zhruba stovky druhů termitů, které patřily ke všem hlavním skupinám termitů, kromě čeledí Stylotermitidae a Serritermitidae. U *Cornitermes bequaerti* (Termitidae: Syntermitinae) i *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae) tergální žlázy obsahují velký počet buněk I. a II. třídy, zatímco buňky III. třídy jsou přítomny jen vzácně (Bordereau et

al., 2002; Šobotník et al., 2005). Tergální žláza se vyvinula pro atrakci opačného pohlaví (Noirot, 1969). V současné době jedinou látkou identifikovanou v sekreci tergální žlázy je (3Z, 6Z, 8E)-dodecatrien-1-ol zjištěná u druhu *Cornitermes bequaerti* (Bordereau et al., 2002).

#### 1.8.12. Klypeální žláza

Klypeální žláza je přítomna u většiny imag Neoisoptera, kromě rodu *Aparatermes* a *Anoplotermes janus* (oba Termitidae: Apicotermitinae), kde byla pravděpodobně ztracena sekundárně (Křížková et al., 2014). Žláza je lokalizována na dorsální straně hlavy a zasahuje od posterální části labra po anteklypeus. Skládá se z buněk I. a III. třídy. Buňky I. třídy jsou početnější, tvoří apikální mikrovilly, obsahují velké množství hrubého endoplazmatického retikula a menší množství hladkého endoplazmatického retikula v cytoplasmě. Sekrece se vyskytuje ve formě elektron-densních granulí a méně často ve formě elektron-lucentních vesikulů. Ultrastruktura buněk III. třídy je podobná buňkám I. třídy a nejčastější sekreční organelou je drsné endoplazmatické retikulum. Buňky tvořící sekreční kanálek jsou u této žlázy výjimečné, neboť nesou větší množství kanálků, nebo alternativně je kanálek v buňce stočen a na řezech se objevuje jako průřez několika kanálků (Křížková et al., 2014). Elektron-densní granule a drsné endoplazmatické retikulum na jedné straně indikují, že sekrece je proteinová, hladké endoplazmatické retikulum na straně druhé je spojováno s těkavými sekrecemi (Percy-Cunningham a MacDonald, 1987; Tillman et al., 1999). Můžeme tedy pouze odhadovat, že možné funkce mohou být signalizování reprodukčního stavu krále a královny nebo označování orální části pohlavních jedinců, což umožňuje dělníkům jejich krmení. Pohlavní jedinci jsou známí tím, že aktivně neprosí o potravu (Kawatsu, 2013), a sekrece této žlázy tedy může dávat signál dělníkům k začátku krmení nebo nalezení orální části těla (Křížková et al., 2014).

#### 1.8.13. Hypofaryngeální žláza

Tato žláza byla nalezena u dělníků, vojáků a alátů patřících mezi bazální čeledi Mastotermitidae, Hodotermitidae a Kalotermitidae. Tato párová vakovitá žláza je umístěna uvnitř hypofaryngu a její vyústění je štěrbinové (Brossut, 1973). Ultrastruktura ani povaha sekrece nebyla dosud zkoumána.

#### 1.8.14. Rostrální žláza

Rostrální žláza byla pozorována u vojáků druhů *Verrucositermes hirtus* (Nasutitermitinae) (Deligne, 1983) a *Embiratermes festivellus* (Syntermitinae) (Costa-Leonardo a Barsotti, 1996). Přestože ultrastruktura této žlázy nebyla nikdy studována,

pozorování ze skenovacího elektronového mikroskopu naznačují, že je tvořena buňkami III. třídy, jejichž vývody ústí ve skupinkách po dvou až sedmi na vrcholu protuberancí na hlavě. Tyto pyramidové struktury jsou umístěny na dorsální a laterální části hlavy a nasu (Deligne, 1983). Funkce sekrečních buněk není známa. Podle Deligne et al. (1981) spočívá funkce buněk III. třídy na nasu *Nasutitermitinae* v produkci sekrece, která brání vojákům v zachycení se do své vlastní lepkavé sekrece.

#### 1.8.15. Dehiscentní žláza

Tento párový obranný orgán byl popsán jako žláza (Costa-Leonardo, 2004) a později byl přejmenován na dehiscentní orgán (Poiani a Costa-Leonardo, 2016). Vyskytuje se pouze u dělníků rodu *Ruptitermes* (Termitidae: Apicotermatinae). *Ruptitermes* patří do takzvané „*Anoplotermes-group*“, což je bezvojákatá skupina termitů, a proto byla obranná funkce převzata dělníky (Sands, 1982). Přestože dělníci této skupiny disponují mandibulami především pro zpracování potravy a nikoli pro boj, vykazují mnoho nových způsobů obrany, a to jak z hlediska strukturální adaptace, tak z hlediska chování, což zahrnuje novou obrannou žlázu nebo například sebevražedné chování (Costa-Leonardo, 2004).

Dehiscentní žlázy jsou umístěny v blízkosti labiálních žláz, v posteriolní části thoraxu a anteriorní části abdomenu, kde jsou žlázy viditelné zkrz tělesnou stěnu jako bělavé oblasti. Tyto žlázy jsou jediným exokrinním orgánem hmyzu, který není epidermálního ale mesodermálního původu (Poiani a Costa-Leonardo, 2016), což také znamená, že se jejich charakteristika nehodí na žádnou třídu buněk dle klasifikace (Noirot a Quennedey, 1974). Každá žláza je tvořena stovkami částí, které produkují sekreci do centrální vakuoly. Není zde žádný kanálek nebo otvor a sekrece je uvolněna autothysí, tedy protržením tělesné stěny usnadněné pomocí speciálních svalů připojených na dehiscentní žlázu (Costa-Leonardo, 2004). Jednotlivé části mají eliptický tvar, který drží pohromadě pojivové tkáně, které také oddělují žlázu od hemocoelu. Buňky u funkčních žláz mají nízký počet organel, jádra většinou chybí, a buňky jsou většinou vyplněny sekrecí (Poiani a Costa-Leonardo, 2016). Složení sekrece bylo identifikováno jako směs proteinů s vysokou molekulovou hmotností (Poiani a Costa-Leonardo, 2016). Sekrece je jednoznačně obranná a tuhne po vystavení vzduchu, což znehybní protivníky, především mravence, pro které je zasažení často smrtelné (Howse, 1984; Mill, 1984).

#### 1.8.16. Nasální žláza

Bazální část nasu u vojáků rodu *Angularitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) má drsný povrch s množstvím kutikulárních jamek nesoucích jedno nebo více vyústění

sekrečních buněk na svém dnu (Šobotník et al., 2015). Žláza se skládá ze dvou vrstev, vnější se skládá z buněk I. a III. třídy, a vnitřní z buněk II. třídy. Tato kombinace všech tří typů buněk je velmi vzácná a byla pozorována pouze u sternální, posteriorní sternální a tergální žlázy některých termitů a švábů (Ampion a Quennedey, 1981; Quennedey et al., 2008; Šobotník et al., 2003, 2005). Buňky I. třídy vykazují relativně nižší aktivitu v porovnání s dalšími dvěma typy. Buňky II. typu uvolňují kapky tuku do mezibuněčného prostoru, buňky III. třídy vstřebávají tuto sekreci a uvolňují mimo tělo termita. Jedná se o naprosto vyjímečný úkaz, protože doposud bylo vstřebávání sekrece buněk II. třídy popsáno pouze u buněk I. třídy (Quennedey, 1998; Quennedey et al., 2008; Šobotník et al., 2003, 2005). Sekrece nasální žlázy je (dle ultrastrukturuálních pozorování) lipidová a proteinová. Lipidové substance by mohly být obranným allomonem, protože behaviorální testy ukázaly že *Angularitermes* produkuje kontaktní jedy nebo dráždivé látky (Šobotník et al., 2015). Nicméně stále není vyloučena ani hypotéza produkce rozpustných látek pro sekreci frontální žlázy, tak jak bylo zmíněno u rostrální žlázy (Deligne et al., 1981; Šobotník et al., 2005).

#### 1.8.17. Krystalová žláza

Krystalová žláza je párový orgán specifický pouze pro dělníky druhu *Neocapritermes taracua* (Termitidae: Termitinae). Kolonie těchto hlínožravých termitů jsou z velké většiny tvořeny pouze dělníky a kasta vojáků většinou tvoří méně než 1 % populace (Krishna a Araujo, 1968). Dělníci disponují dvousložkovou obranou, labiální žlázu jejíž aciny uvolňují do hemocoelu granule a krystalové žlázy produkující modré krystaly uložené ve vchlípeninách tvořených metanotem překrývajícím první abdominální terg. Ke smíchání produktů obou žláz dochází během sebeobětování (protržení tělesné stěny), kdy v kapce hemolymfy dojde ke smíchání prekurzorů produkovaných labiálními žlázami s modrými krystaly, a výsledná tekutina má toxickou a znehybňující povahu (Šobotník et al., 2012). Granule produkované labiální žlázou, jsou překvapivě produkovány parietálními buňkami acinů, které jsou normálně zodpovědné pouze za přenos vody do labiální žlázy. Dominantní složkou granulí je řada relativně neškodných hydrochinonových analogů, zatímco modré krystaly jsou tvořeny výhradně specifickou lakázou BP76, která velmi rychle přemění hydrochinony na vysoce toxické benzochinony (Bourguignon et al., 2016). Objem granulí i hmotnost modrých krystalů stoupá během života dělníka a pouze největší granule vstupují do hemocoelu, ačkoli stále zůstávají spojené s aciny díky vlastnostem bazální membrány (Šobotník et al., 2012, 2014). Krystalové žlázy jsou umístěny na přední straně každé vchlípeniny. Jsou tvořeny sekrečními buňkami III. třídy. Sekreční buňky



vykazují změny závislé na věku. U mladých dělníků (bez modrých krystalů) vykazují relativně malou sekreční aktivitu, jak bylo prokázáno relativně nízkým objemem hrubého endoplazmatického retikula. Sekreční aktivita dosahuje vrcholu u středně starých dělníků (s tvořícími se modrými krystaly) a u starých jedinců (s velkými modrými krystaly) opět klesá (Šobotník et al., 2014). Mladší dělníci se nacházejí především v hnízdě, zatímco starší jedinci mnohem častěji sbírají potravu mimo hnízdo, což je mnohem rizikovější činnost v porovnání s péčí o hnízdo. Další důležitým rozdílem mezi mladými a starými dělníky je rostoucí agresivita a mnohem snažší protržení tělesné stěny. Takto komplexní příklad polyethismu nebyl dosud popsán u žádného druhu termita (Šobotník et al., 2012).

#### 1.8.18. Laterothorakální žláza

Tyto žlázy byly pozorovány na meso- a meta-thorakálních pleuritech dělníků a vojáků u tří nepříbuzných druhů Termitidae, což naznačuje mnohem širší rozšíření této žlázy. Každá žláza se skládá zhruba ze sta sekrečních buněk III. třídy a příslušných buněk s kanálky. Hladké endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát jsou nejčastějšími sekrečními organelami buněk. Sekrece pravděpodobně není proteinové povahy, což, stejně jako absence rezervoáru, ukazuje na komunikační funkci sekrece (Gonçalves et al., 2010).

#### 1.8.19. Epidermální tegumentální žláza

Byla popsána pouze u neotenických pohlavních jedinců druhu *Proterhinotermes simplex* (Rhinotermitidae) (Šobotník et al., 2003). Většina epidermis neoteniků je modifikována v tuto žlázu, s výjimkou buněk intersegmentálních membrán a endoskeletu. Jsou zde přítomny sekreční buňky I. a III. třídy, a to ve zhruba stejném množství. Buňky I. třídy obsahují velké množství hladkého endoplazmatického retikula a menší množství hrubého a sekrece je ve formě elektron-densních granulí. Buňky III. třídy produkují proteinové sekrece díky vysokému množství hrubého endoplazmatického retikula a buňky jsou často vyplněny elektron-lucentními vakuolami. Překvapivě také kanálkové buňky vykazují částečnou sekreční aktivitu, obsahují drsné endoplazmatické retikulum a velké množství mitochondrií (Šobotník et al., 2003). Sekrece žlázy je tvořena dvěma typy látek – těkavými a proteinovými. Volatilní složka je syntetizována buňkami I. třídy, zatímco buňky III. třídy s korespondujícími kanálkovými buňkami vylučují proteinové substance. Žláza pravděpodobně produkuje feromon, který pomáhá udržovat optimální počet neotenických pohlavních jedinců. V případě ztráty pohlavních jedinců, byli noví neotenici formováni během 17 dnů (Šobotník et al., 2003) a produkce tohoto feromonu tedy musí být stálá. Proteinová složka může sloužit jako atraktant pro častou péči od ostatních kast

(Maistrello a Sbrenna, 1999) a také pro zajištění šíření feromonu mezi všechny jedince v kolonii.

#### 1.8.20. Spermathekální žláza

Tato žláza byla studována u alátních/dealátních samic patřících do čeledí Archotermopsidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae a Termitidae, což naznačuje, že bude přítomna u všech skupin termitů (Costa-Leonardo a Patricio, 2005; Raina et al., 2007). Sekreční epitel uvnitř spermatéky je potažen kutikulou, což naznačuje, že žláza je ektodermálního původu. Žláza má prstový tvar shodný s tvarem spermatekálního lumenu (Costa-Leonardo a Patricio, 2005; Raina et al., 2007). Je tvořena sekrečními buňkami III. třídy s velkým množstvím drsného endoplazmatického retikula, které je zde jednoznačně nejčastější organelou (Raina et al., 2007). Sekrece je vylučována dovnitř lumenu, kde pravděpodobně poskytuje proteiny pro výživu spermií v době jejich uložení mezi spářením a oplodněním vajíček (Costa-Leonardo a Patricio, 2005).

#### 1.8.21. Integumentální žláza

Tato žláza byla popsána u druhu *Kaloterмес flavicollis* (Kalotermitidae) (Leis a Sbrenna, 1983). Je přítomna u všech kast, ale nejvyššího rozvoje dosahuje u vojáků. Žláza je tvořena sekrečními buňkami III. třídy rozptýlenými po celé hlavě, thoraxu a abdomenu. Hladké endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex jsou nejčastějšími sekrečními organelami. Sekreční inkluze se vyskytují ve dvou formách, elektron-lucentních vakuol a granulí obsahujících fibriální materiál. Sekrece tedy bude mít dvě funkce, pravděpodobně těkavou, sloužící jako feromon (elektron-lucentní vakuoly) a druhou blíže neurčenou funkci (granule). Sekrece obou typů se postupně kumulují a nevyšší množství je nalezeno u starých vojáků (Leis a Sbrenna, 1983). Autoři studií věří že primární funkcí sekrece je údržba kutikulárních vrstev a sekundární je feromon s neznámou funkcí, bohužel ani jedna z těchto funkcí nebyla zatím prokázána.

#### 1.8.22. Pleuroabdominální žláza

Tato žláza byla pozorována pouze u královen druhu *Cubitermes fungifaber* (Termitidae: Cubitermitinae), i když byly zkoumány i další druhy rodu *Cubitermes* (Ampion, 1980; Grassé, 1982). Žlázy jsou umístěny od třetího po pátý abdominální pleurit. Žláza je vyvinuta jako epidermální ztlustění tvořené sekrečními buňkami III. třídy. Ultrastruktura pleuroabdominální žlázy zatím nebyla prostudována a ani povaha sekrece není známa. Ale vzhledem k tomu, že u tohoto druhu zcela chybí tergální žlázy (Ampion a Quennedey, 1981) a pleuroabdominální žlázy jsou přítomny pouze u alátních samic, je zde

velká pravděpodobnost, že žlázy produkují sex feromony nebo podobné látky nutné pro kohezi královského páru.

#### 1.8.23. Posteriovní tergální žláza

Tato žláza byla pozorována pouze u alátních samic rodu *Cornitermes* (Termitidae: Syntermitinae) (Costa-Leonardo a Haifig, 2010). Autoři se domnívají, že je tato žláza funkčně srovnatelná s epidermální tegumentální žlázou, ale jako samostatná žláza je popsána kvůli odlišnému umístění a ultrastruktuře. Vývody jsou umístěny na intersegmentálních membránách 8. a 9. tergitu. Žlázu tvoří pouze sekreční buňky III. třídy a vykazují vysoký výskyt hladkého endoplazmatického retikula a velké množství sekrečních váčků s různou elektronovou densitou. Sekrece žlázy se míchá se sekrecí žlázy tergální v kapse tvořené intersegmentální membránou a překryvem následujícím tergitem. Povaha sekrece zatím nebyla studována, ale pozorování ultrastruktury naznačuje rozdílné povahy zahrnující proteinové sekrece a těkavé látky. Funkce sekrece by měla být velmi blízká sekreci tergálních žláz (Costa-Leonardo a Haifig, 2010).

## 2) Metodika

Veškerá metodika je popsána v publikovaných člancích, které jsou přiloženy v kapitole 5) Výsledky. V této kapitole je tedy uvedeno pouze stručné shrnutí, případně doplňující informace, které nejsou uvedeny v jednotlivých publikacích.

## 2.1. Použitý materiál

Věškerý použitý materiál byl legálně importován nebo odchován v univerzitních chovech (ČZU, FLD). Jednalo se tedy o divoké populace nebo jedince chované v zajetí, vzhledem k dlouhověkosti kolonií, maximálně o generace F1 a nelze tedy hovořit o inbredních jedincích. Kompletní přehledy a seznamy druhů (včetně lokalit původu) jsou uvedeny ve výsledcích, část I, II, III a IV, celkem bylo použito více jak 30 druhů termitů, jednoho švába druhu *Cryptocercus punctulatus*, který je zástupcem sesterské skupiny ke všem termitům (Kap. 3, část III).

Pro přímé pozorování živých termitů (porovnání tvaru průsvitné špičky; Kap. 3. část II, Fig. 1) byly použity fotoaparáty Canon EOS 6D a Canon EOS 5D SR, objektivy Canon EF 100 mm f/2.8L Macro IS USM a Canon MP-E 65 mm f/2.8 a blesk Canon Macro Twin Lite MT-24EX. Veškerý materiál byl focen v laboratorních podmínkách. Jedinci byli foceni na filtračním papíru v plastových Petriho miskách a v případě potřeby znehybnění podchlazením.

## 2.2. Mikroskopie

### 2.2.1 Příprava vzorků

Materiál pro optickou mikroskopii a transmisní elektronový mikroskop byl fixován v 2% glutaraldehydu, 2,5% formaldehydu v 0.1 M fosfátovém pufru na 24 hodin, v tomto roztoku byli předtím jedinci také usmrceni a rozdělení na požadované části (hlava, hrud' a abdomen). Také jim byly odstraněny končetiny, tykadla a vojákům vylomeny mandibuly, popřípadě u hlínožravých druhů bylo z dělníků extrahováno střevo. Postfixace v 2% oxidu osmičelém byla následována odvodněním v 50% až 100% acetonu (koncentrace zvyšována po 10 % každých 30 minut) a vzorky byly poté převedeny do pryskyřice Spurr (standartní pro elektronovu mikroskopii) (Kap. 3, část I, II, III). Polymerizace v silikonových formičkách trvala 8 hodin při teplotě 70°C.

Materiál pro skenovací elektronový mikroskop byl zafixován v alkoholu (často se jednalo o jedince sbírané již v terénu). Následně byly vzorky převedeny do acetonu 80 – 100% (vždy zvýšení koncentrace o 10 % každých 30 minut), vysušeny metodou kritického bodu, přilepeny na hliníkový držák s použitím termoplastického lepidla a pozlaceny (Kap. 3, část II a III).

Vzorky pro histologii byly zafixovány v alkoholu (často se jednalo o jedince sbírané již v terénu). Tyto vzorky byly převedeny do xylenu a následně zality do parafínu při teplotách 56-58 C° po dobu dvou hodin (Kap. 3, část II).

### 2.2.2. Optická a elektronová mikroskopie

Vzorky v pryskyřici byly následně nakrájeny na ultramikrotomu Reichert-Jung Ultracut E na tloušťku 0.5  $\mu\text{m}$  a použity pro optický mikroskop (Nikon Eclipse *Ni*). Ultratenké řezy (kolem 60 nm tloušťky) pro transmisní elektronový mikroskop byly studovány elektronovým mikroskopem JEOL JEM-1011 s kamerou Veleta a iTEM 5.1 softwarem. Měření bylo prováděno pomocí softwaru Nikon NIS-Elements, kde byla popsána stavba a struktura žláz, zhodnoceny velikosti a tloušťky buněk, kutikuly, mitochondrií, přítomnost mikrovillů, SER, RER atd. a tato data budou porovnána jak mezidruhově, tak mezi jednotlivými zkoumanými kastami (Kap. 3, část I, II, III).

Pro skenovací elektronovou mikroskopii byl použit mikroskop Jeol 6380 LV (Kap. 3, část II) a FEI Helios NanoLab 660 G3 UC (Kap. 3., část III).

Vzorky pro histologii byly nakrájeny na tloušťky 5-10  $\mu\text{m}$  za pomocí microtomu Bamed pfm Rotary 3004 M a pozorovány v optickém mikroskopu Nikon Eclipse *Ni* (Kap. 3, část II).

### 2.3. Behaviorální pokusy

V kap. 3, část III, byly použity dva druhy biologických zkoušek. V prvním typu experimentu byly použity druhy *Glossotermes oculatus* a *Coptotermes testaceus*. Druhy byly vždy ve skupinách pěti dělníků a dvou vojáků, ke kterým byl vždy vložen jeden narušitel (dělník cizího druhu termita nebo mravenec). Chování vyplývající z jejich setkání bylo zaznamenáno a specifické znaky chování byly následně analyzovány. Veškeré pokusy probíhaly pod umělým červeným světlem, které nebylo zaznamenatelné pro použité druhy. V druhém typu pokusů byly vypitvnány labrální extrakty z 60 vojáků druhu *Prorhinotermes canalifrons* ve čtyřech opakováních. Tyto extrakty byly následně vloženy do 400  $\mu$ L hexanu a methanolu (vždy dvě sady pro každou látku) a následně použity v behaviorálním testu (s šesti opakováními pro každý stimul). Tyto testy spočívaly ve vložení skupin druhu *Prorhinotermes canalifrons* (vždy osm dělníků a dva vojáci) do Petriho misky rozdělené filtračním papírem na dva sektory: labrální extrakt oproti kontrolnímu extraktu (roztok s fixovanými končetinami stejným způsobem jako labrální extrakt nebo čistý roztok). Tento pokus byl proveden v šesti opakováních také pro druh *Reticulitermes flavipes* (skupiny šesti dělníky a dvěma vojáky), pro otestování možného efektu na odlišném druhu. Vyhodnocení bylo stejné pro oba druhy, a to tak že byly popočítány počty termitů v každém sektoru deset minut po vložení termitů do misky. Počty termitů v sektoru ošetřeném labrálním extraktem oproti počtu v kontrolní polovině byly porovnány Studentovým t-testem.

Všechny testy v kap. 3, část IV proběhly při konstantní teplotě 26°C umělým červeným světlem, které bylo pro vybrané druhy mimo viditelné spektrum. V rámci prvního experimentu bylo cílem zjistit jak vojáci a dělníci druhu *Reticulitermes flavipes* reagují na různé stimuly nebezpečí. Pro zamezení sociální deprivace byly vytvořeny skupiny (celkem 12) skládající se z 38 dělníků a 2 vojáků, což je poměr kast odpovídající poměru vyskytujícímu se v přírodě. Tyto skupiny byly vloženy do Petriho misek o průměru 85 mm a pokrytých filtračním papírem. Skupiny byly ponechány v klidu po dvě hodiny před každým testem. Stimuly nebezpečí byly rozděleny následovně: (i) záblesk světla (po dobu tří sekund, intensity 800 lx, teplota barvy světla 5500-6000 K); (ii) závan větru (zavedený tenkým brčkem po dobu tří sekund); (iii) vložení jedné rozmáčknuté hlavy dělníka; (iv) vložení jedné rozmáčknuté hlavy vojáka. Rozmáčknuté hlavy byly připraveny odříznutím hlavy termita na úrovni prothoraxu a byly rozmáčkнутy na filtračním papíru za pomoci jemné špachtle tak, aby byl filtrační papír napuštěn obsahem frontální žlázy, u které je známo že produkuje výstražné feromony (Reinhard a Clément, 2002). Jako kontrola pro

stimuly (i) a (ii) bylo použito pozorování chování bez vyrušení a pro stimuly (iii) a (iv) byl vložen čistý filtrační papír. Vložení filtračního papíru proběhlo zkrz drobný otvor uprostřed víčka. Každý stimul proběhl šestkrát v náhodném pořadí a na náhodných skupinách (3 stimuly pro každou skupinu). Reakce byly zaznamenány tři minuty před stimulem a šest minut po stimulu. Jako rozhodující faktor pro vyhodnocení stresu byla vybrána rychlost pohybu jedinců. Dle hypotézy by se tato rychlost měla zvyšovat u prchajících dělníků a u bránících se vojáků (Reinhard a Clément, 2002; Šobotník et al., 2008, 2010b). Z každé skupiny byli sledováni dva náhodní dělníci a oba vojáci. Rychlost pohybu byla vyhodnocena pomocí Mouse-Tracker Software.



## 2.4. Chemické analýzy

Pro chemické pokusy byly použity vzorky 100 laber a 100 končetin (jako kontrola) extrahované do methanolu nebo hexanu. Všechny vzorky byly testovány na plynovém chromatographu 6890N spárovaným s čtyřpólovým hmotovým spektrometrem 5975B vybaveným HP5ms kapilární kolonou z taveného oxidu křemičitého (30 m x 0,25mm, 0,25  $\mu$ m). Nosným plynem bylo helium s průtokem 1mL/min. Injektor byl provozován v režimu dělení (10:1) při teplotě 200 °C, injektováno byl vždy 1 $\mu$ L. Programovaná teplota byla následující: 40 °C (2 min), dále zvyšována 8 °C/min až na 200 °C a následně zvyšována po 15 °C/min až na 320 °C (3 min). Bylo zaznamenáno standardní 70-eV spektrum v rozsahu 25-600  $m/z$ ; a také bylo použito 4 minutové zpoždění rozpouštědel. Teploty pro přenosové linky; zdroj iontů a kvadrupólový spektrometr byly 280, 230 a 150 °C. Chemické profily extraktů laber a končetin byly porovnány pro zjištění specifických látek tvořených labrální žlázou (viz kap. 3, část III).

V kap. 3, část IV proběhly dva chemické pokusy pro identifikaci alarmových složek dělníků a vojáků druhu *Reticulitermes flavipes*. V prvním experimentu bylo dvacet jedinců rozříznuto na úrovni prothoraxu a přední části byly extrahovány do 60  $\mu$ l a 40  $\mu$ l hexanu. Obě extrakce byly uloženy na 48 hodin při teplotě 4 °C. Následně byly obě extrakce smíchány a následně injektovány do plynového chromatographu 6890N. Nejčastěji se vyskytující látky identifikovány dle spektrálních charakteristik a dříve publikovaných výsledků (Šobotník et al., 2010c). V druhém experimentu bylo rozdrceno 5 hlav jedinců od každé kasty v 1,2ml skleněné lahvičce pomocí Pausterovi pipety. Prostorové extrakce volatilních látek byly extrahovány pomocí SPME držákem vláken, který byl pro manuální extrakci potažen křemenným povlakem s 30 $\mu$ m polydimethylsiloxanem. Analýzy byly desorbovány při teplotě 220 °C v dělicím/nedělicím injektoru hmotového spektrometru 5975B spárovaným s plynovým chromatographem. Separace byla dosažena v DB-5 ms kapilární koloně (30 m x 0,25 mm) při konstantním proudění (1 ml/min). Počáteční teplota kolony byla 40 °C (1 min), dále byla zvyšována po 5 °C/min až na teplotu 200 °C a dále zvyšována po 15 °C/min až na teplotu 320 °C (3 min).

## 2.5. Vibroakustické pokusy

Pro rozklíčování složek vibračního chování *Reticulitermes flavipes* bylo použito nové skupiny termitů ve stejném složení jako pro behaviorální experimenty (12 skupin, 38 dělníků a 2 vojáci; viz kap. 2.3). Cílem tohoto pokusu bylo najít vazby mezi chemickou stimulací a vibrační složkou výstražné signalizace. Byla rozdrčena jedna hlava vojáka a jedna hlava dělníka, dle stejného protokolu jako v kap. 2.3. Pro zabránění absorpce vibrací, byli termiti vloženi do Petriho misky bez filtračního papíru a vlhkost byla poskytnuta kouskem mokré vaty přidělané na víčko misky. Spodní část Petriho misky byla silně zdrsňena, aby termitům poskytovala příhodný povrch pro chůzi. Experimenty probíhaly v odhlučněné místnosti pod červeným světlem, které bylo pro termity neviditelné. Všechny experimenty také probíhaly na stole zavěšeném od stropu, aby se zabránilo narušení od experimentátorů. Experimenty byly natáčeny kamerou SONY DCR-SR72, v nočním režimu, která byla zavěšena nad experimentální arénkou. Tyto nahrávky byly použity pouze pro spojení chování termitů a jimi produkovanými vibracemi, nikoli pro behaviorální experimenty. Vibrační komunikace byla nahrávána pomocí akcelerometrů Brüel and Kjær type 4507 B 005, které byly přilepeny na dno Petriho misky. Analýza vibrací proběhla pomocí rekordéru Soft dB Tenor (24 bits, snímací frekvence 48 kHz) a Matlab software (R 2012a). Prioritou pokusu bylo nahrát video s vysokým rozlišením pro každou skupinu vždy bez vyrušení a s vyrušením pro rozluštění repertoáru vibrací produkovaných vojáky a dělníky. Frekvence pod 15 Hz byly označeny jako nízkofrekvenční a nad 15 Hz jako vysokofrekvenční. Tyto předběžné testy byly také použity pro determinaci nastavení optimálních parametrů frekvenčních filtrů použitých pro následné zpracování vibračních nahrávek *Reticulitermes flavipes* v popsáném prostředí a vedlo to také k redukování šumu v pozadí. V těchto pokusech, protože se termití signály překrývaly, nebylo možné analyzovat jednotlivé signály. Proto byla vypočtena celková hodnota energie vyprodukovaná vibračními signály pro každou skupinu poté, co došlo ke stimulu. Tato proměnná  $E_r$  byla vypočtena pomocí následující rovnice:

$$E_R = 10. \log \left[ \frac{T_B \int_0^{T_A} |x_f(t)|^2 dt}{T_A \int_{-T_B}^0 |x_f(t)|^2 dt} \right]$$

Ve které je  $T_A$  hodnocení periody po vyrušení (60 s a 360 s),  $T_B$  je hodnocení periody před vyrušením (60s),  $\chi_f(t)$  je filtrovaná akcelerace signálů (pásmový filtr 50-500 Hz) a jeho funkce času ( $t$ ) (viz kap. 3, část IV).

### 3) Výsledky

Předkládaná dizertační práce je postavena na 4 článcích zabývajících se výsledky analýz a interpretací výsledků jednotlivých parciálních cílů. Na všechny tyto práce je odkazováno v rámci textu předchozích kapitol.

Tématem nově objevené orální žlázy se zabývá publikace **The oral gland, a new exocrine organ of termites**, kapitola 3, část I

Tématem funkce, evoluce a morfologie labrální žlázy se zabývá publikace **The labral gland in termite soldiers**, kapitola 3, část II a publikace **The labral gland in termites: evolution and function**, kapitola 3, část III

Tématem poplašné komunikace se zabývá publikace **Chemical and vibratory signals used in alarm communication on the termite *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae)**, kapitola 3, část IV

Část I - Orální žláza, nový exokrinní orgán termitů

**Oral gland, a new exocrine organ of termites**

**Orální žláza, nový exokrinní orgán termitů**

Autoři: Jiří Synek, Tereza Beránková, Petr Stiblík, Pierre Akama, Thomas Bourguignon, David Sillam-Dussès a Jan Šobotník

Přijato k tisku: 16. července 2019 v Arthropod Structure and Development



## The oral gland, a new exocrine organ of termites

Jiří Synek <sup>a,1</sup>, Tereza Beránková <sup>a,1</sup>, Petr Stiblík <sup>a</sup>, Jitka Pfliegerová <sup>b</sup>, Pierre D. Akama <sup>c</sup>, Thomas Bourguignon <sup>a,d</sup>, David Sillam-Dussès <sup>e,1</sup>, Jan Šobotník <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 Suchbát, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Entomology, Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic

<sup>c</sup> Département des Sciences Biologiques, Ecole Normale Supérieure, Université de Yaoundé 1, BP 47 Yaoundé, Cameroon

<sup>d</sup> Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, 1919-1 Tancha, Onna-son, Okinawa 904-0495, Japan

<sup>e</sup> Université Paris 13 – Sorbonne Paris Cité, LEEC, EA 4443, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, 93430 Villetaneuse, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 April 2019

Received in revised form

16 July 2019

Accepted 16 July 2019

## Keywords:

Blattodea

Termitoidae

Isoptera

Pharynx

Smooth endoplasmic reticulum

## ABSTRACT

Termites have a rich set of exocrine glands. These glands are located all over the body, appearing in the head, thorax, legs and abdomen. Here, we describe the oral gland, a new gland formed by no more than a few tens of Class I secretory cells. The gland is divided into two secretory regions located just behind the mouth, on the dorsal and ventral side of the pharynx, respectively. The dominant secretory organelle is a smooth endoplasmic reticulum. Secretion release is under direct control of axons located within basal invaginations of the secretory cells. The secretion is released through a modified porous cuticle located at the mouth opening. We confirmed the presence of the oral gland in workers and soldiers of several wood- and soil-feeding species of Rhinotermitidae and Termitidae, suggesting a broader distribution of the oral gland among termites. The oral gland is the smallest exocrine gland described in termites so far. We hypothesise that the oily secretion can either ease the passage of food or serve as a primer pheromone.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Termites are the most abundant insects of tropical land biotopes (Engel et al., 2009; Bar-On et al., 2018). They are decomposers of dead plant material at various decomposition stages, starting from freshly dead plant tissues, and ending with humified remnants of organic matter scattered within inorganic soil matrices (Donovan et al., 2001; Bourguignon et al., 2011). The success of termites is due to a combination of factors, including their lignocellulose diet, their complex social structures and foraging strategies, and their lifestyle in closed defensible systems of nests and galleries allowing for advanced defensive and communication abilities (Šobotník et al., 2010a; Krishna et al., 2013).

Most termite activities are mediated by exocrine organs. As many as 20 exocrine glands have previously been described in termites (Šobotník et al., 2015), and there is a growing level of understanding about their involvement in defence. The frontal gland, used in defence, is perhaps the most studied organ of

termites, and is found in soldiers, presoldiers, imagines and some workers of Neoisoptera (Quennedey, 1984; Šobotník et al., 2004, 2010a, b; Kotalová et al., 2013). The labial glands of soldiers always have defensive functions, while that of workers are usually involved in feeding activities (Noirot, 1969; Sillam-Dussès et al., 2012). One notable exception are the labial glands of *Neocapritermes taracua*, which produce the precursors of a defensive secretion released by self-sacrifice (Šobotník et al., 2012; Bourguignon et al., 2016). Additional defensive glands have evolved in workers of several taxonomic groups, such as the dehiscent glands in *Ruptitermes* spp. (Poiani and Costa-Leonardo, 2016), and the crystal glands in *N. taracua* (Šobotník et al., 2014).

Many exocrine glands are also known to be involved in communication. Such organs comprise the labral gland, helping to coordinate defensive activities (Palma-Onetto et al., 2018, 2019), the sternal gland, that secretes trail-following pheromones (Bordereau and Pasteels, 2011; Sillam-Dussès, 2010), the labial and frontal glands of soldiers, producing alarm pheromones in several species (Vrkoč et al., 1978; Pasteels and Bordereau, 1998; Cristaldo et al., 2014; Delattre et al., 2015), and the imaginal sternal, posterior sternal and tergal glands, known to produce sex pheromones (Bordereau and Pasteels, 2011; Sillam-Dussès et al., 2011). However,

\* Corresponding author.

E-mail address: [sobotnik@fd.czu.cz](mailto:sobotnik@fd.czu.cz) (J. Šobotník).

<sup>1</sup> Equal contribution.

the function of most termite glands discovered so far remains hypothetical.

During our research on termite glands, we noticed the presence of a yet-unknown exocrine organ located at the boundary between the mouth and the pharynx, just behind the mouth opening. In this paper, we describe this new gland, and name it the “oral gland”. We selected three distant termite species, *Protrichotermes simplex* (Rhinotermitidae), *Sphaerothermes sphaerotherax* (Termitidae: Sphaerotermitinae) and *Spinitermes trispinosus* (Termitidae: Termitinae), in which we report the presence of the oral gland, both in workers and soldiers.

## 2. Material and methods

### 2.1. Termite material

We used termites available alive in Prague, Czech Republic. *P. simplex* (Hagen, 1858) is kept in laboratory breeds since it was collected in Soroa, Piñar del Río (Cuba) in 1964; *S. sphaerotherax* (Sjöstedt, 1911) was imported, with legal permits from Ebogo II, Mbalmayo (Cameroon), in 2016; *S. trispinosus* (Hagen and Bates, 1858) was imported, following legal procedures, from Petit Saut (French Guiana, France) in 2016.

### 2.2. Microscopy procedures

Living termites (workers and soldiers) were fixed in a 0.1 M phosphate buffer solution with 2% glutaraldehyde and 2.5% formaldehyde (both from Polysciences inc., EM Grade) for 1 day at room temperature. The mandibles were carefully removed to ease subsequent sectioning. We followed the procedure described in detail by Sobotník et al. (2004) for subsequent steps. Semithin sections were stained with methylene blue and visualised using Nikon Eclipse Ni. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate (standard recipe) and observed using a Jeol 1011 transmission electron microscope.

## 3. Results

In termites, the dorsal part of the preoral cavity (i.e. the cibarium) opens into the pharynx. The pharynx, located posterior to the mouth, is oval-shaped in cross section. The oral gland was observed at the mouth/pharynx boundary, and was composed of two groups of secretory cells located at the dorsal and ventral side of mouth, respectively (Fig. 1A). The gland consisted of roughly 30 to 60 secretory cells. As the basic structure of the gland remained unchanged among all studied species and castes (see Fig. 1 and Fig. S1), the following description summarises the common characteristics. Specific features are listed at the end of the Results section. The main characteristics of the oral gland were most obvious in the gland centre, while the ultrastructure of peripheral cells gradually changed to resemble that of unmodified epithelium. The cells located near the secretory epithelium comprised: (i) standard epidermal cells with a few organelles and nuclei rich in condensed chromatin, (ii) epidermal cells attaching the muscles to the pharynx cuticle through numerous microtubules, located inside the cells, and tonofibrillae, embedded into the cuticle matrix outside the cells, and (iii) sparse chemoreceptors containing four or five dendrites (not shown).

The secretory epithelium was formed exclusively by Class I secretory cells (*sensu* Noiroit and Quennedey, 1974). The epithelium was between 5 and 10  $\mu\text{m}$  thick, both on the dorsal and ventral facies of the mouth/pharynx boundary. The secretory cells were cubic, or slightly columnar, and contained irregular nuclei (about 4  $\mu\text{m}$  in the largest dimension) located at cell bases, and filled

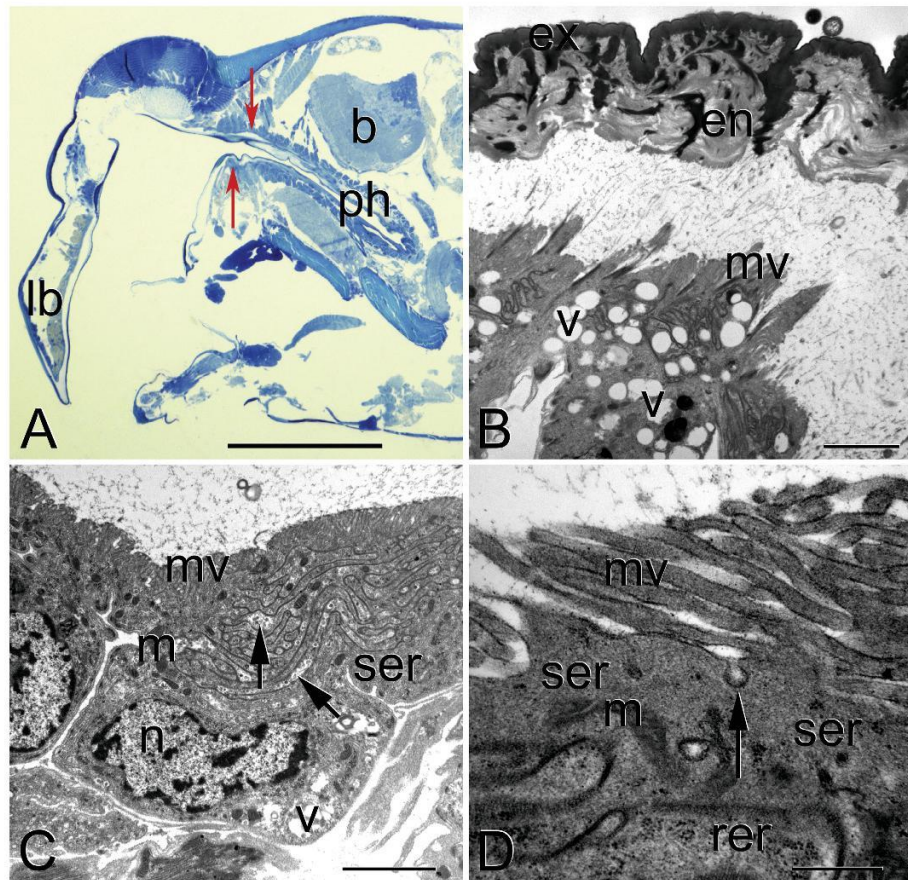
predominantly with dispersed chromatin interspersed with larger chromatin aggregates (Fig. 1B and C). The secretory epithelium was underlain by a single- or multiple-layered basement membrane, roughly 40 nm thick. The basement membrane located near muscle attachments was often markedly thicker, up to 200 nm in thickness, and contained collagen fibres. Basal invaginations were well-developed, although they never reached deeper than approximately one-third of the secretory epithelium thickness, and they only rarely revealed pinocytotic activity. Singular free axons were occasionally observed within the basement invaginations (Fig. S2D). The cytoplasm at the secretory cell bases contained a high amount of smooth Endoplasmic Reticulum (ER hereafter), made of roughly 50 nm thick tubules, and low amounts of rough ER, free ribosomes, electron-lucent vesicles, and occasionally free lipid-like droplets and protein granules surrounded by plasma membrane.

The apical portion of secretory cells included abundant smooth ER, abundant small mitochondria (about 0.5  $\mu\text{m}$  in their longest dimension) and well-developed microvilli, about 100 nm thick and up to 0.6  $\mu\text{m}$  long (Fig. 1D), the length and abundance of which decreased towards the gland periphery. The microvilli always possessed a central channel (Fig. S2B), thought to be connected to smooth ER, according to Quennedey (1998). Small lucent vesicles (about 500 nm in diameter) were often observed, and rarely seen to fuse with the apical plasma membrane at the microvilli bases (Fig. 1D). The intercellular junctions comprised an apical zonula adhaerens, always followed by a septate junction (about 25 nm thick) and a gap junction (about 15 nm thick). The junctions between neighbouring secretory cells were approximately confined to the apical half, the rest of the cell membranes being devoid of junctions. The cuticle overlying the oral gland was formed by a modified endocuticle saturating the secretion release. Endocuticle modifications varied with position, starting from enlarged pore canals and ending with endocuticle having a spongy appearance. The endocuticle was slightly thinner in workers (ranging, according to species, between 0.6 and 1  $\mu\text{m}$  in thickness) compared to soldiers (1.4–1.9  $\mu\text{m}$  thick, according to species) (compare Fig. 1B; Fig. S1A, E, F). The exocuticle was relatively thin, penetrated by numerous pore channels leading to epicuticular pores piercing a very thin epicuticle (Fig. S2A). The thinnest exocuticle was observed in *S. sphaerotherax* (about 100 nm in both worker and soldier castes), followed by *P. simplex* (about 400 nm in worker and 550 nm in soldier), and the thickest exocuticle was found in *S. trispinosus* (about 400 nm in worker and 1  $\mu\text{m}$  in soldier). The epicuticle was made of an inner epicuticle between 20 and 40 nm thick, and an outer epicuticle about 15 nm thick. The diameter of epicuticular pores was roughly 20 nm.

Apart from the general structure of the oral gland described above, *P. simplex* workers and soldiers possessed many glycogen granules, especially at the secretory cell bases. Both castes of *S. sphaerotherax* contained higher amounts of lipid-like droplets, especially in the ventral portion of the gland in workers. Another organelle present only in *S. sphaerotherax* is the Golgi apparatus, observed in rare cases at the secretory cell bases (Fig. S2C). Lastly, some of the oral gland secretory cells found in *S. trispinosus* contained large lucent vesicles, up to 5  $\mu\text{m}$  in diameter.

## 4. Discussion

Here we report the presence and ultrastructure of the oral gland, a new exocrine organ in termites. The gland was observed in both workers and soldiers of the wood-feeding termites *P. simplex* (Rhinotermitidae) and *S. sphaerotherax* (Termitidae: Sphaerotermitinae), and in the soil-feeding species *S. trispinosus* (Termitidae: Termitinae). The presence of the gland in unrelated termite



**Fig. 1.** Development of the oral gland. **A.** Sagittal section of the head of *Sphaerotermes sphaerotherax* worker. Arrows mark the two regions of the oral gland secretory epithelium. Scale bar represents 200  $\mu\text{m}$ . **B.** Overall development of the oral gland in *Spinitermes trispinosus* soldier. Note the highly modified cuticle with numerous epicuticular pores. Scale bar represents 2  $\mu\text{m}$ . **C.** The oral gland secretory epithelium in *Spinitermes trispinosus* soldier. The arrows mark glycogen granules. Scale bar represents 2  $\mu\text{m}$ . **D.** A detail of the apical portion of the oral gland secretory cell in *Sphaerotermes sphaerotherax* worker. The arrow marks fusion of a small secretory vesicle with the apical membrane. Scale bar represents 0.5  $\mu\text{m}$ . Abbreviations: b, brain (supraoesophageal ganglion); en, endocuticle; ex, exocuticle; lb, labrum; m, mitochondria; mv, microvilli; n, nucleus; ph, pharynx; rer, rough endoplasmic reticulum; ser, smooth endoplasmic reticulum; v, vesicles.

species suggests it is widespread among termites. The oral gland is extraordinarily small, the smallest of all termite glands identified so far, which likely explains why it has been overlooked until now. At the same time, its universal distribution suggests it has an important function to termite workers and soldiers.

The glands of termites can be classified into two categories according to their distribution among castes and species. The glands present in all taxa and castes are the labral, mandibular, labial and sternal glands (Lambinet, 1959; Noirot, 1969; Sobotník and Hubert,

2003; Sobotník and Weyda, 2003; Palma-Onetto et al., 2018, 2019). All other glands are confined to some groups and/or castes (Billen and Sobotník, 2015), with the exception of the frontal gland, which occurs in most species of Neoisoptera (Deligne et al., 1981; Quennedy, 1984; Sobotník et al., 2010b; Kutalová et al., 2013; pers. observ.). The oral gland probably belongs to the former category, as it likely occurs in both workers and soldiers of “lower” (all families except Termitidae) and “higher” termites (only Termitidae), irrespectively of their diet, i.e. wood- or soil-feeders. This



opinion is also supported by a single observation of the oral gland in a soldier of the wood-feeding termite, *Microcerotermes* sp. (Termitidae: Termitinae) (see Fig. S1F). Future studies are needed to confirm this statement.

The function of the oral gland is unclear, and we were unable to characterize it in the current study due to methodological constraints. However, we can formulate some hypotheses based on the structure and location of the gland. The cytoplasm of the secretory cells is dominated by smooth ER, an organelle known to produce lipidic substances that are often used for communication purposes (for review see Percy-Cunningham and MacDonald, 1987 or Tillman et al., 1999). The production of a lipid-like secretion is further corroborated by the presence of droplets located freely in the cytoplasm in several samples studied here. Other secretory organelles observed within the secretory cells, such as rough ER or Golgi apparatus, reach considerably lower abundance and probably serve only for maintaining the secretory function achieved by the smooth ER. The nature of the electron-lucent vesicles observed within the secretory cells in most cases remains unclear. While their release at the apices was rarely observed, we have not observed their formation, although they might be produced by the Golgi apparatus.

The position of the oral gland suggests its secretions are not used for communication, as the secretion is released just behind the mouth. Therefore, we suggest that the secretion may lubricate the entrance of the digestive tube, facilitating the passage of food particles (Donovan et al., 2001). Alternatively, the gland may produce the primer pheromones regulating caste development within colony. Indeed, termite colonies are usually founded by a couple of dealate imagines, i.e. the future king and queen (called primary reproductives), and the formation of secondary reproductives (also called neotronics) is inhibited by the royal couple via a substance distributed by contact among nestmates (Lüscher, 1961; Springhetti, 1972). Some volatile substances playing a role in these inhibitory processes have recently been identified (Matsuura et al., 2010; Funaro et al., 2018), and could possibly be produced by the oral gland. The same is true for soldiers, which have an inhibitory effect on the formation of additional soldiers (Lefeuve and Bordereau, 1984; Mitaka et al., 2017). The presence of neotronics is very common in termites, especially in “lower” termites, and known to occur in two of the studied genera: *Prorethra* and *Microcerotermes* (Myles, 1999). Thus, the primer pheromone could be released by the oral gland and then transmitted to other colony members during oral trophallaxis (McMahan, 1969), as has already been suggested (Lüscher, 1961). Other possible functions, such as production of releaser pheromones, digestive enzymes, or defensive compounds, seem quite unlikely due to the gland size, structure and ultrastructure.

#### Author contributions

JŠob, JSyn, Tber, TBour and DSD designed the study. PDA and DSD obtained the legal permits allowing export of living termites from Cameroon and French Guiana, respectively, to Czech Republic. JSyn, Tber, PS and JP performed the semithin sectioning. JSyn, Tber, PS and JŠob performed the transmission electron microscopy and designed the figures. JŠob, JSyn, Tber, TBour and DSD wrote the first draft of the manuscript. All authors revised the manuscript and read and approved the final version.

#### Acknowledgements

We thank the people of Ebogo II village (Cameroon) for their help and support during the field work. We thank Régis Vigoroux and other members of the Hydreco station (French Guiana) for their

kind help during the fieldwork. Our work would not be possible without Mirek Hylis (Laboratory of Electron Microscopy, Faculty of Sciences, Charles University in Prague), who helped operating the transmission electron microscope. We acknowledge Michael S. Painter (Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences) for polishing the English. Financial support was provided by the projects CIGA No. 20184306 and IGA No. B\_19\_04 from the Faculty of Forestry and Wood Sciences (Czech University of Life Sciences, Prague).

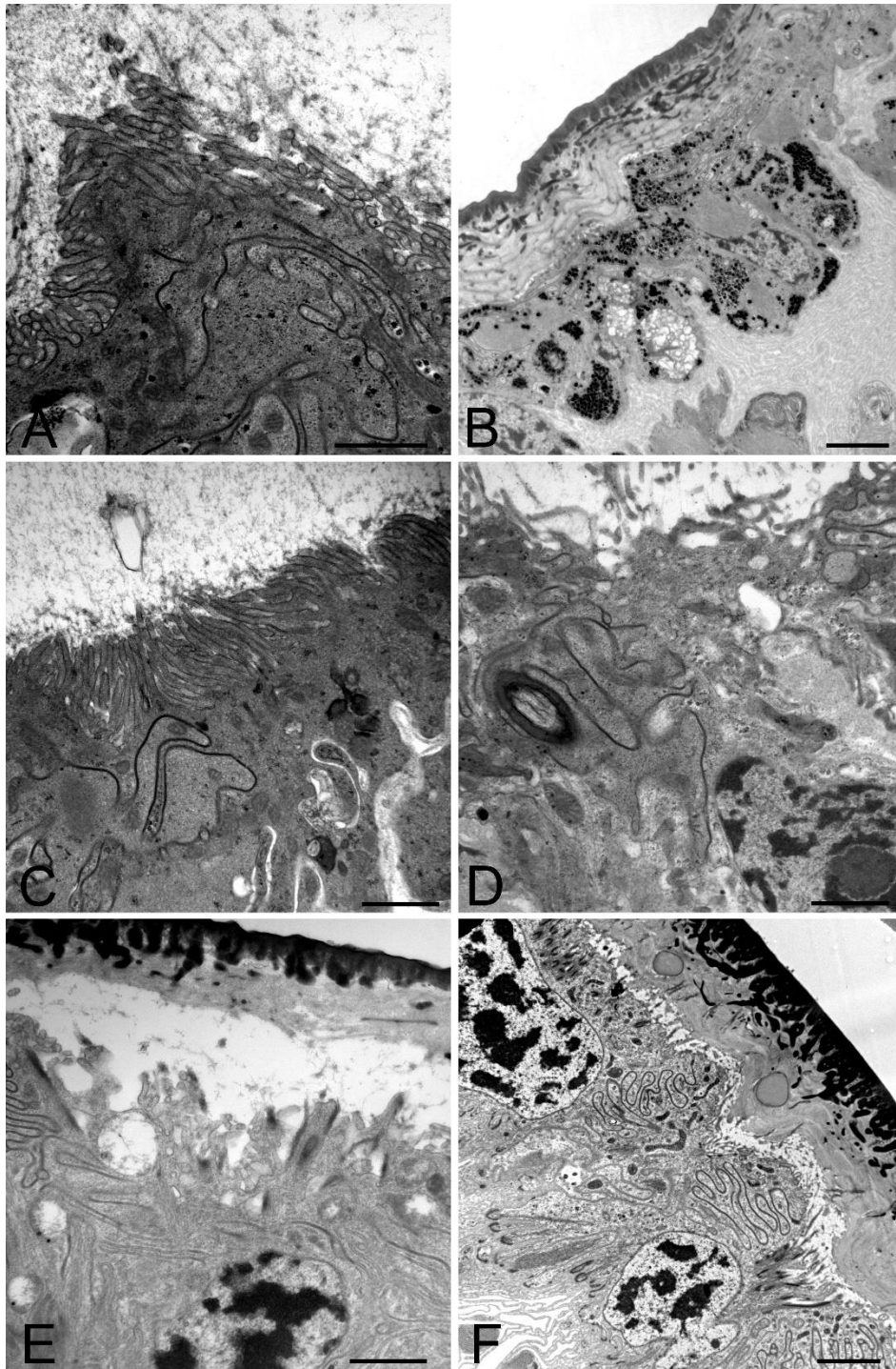
#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.asd.2019.100876>.

#### References

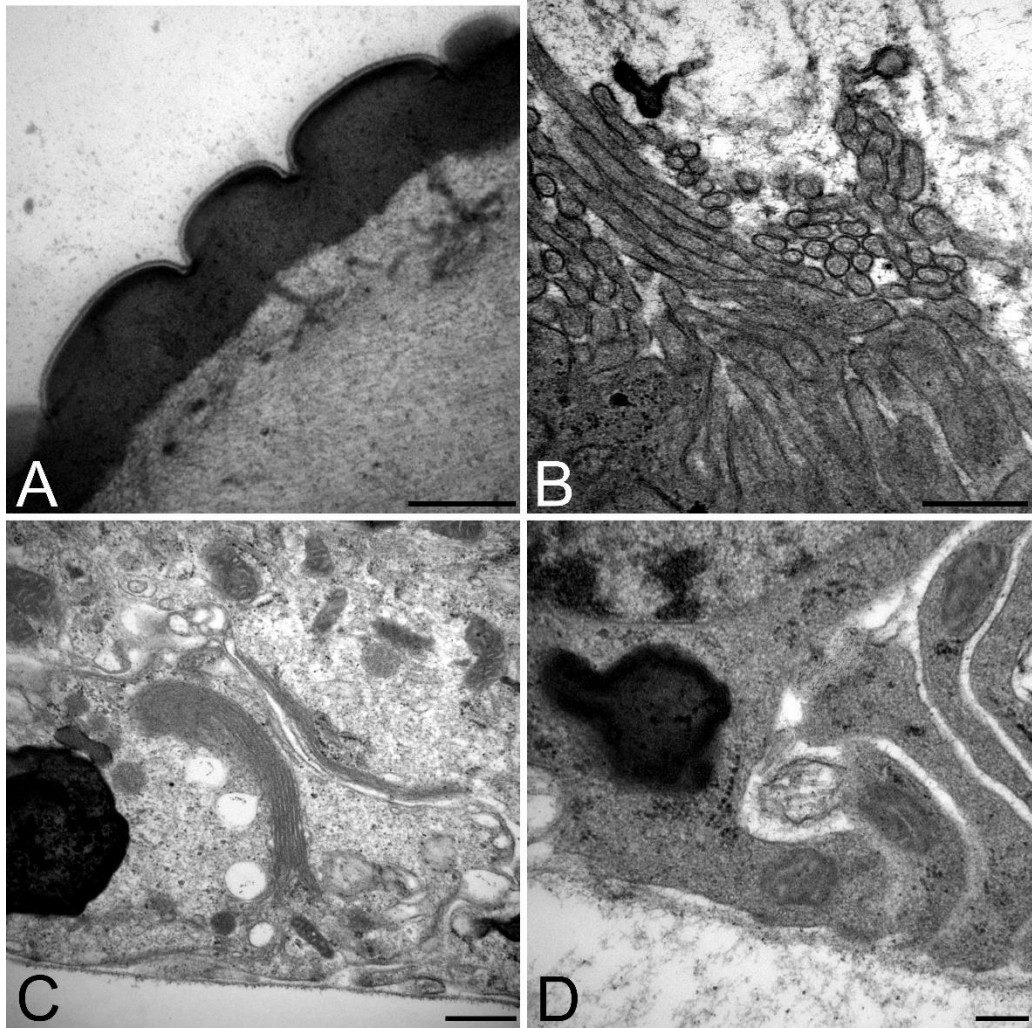
- Bar-On, Y.M., Phillips, R., Milo, R., 2018. The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 6506–6511.
- Billen, J., Sobotnik, J., 2015. Insect exocrine glands. *Arthropod Struct. Dev.* 44, 399–400.
- Bordereau, C., Pasteels, J.M., 2011. Pheromones and chemical ecology of dispersal and foraging in termites. In: Bignell, D.E., Roisin, Y., Lo, N. (Eds.), *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer, Dordrecht, pp. 279–320.
- Bourguignon, T., Sobotnik, J., Lepoint, G., Martin, J.M., Hardy, O.J., Dejean, A., Roisin, Y., 2011. Feeding ecology and phylogenetic structure of a complex Neotropical termite assemblage, revealed by nitrogen stable isotope ratios. *Ecol. Entomol.* 36, 261–269.
- Bourguignon, T., Sobotnik, J., Brabcová, J., Sillam-Dussès, D., Bucek, A., Krasulová, J., Vytisková, B., Demianová, Z., Mares, M., Roisin, Y., Vogel, H., 2016. Molecular mechanism of the two-component suicidal weapon of *Neocapritermes taracua* old workers. *Mol. Biol. Evol.* 33, 809–819.
- Cristaldo, P.F., DeSouza, O., Krasulová, J., Jirosová, A., Kotalová, K., Lima, E.R., Sobotnik, J., Sillam-Dussès, D., 2014. Mutual use of trail-following chemical cues by a termite host and its inquiline. *PLoS One* 9, e85315.
- Delattre, O., Sillam-Dussès, D., Jandák, V., Brothánek, M., Rucker, K., Bourguignon, T., Vytisková, B., Cvacka, J., Jiříček, O., Sobotnik, J., 2015. Complex alarm strategy in the most basal termite species. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 69, 1945–1955.
- Deligne, J., Quennedy, A., Blum, M.S., 1981. The enemies and defense mechanisms of termites. In: Hermann, H.R. (Ed.), *Social Insects*, vol. II. Academic Press, New York, pp. 1–76.
- Donovan, S.E., Eggleton, P., Bignell, D.E., 2001. Cut content analysis and a new feeding group classification of termites. *Ecol. Entomol.* 26, 356–366.
- Engel, M.S., Grimaldi, D.A., Krishna, K., 2009. Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *Am. Mus. Novit.* 3650, 1–27.
- Funaro, C.F., Boróczky, K., Vargo, E.L., Schal, C., 2018. Identification of a queen and king recognition pheromone in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 3888–3893.
- Krishna, K., Grimaldi, D.A., Krishna, V., Engel, M.S., 2013. Treatise on the Isoptera of the world. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 377, 1–2704.
- Kotalová, K., Hanus, R., Bourguignon, T., Roisin, Y., Sobotnik, J., 2013. Armed reproductives: evolution of the frontal gland in imagos of Termitidae. *Arthropod Struct. Dev.* 42, 339–348.
- Lambinet, F., 1959. La glande mandibulaire du termite à cou jaune (*Calotermes flavicollis*). *Insectes Soc.* 6, 165–177.
- Lefeuve, P., Bordereau, C., 1984. Soldier formation regulated by a primer pheromone from the soldier frontal gland in a higher termite, *Nasutitermes lujae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7665–7668.
- Lüscher, M., 1961. Social control of polymorphism in termites. In: Kennedy, J.S. (Ed.), *Insect Polymorphism*. Royal Entomological Society of London, pp. 57–67.
- Matsuura, K., Himuro, C., Yokoi, T., Yamamoto, Y., Vargo, E.L., Keller, L., 2010. Identification of a pheromone regulating caste differentiation in termites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 12963–12968.
- McMahan, E.A., 1969. Feeding relationships and radioactive techniques. In: Krishna, K., Weesner, F.M. (Eds.), *Biology of Termites*, vol. I. Academic press, New York, pp. 387–406.
- Mitaka, Y., Mori, N., Matsuura, K., 2017. Multi-functional roles of a soldier-specific volatile as a worker arrestant, primer pheromone and an antimicrobial agent in a termite. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 284, 20171134.
- 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, 1–91.
- Noirot, C., 1969. Glands and secretions. In: Krishna, K., Weesner, F.M. (Eds.), *Biology of Termites*, vol. I. Academic press, New York, pp. 89–123.
- Noirot, C., Quennedy, A., 1974. Fine structure of insect epidermal glands. *Annu. Rev. Entomol.* 19, 61–80.
- Palma-Onetto, V., Hošková, K., Krížková, B., Krejčířová, R., Pfliegerová, J., Bubeníčková, F., Piarre, R., Dahlstjöm, C.A.L., Synek, J., Bourguignon, T., Sillam-

- Dussès, D., Šobotník, J., 2018. Labral gland in termite soldiers. *Biol. J. Linn. Soc.* 123, 535–544.
- Palma-Onetto, V., Pfliegerová, J., Plarre, R., Synek, J., Cvačka, J., Sillam-Dussès, D., Šobotník, J., 2019. The labral gland in termites: evolution and function. *Biol. J. Linn. Soc.* 126, 587–597.
- Pasteels, J.M., Bordereau, C., 1998. Releaser pheromones in termites. In: Van der Meer, R.K., Breed, M.D., Espelie, K.E., Winston, M.L. (Eds.), *Pheromone Communication in Social Insects: Ants, Wasps, Bees and Termites*. Westview, Boulder, pp. 193–215.
- Percy-Cunningham, J.E., MacDonald, J.A., 1987. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands. In: Prestwich, G.D., Blomquist, G.J. (Eds.), *Pheromone Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 27–75.
- Poiani, S.B., Costa-Leonardo, A.M., 2016. Dehiscent organs used for defensive behavior of kamikaze termites of the genus *Rupititermes* (Termitidae, Apicomplexa) are not glands. *Micron* 82, 63–73.
- Quennedy, A., 1984. Morphology and ultrastructure of termite defense glands. In: Hermann, H.R. (Ed.), *Defensive Mechanisms in Social Insects*. Praeger, New York, pp. 151–200.
- Quennedy, A., 1998. Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis. In: Harrison, F.E., Locke, M. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, 11A. Wiley-Liss, New York, pp. 177–207.
- Sillam-Dussès, D., 2010. Trail Pheromones and Sex Pheromones in Termites. *Novinka*, New York, p. 79.
- Sillam-Dussès, D., Hanus, R., Abd El-Latif, A.O., Jirós, P., Krasulová, J., Kalinová, B., Cvačka, J., Valterová, I., Šobotník, J., 2011. Sex pheromone and trail pheromone of the sand termite *Psammodontus hybostoma* (Rhinotermitidae: Psammotermitinae). *J. Chem. Ecol.* 37, 179–188.
- Sillam-Dussès, D., Krasulová, J., Vrkoč, V., Pytelková, J., Cvačka, J., Kotalová, K., Bourguignon, T., Miura, T., Šobotník, J., 2012. Comparative study of the labial gland secretion in termites (Isoptera). *PLoS One* 7, e46431.
- Šobotník, J., Hubert, J., 2003. The morphology of the exocrine glands of *Prorethra simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae) and their ontogenetical aspects. *Acta Soc. Zool. Bohem.* 67, 83–98.
- Šobotník, J., Weyda, F., 2003. Ultrastructural ontogeny of the labial gland apparatus in *Prorethra simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Arthropod Struct. Dev.* 31, 255–270.
- Šobotník, J., Weyda, F., Hanus, R., Kyjaková, P., Doubský, J., 2004. Ultrastructure of the frontal gland in *Prorethra simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae) and quantity of the defensive substance. *Eur. J. Entomol.* 101, 153–163.
- Šobotník, J., Jirsová, A., Hanus, R., 2010a. Chemical warfare in termites. *J. Insect Physiol.* 56, 1012–1021.
- Šobotník, J., Sillam-Dussès, D., Weyda, F., Dejean, A., Roisin, Y., Hanus, R., Bourguignon, T., 2010b. The frontal gland in workers of Neotropical soldierless termites. *Naturwissenschaften* 97, 495–503.
- Šobotník, J., Bourguignon, T., Hanus, R., Demianová, Z., Pytelková, J., Mareš, M., Foltýnová, P., Preisler, J., Cvačka, J., Krasulová, J., Roisin, Y., 2012. Explosive backpacks in old termite workers. *Science* 337, 436.
- Šobotník, J., Kotalová, K., Vytisková, B., Roisin, Y., Bourguignon, T., 2014. Age-dependent changes in ultrastructure of the defensive glands of *Neocapritermes taracua* workers (Isoptera, Termitidae). *Arthropod Struct. Dev.* 43, 205–210.
- Šobotník, J., Bourguignon, T., Carrijo, T.F., Bordereau, C., Robert, A., Křížková, B., Constantini, J.P., Canello, E.M., 2015. The nasus gland: a new gland of *Angulitermes* (Termitidae, Nasutitermitinae). *Arthropod Struct. Dev.* 44, 401–406.
- Springhetti, A., 1972. I reali nella differenziazione delle caste di *Kalotermes flavicollis* (Fabr.) (Isoptera). *B. Zool.* 39, 83–87.
- Tillman, J.A., Seybold, S.J., Jurenka, R.A., Blomquist, G.J., 1999. Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochem. Mol.* 29, 481–514.
- Vrkoč, J., Křeček, J., Hrdý, I., 1978. Monoterpene alarm pheromones in two *Nasutitermes* species. *Acta Entomol. Bohemoslov.* 75, 1–8.



Supplementary Figure S1:

A: *Prorhinotermes simplex* worker. Scale bar represents 1  $\mu\text{m}$ , B: *Prorhinotermes simplex* soldier. Scale bar represents 2  $\mu\text{m}$ , C: *Sphaerotermes sphaerothorax* worker. Scale bar represents 1  $\mu\text{m}$ , D: *Sphaerotermes sphaerothorax* soldier. Scale bar represents 1  $\mu\text{m}$ , E: *Spinitermes trispinosus* worker. Scale bar represents 1  $\mu\text{m}$ , F: *Microcerotermes* sp. soldier. Scale bar represents 2  $\mu\text{m}$ .



Supplementary Figure S2:

A. The ultrastructure of the apical cuticle in *Sphaerotermes sphaerothorax* worker. Scale bar represents 200 nm, B. The ultrastructure of microvilli in *Prorhinotermes simplex* worker. Scale bar represents 500 nm, C. Golgi apparatus in *Sphaerotermes sphaerothorax* worker. Scale bar represents 500 nm, D. Free axon located within basal invaginations in *Sphaerotermes sphaerothorax* worker. Scale bar represents 200 nm.

Část II - Labrální žláza termitích vojáků

**The labral gland in termite soldiers**

**Labrální žláza termitích vojáků**

Autoři: Valeria Palma-Onetto, Kristýna Hošková, Barbora Křížková, Romana Krejčířová, Jitka Pflegrová, Filipa Bubeníčková, Rudy Plarre, Cecilia A. L. Dahlsjö, Jiří Synek, Thoma Bourguignon, David Sillam-Dussès a Jan Šobotník

Přijato k tisku: 28. listopadu 2017 v Biological Journal of the Linnean Society

## The labral gland in termite soldiers

VALERIA PALMA-ONETTO<sup>1,2</sup>, KRISTÝNA HOŠKOVÁ<sup>3</sup>, BARBORA KRÍŽKOVÁ<sup>1</sup>,  
ROMANA KREJČÍŘOVÁ<sup>3</sup>, JITKA PFLEGEROVÁ<sup>4</sup>, FILIPA BUBENÍČKOVÁ<sup>3</sup>,  
RUDY PLARRE<sup>5</sup>, CECILIA A. L. DAHLSJÖ<sup>1,6</sup>, JIŘÍ SYNEK<sup>1</sup>, THOMAS BOURGUIGNON<sup>1,7</sup>,  
DAVID SILLAM-DUSSÈS<sup>2,8†</sup> and JAN ŠOBOTNÍK<sup>1,\*†</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>University Paris 13 - Sorbonne Paris Cité, Laboratory of Experimental and Comparative Ethology, Villetaneuse, France

<sup>3</sup>Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup>Institute of Entomology, Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic

<sup>5</sup>Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin, Germany

<sup>6</sup>Environmental Change Institute, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QY, UK

<sup>7</sup>Okinawa Institute of Science & Technology Graduate University, 1919-1 Tancha, Onna-son, Okinawa 904-0495, Japan

<sup>8</sup>Institute of Research for Development – Sorbonne Universités, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Bondy, France

Received 6 November 2017; revised 28 November 2017; accepted for publication 28 November 2017

The evolutionary success of termites has been driven largely by a complex communication system operated by a rich set of exocrine glands. As many as 20 different exocrine organs are known in termites. While some of these organs are relatively well known, only anecdotal observations exist for others. One of the exocrine organs that has received negligible attention so far is the labral gland. In this study, we examined the structure and ultrastructure of the labrum in soldiers of 28 termite species. We confirm that the labral gland is present in all termite species, and comprises two secretory regions located on the ventral side of the labrum and the dorso-apical part of the hypopharynx. The labrum of Neoisoptera has a hyaline tip, which was secondarily lost in Nasutitermitinae, *Microcerotermes* and species with snapping soldiers. The epithelium of the gland generally consists of class 1 secretory cells, with an addition of class 3 secretory cells in some species. A common feature of the secretory cells is the abundance of smooth endoplasmic reticulum, an organelle known to produce lipidic and often volatile secretions. Our observations suggest that the labral gland is involved in communication rather than defence as previously suggested. Our study is the first to provide a comprehensive picture of the structure of the labral gland in soldiers across all termite taxa.

ADDITIONAL KEYWORDS: exocrine gland – hypopharynx – labrum – Termitoidea – ultrastructure – Isoptera.

### INTRODUCTION

Termites are an important food resource for a range of animals (Redford & Dorea, 1984), and they compete for resources with other wood- and soil-feeding taxa (Šobotník, Jirosová & Hanus, 2010a). Termites protect themselves through passive and active

defence mechanisms, including a cryptic lifestyle, the construction of defensive structures (Korb, 2011) and investments into a caste of defenders: the soldiers (Haverty, 1977). While the primary weapon of termite soldiers is generally their powerful mandibles, glands that produce defensive compounds are of comparable importance (Prestwich, 1984; Šobotník *et al.*, 2010a).

Termites use intricate communication systems, the complexity of which is reflected in the development of 20 different signal-producing exocrine organs (Billen &

\*Corresponding author. E-mail: sobotnik@fd.czu.cz

†These authors contributed equally to the study.

Šobotník, 2015). Four glands are found in most termite species: the frontal gland, the sternal gland, the labial glands and the mandibular glands. The presence of other exocrine organs is restricted to specific termite lineages, or to certain castes. The function of these lineage-/caste-specific glands is not fully understood, apart from the defensive function of the crystal glands in *Neocapritermes taracua* workers (Šobotník et al., 2012, 2014; Bourguignon et al., 2016). The labral gland is one of these poorly known exocrine glands, known only from the soldier caste of three termite species (Deligne, Quennedey & Blum, 1981; Quennedey, 1984; Šobotník et al., 2010b; Costa-Leonardo & Haifig, 2014), and from some imagoes (Křížková et al., 2014).

The labral gland was first described on the ventral side of the labrum in *Macrotermes bellicosus* (Deligne et al., 1981) and was later found also on the dorsal side of the hypopharynx in other Macrotermitinae species (Quennedey, 1984). The presence of labral glands in other taxa is thought to be indicated by a hyaline tip, located on the tip of the labrum (Deligne et al., 1981). The labral gland of *M. bellicosus* is composed of class 1 secretory cells only (according to the classification of Noirot & Quennedey, 1974), while additional class 3 secretory cells have been found in the labral glands of *Glossotermes oculatus* and *Cornitermes cumulans* soldiers (Šobotník et al., 2010b; Costa-Leonardo & Haifig, 2014). The function of the labral gland has not been studied for any termite species, and the literature suggests that it produces toxic secretions that impregnate the mandibular edges (Deligne et al., 1981; Quennedey, 1984). In this paper, we provide the first comprehensive description of the structure of the labral gland in the soldiers of 28 species, representatives of the termite tree of life.

## MATERIAL AND METHODS

### DIRECT OBSERVATIONS

Living termites were observed and photographed using Canon EOS 6D and Canon EOS 5D SR cameras, combined with Canon EF 100 mm f/2.8L Macro IS USM and Canon MP-E 65 mm f/2.8 lenses, and equipped with the Canon Macro Twin Lite MT-24EX flash. The photographs were used to compare the shape of the labrum and the presence of a hyaline tip in termite soldiers.

### OPTICAL MICROSCOPY AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

Soldier labral glands were studied using three different fixatives: fixative with phosphate buffer (0.2 M, pH 7.2 buffer/formaldehyde 10%/glutaraldehyde 8% = 2 : 1 : 1), cacodylate buffer (0.2 M, pH 7.3 buffer/glutaraldehyde 8%/

distilled water = 2 : 1 : 1) and standard Bouin's solution (for details see Supplementary Information, Table S1). For electron microscopy, soldier heads were cut off and the mandibles were removed to facilitate sectioning. The mandibles were left intact in the minor soldiers of Rhinotermitinae and in all Nasutitermitinae. Samples were postfixed using 2% osmium tetroxide, and embedded in Spurr resin. The samples were cut into 0.5- $\mu$ m sections using a Reichert Ultracut ultramicrotome and stained with Azure II for analysis with optical microscopy.

### HISTOLOGY

The samples were dehydrated using an ethanol series, transferred to xylene and embedded in paraffin. Polymerization was carried out in an oven at 56–58 °C for 2 h. The samples were cut into sections 5–10  $\mu$ m thick using Bamed pfm Rotary 3004 M microtome, placed on a slide coated with eggwhite/glycerol, stained with Mallory's trichrome stain and then made clear with xylene. For additional details see Table S1.

### ELECTRON MICROSCOPY

We dissected the heads of freshly freeze-killed soldiers, and removed the mandibles, maxillae and labium. The heads were thereafter dehydrated using an acetone series. The samples were dried using the critical-point method and glued onto an aluminium holder using thermoplastic adhesive. The samples were then sputter-coated with gold and observed using a Jeol 6380 LV scanning electron microscope. The mouthparts of three species (*Embiratermes neotenicus*, *Coptotermes formosanus* and *Sphaerotermes sphaerothorax*) were cleaned via argon plasma etching in a sputter coater machine (Bal-Tec SCD 050).

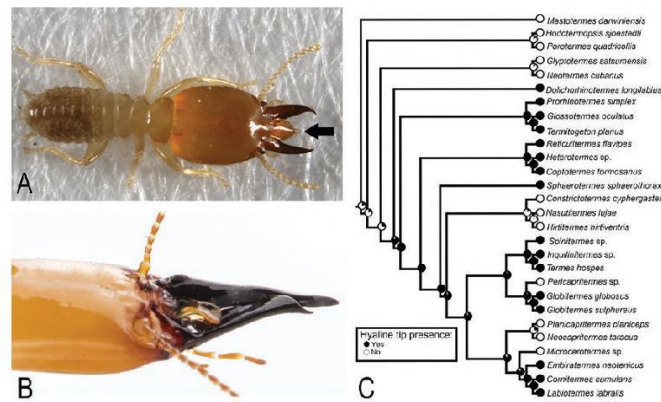
Ultrastructural features were studied in selected samples (see Table S1) using a Jeol 1011 transmission electron microscope, as described by Šobotník, Weyda & Hanus (2003).

### EVOLUTION OF THE HYALINE TIP

We reconstructed the presence of the hyaline tip using previously published phylogenetic trees (Bourguignon et al., 2015, 2017). We carried ancestral state reconstruction with Mesquite (Maddison & Maddison, 2010), on the presence/absence of the hyaline tip, using the Mk1 likelihood model and parsimony analyses.

## RESULTS

The labral gland is a constituent part of the labrum (Fig. 1A, B). The labrum is dorsally sclerotized, and membranous on the ventral side, with lower sclerotization towards the tip, often with a transparent



**Figure 1.** (A) *Sphaerotermes sphaerothorax* soldier. Arrow marks the hyaline tip of the labrum. (B) Head of *Neocapritermes taracua* soldier. (C) Phylogenetic tree showing the evolution of the hyaline tip in soldier caste termites. The presence or absence of the hyaline tip is marked by black or white circles, respectively.

inflated apical part termed the 'hyaline tip'. The hyaline tip appears as a transparent extensible protrusion of the labrum occurring in many taxa of Rhinotermitidae and Termitidae (Fig. 1C). The presence of the hyaline tip is variable, depending on species. The hyaline tip has been lost in several lineages, including the snapping soldiers and all Nasutitermitinae (Figs 1C, S1).

#### SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

The ventral facies of the labrum were flexible and appeared wrinkled (Fig. 2A), while the dorsal facies were more rigid with a sclerotized cuticle. The ventral side of the labrum generally carried a few tens of sensillae (Fig. 2B), probably acting as contact chemoreceptors [based on combined scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) evidence, see below], with possible mechanosensitive function (based on striking similarity to campaniform sensillae). While the dorsal side of the labrum was usually smooth, the ventral facies of the labrum usually showed borders between the underlying epidermal cells, which appeared as irregular angular structures between 4 and 6  $\mu\text{m}$  in the largest dimension. These borders were well delimited in certain parts of the ventral surface of the labrum, often appearing as ridges or spines extending beyond the cell border. These features were especially developed in *Neotermes cubanus*, *Glossotermes oculatus*, *Neocapritermes taracua*, *Spinitermes* sp. and *Labiatermes abralis*. The same pattern was also observed along the midline of

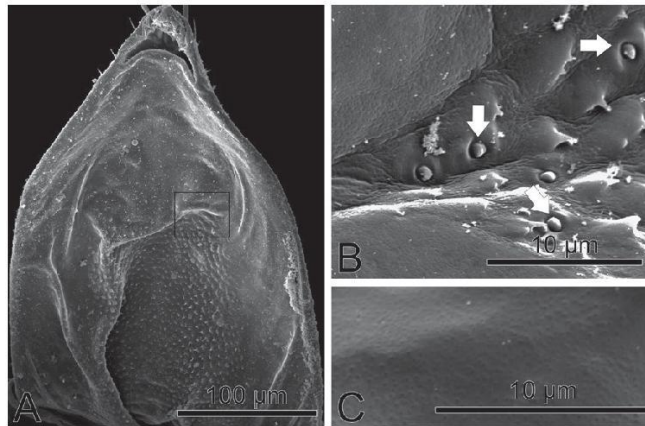
the labrum in *Prohilotermes simplex*, the basal half of the labrum in *Coptotermes formosanus* (Fig. 2A, B) and *Sphaerotermes sphaerothorax*, and the basal part of the labrum in *Embiratermes neoterenicus*. In all specimens, the apical and ventro-lateral part of the labrum possessed numerous pores typically about 30–50 nm in diameter (Fig. 2C).

#### OPTICAL MICROSCOPY

The labral gland appeared as a thickened epithelium located on the ventral side of the labrum, with possible extension to the dorsal side at the labrum apex. An independent portion of secretory epithelium appeared also on the dorso-apical part of the hypopharynx (Fig. 3A, B). Labral gland secretions were shown to accumulate in the space between the secretory epithelium and the overlying cuticle with no reservoir.

The labral gland secretory epithelium varied in thickness among species, most commonly ranging between 20 and 30  $\mu\text{m}$ . The thinnest epithelium was found in *Nasutitermes lujae* (2  $\mu\text{m}$ ) and the thickest epithelium was found in the large soldiers of *Psammotermes hybostoma* (147  $\mu\text{m}$ ) (Table S1). Hypopharyngeal thickness varied between 4 and 30  $\mu\text{m}$ . The ultrastructural features were nearly identical between the labral and hypopharyngeal regions of the labral gland in all species. The shape and overall size of the labral gland were diverse and not proportional to the size of the labrum. While some labral glands covered the entire labrum, others covered less than half of the labral ventral area.





**Figure 2.** Labral gland development. (A) Micrograph of the ventral side of the labrum of *Coptotermes formosanus*; the small rectangle indicates the sector where the micrograph in B was taken. (B) Region with a group of sensillae (marked with white arrows) in *C. formosanus* labrum. (C) High-magnification micrograph of the apical region with epicuticular pores in *Sphaeroterme sphaerotherax* labrum.

Within the four studied species with soldier subcastes, the thickness of the labral gland increased with the size of the soldier morph (Table S1).

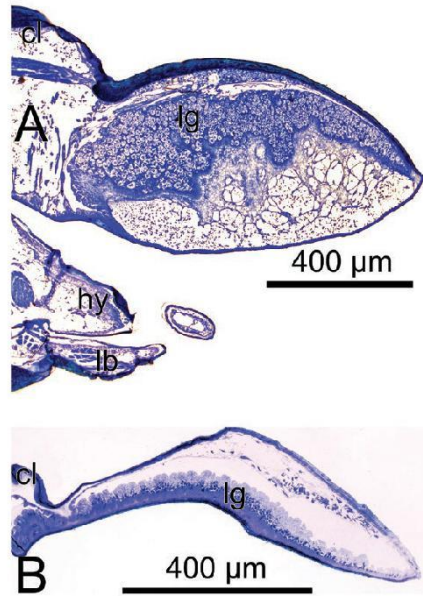
#### TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

TEM revealed that the labral and hypopharyngeal epithelium were made up of secretory cells. The ultrastructural features of the secretory cells in the labral and hypopharyngeal regions of the labral gland were almost identical, and are thus described together.

The labral gland was predominantly made up of columnar class 1 secretory cells (according to the classification of Noirot & Quennedey, 1974) that were characterized by an abundance of smooth endoplasmic reticulum (ER), vesicles of different electron densities, abundant mitochondria, numerous microtubules orientated apico-basally, glycogen granules, myelin figures and sparse rough ER mainly located around the nucleus (Fig. 4A–C). The secretory cells could easily be differentiated from the non-modified cells (Fig. S3A) as the latter are thinner and lack the characteristics mentioned above. Electron-lucent vesicles were also relatively common within the cells, although they were rarely observed to be released (then including the membrane) at the cell apex, while electron-dense granules were rare. The secretory cell cytoplasm often contained lipid-like droplets (around 1–2  $\mu\text{m}$  in diameter; Fig. S3B, C) that were located freely in the

cytoplasm and particularly abundant in major soldiers of *Dolichorhinotermes longilabius*. The droplets in *D. longilabius* had a foamy appearance and turned into lucent vesicles that were occasionally excreted at the secretory cell apex. Junctions between neighbouring class 1 cells were formed by apical zonulae adherens followed by septate junctions, while the basal parts of the membranes were devoid of any junctions. Basal invaginations were well developed throughout the gland, and on average were about 5  $\mu\text{m}$  deep (up to 20  $\mu\text{m}$  in *Labioterme labralis*) (Fig. 4A) and showed frequent pinocytotic activity (Fig. S3D). The nucleus of the class 1 cells was basally located and elliptic or slightly irregular in shape. The largest dimension of the nucleus was 5  $\mu\text{m}$  (rarely up to 10  $\mu\text{m}$ ) and the nucleus was predominantly filled with dispersed chromatin with few aggregates. Microvilli were well developed, about 1.5  $\mu\text{m}$  in length (rarely up to 3–4  $\mu\text{m}$ ), approximately 100 nm thick, and always had a central channel about 40 nm in diameter (Figs 4A, S3C, E). The basal invaginations and microvilli of the hypopharyngeal region of the labral gland were always shorter than those of the labral region. Microvilli were in some cases longer in the central part of the gland than in the gland margins.

The cuticle was in general made up of three layers, the endocuticle of helicoid structure, exocuticle showing no discernible layers and a thin epicuticle (see Table S1). The labral gland secretions were stored in the space between



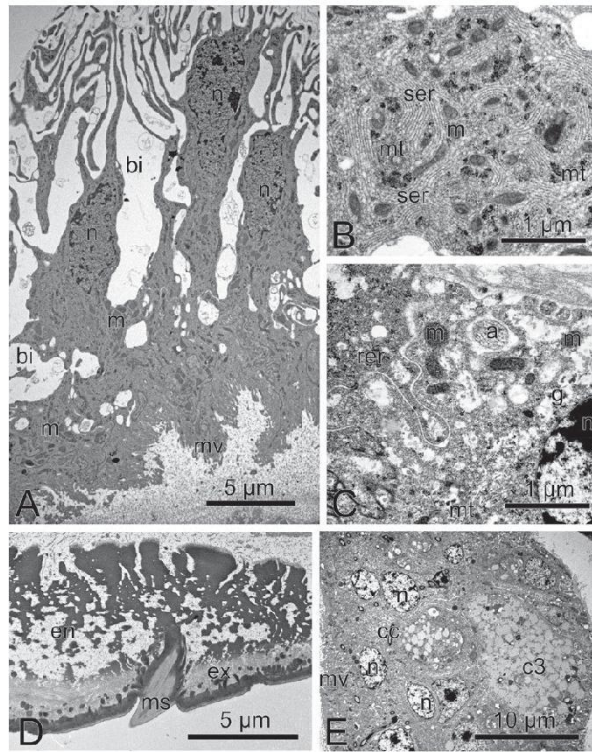
**Figure 3.** Sagittal sections of the forehead of *Psammotermes hybostoma* medium soldier (A) and *Neocapritermes taracua* soldier (B), showing the secretory epithelium in hypopharynx. Abbreviations: cl, clypeus; hy, hypopharynx; lb, labium; lg, labral gland.

the secretory epithelium, the overlying cuticle and inside the porous cuticle. There was no invaginated reservoir in any of the studied species. The cuticle showed numerous adaptations for release of the secretion, and these were more pronounced towards the labral tip (Fig. 2C, 4D, S4A, B). The cuticular modifications included an increase in the number and width of the pore canals, which widened towards the cuticle base (Fig. 4D), and the occurrence of epicuticular pores allowing for the secretion to be evacuated from the body.

Secretory cells were innervated by free axons frequently observed at the base of the secretory epithelium (Fig. 4C). The singular axons without envelope cells often occurred among the basal invaginations, and sometimes contained typical electron-dense grains of neurosecretions. A different kind of neural tissue was represented by groups of sensillae located along the central line of the labrum, each comprising between two and five sensory neurons (represented by distal dendrites) and corresponding envelope cells (Figs 4D, S4C).

Apart from the common organelles, large microtubule bundles running through secretory cells were found in *Mastotermes darwiniensis*, *Hodotermopsis sjoestedti* and *Embiratermes neotenicus* (Fig. S3D). Additionally, tracheae going through class 1 cells were found in *M. darwiniensis* and *H. sjoestedti* (Fig. S3E). Major soldiers of *Dolichorhinotermes longilabius* possessed particularly large amounts of lipid droplets, with electron-dense granules that dissolved into lucent vesicles. In all studied Nasutitermitinae the labral gland was relatively underdeveloped, although the cells retained the general characteristics of the labral gland.

Class 3 secretory cells, when present, commonly occurred on the dorsal side of the labrum and were generally separated from the secretory epithelium by non-modified epidermal cells. However, the class 3 cells were in few cases mixed with class 1 cells (Fig. 4E) in *Glossotermes oculus*, *Termes hospes*, and in the minor soldiers of *Dolichorhinotermes longilabius*. In *Mastotermes darwiniensis*, by contrast, the class 3 secretory cells were located adjacent to the class 1 secretory cells.



**Figure 4.** Ultrastructure of the labral gland in soldiers. (A) Overall development of the labral gland in *Labiotermes labralis*. Note the development of the apical microvilli and basal invaginations. (B) Detail of labral gland secretory cell class 1 cytoplasm in *Neocapritermes taracua* showing well-developed smooth endoplasmic reticulum. (C) Detail of labral gland secretory cell class 1 cytoplasm in large soldier of *Dolichorhinotermes longilabius* showing a free axon located at the base of the secretory epithelium. (D) Highly modified cuticle underlying the labral gland in *Embiratermes neotenicus*. Note enlarged pore canals ensuring secretion release and the margin of the sensillum. (E) Class 3 secretory cell in *Glossotermes oculatus*. Abbreviations: a, axon; c3, class 3 secretory cell; cc, conducting canal; en, endocuticle; ex, exocuticle; g, glycogen; bi, basal invaginations; m, mitochondria; ms, margin of the sensillum; mv, microvilli; n, nucleus; rer, rough endoplasmic reticulum; ser, smooth endoplasmic reticulum.

Class 3 cells did not touch either the apex or the basement membrane of the gland. Their cytoplasm predominantly contained vesicles of moderate electron density (Fig. 4E), but also contained rough ER and free ribosomes, Golgi apparatus, mitochondria, microtubules and rare electron-dense granules. The cells were equipped with porous receiving canals continuous with a conducting canal approximately 0.4  $\mu\text{m}$  in diameter. The conducting canal comprised

inner (approximately 40 nm thick) and outer (approximately 6 nm thick) epicuticles (Fig. 4E).

#### DISCUSSION

The labral gland is an integral part of the labrum, which is a thin lip-like structure that covers the dorsal side of the pre-oral cavity. The labral gland

belongs to the basic body plan of termites. However, its presence has rarely been investigated. Here we report on its presence and cytological features in soldiers of 28 species across the termite phylogeny. The presence of the labral gland in all observed species was unexpected as the gland has only been reported in soldiers of three termite species previously (Deligne *et al.*, 1981; Quennedey, 1984; Šobotník *et al.*, 2010b; Costa-Leonardo & Hafig, 2014). The labral gland was originally recognized as an exocrine organ by Deligne *et al.* (1981). Quennedey (1984) described the hypopharyngeal part of the labral gland and suggested that the occurrence of the hyaline tip proves the presence of the labral gland in termite soldiers. It was only recently, and following Šobotník *et al.*'s (2010b) study on the defensive glands in *Glossotermes oculatus*, and Costa-Leonardo & Hafig's (2014) study on the labral gland in *Cornitermes cumulans*, that additional data on the labral gland appeared. In addition to the presence of the labral gland in termite soldiers, it was also recently observed in some imagoes (Křížková *et al.*, 2014) and certain workers (Palma-Onetto V and Šobotník J, our unpublished data). These random observations suggest that the labral gland might be present in all termite castes, pointing to its importance during termite evolution.

The labral gland is split into two secretory regions located in the ventral part of the labrum and dorso-apical part of hypopharynx, respectively. Although the secretory epithelium is always thicker in the labral part, the ultrastructure of secretory cells present in these two secretory regions is virtually identical. We therefore expect that both secretory regions play the same role, and should thus be treated as a single gland. The nomenclatural change from 'labral gland' to 'cibarial gland' proposed by Quennedey (1984), based on gland development in two regions, is therefore redundant and the original name, well accepted by the scientific community, should prevail.

The hyaline tip is a traditionally described morphological character. The dorsal side of the labrum is always sclerotized, while the ventral part is always formed by a lucent membranous cuticle. However, species may differ in the level of sclerotization of the dorsal side, especially at the labrum apex. While some soldiers show an unchanged level of labrum sclerotization (hyaline tip absent), the level of sclerotization often decreases towards the labrum apex in others (hyaline tip present). All basal taxa primarily lack the hyaline tip, which evolved in a common ancestor of Rhinotermitidae and Termitidae, and was subsequently lost at least four times independently: once in Nasutitermitinae, in which the entire labrum is greatly reduced in size, twice independently in lineages with snapping soldiers, *Pericapritermes*

and *Neocapritermes + Planicapritermes*, and once in *Microcerotermes*. While the hyaline tip has been shown to disappear in some lineages, the labral gland was found in all termite families studied here. This suggests that the evolution of snapping mandibles did not see a loss of the labral gland and that the evolution of mandibles has not necessarily been accompanied by a reduction or loss of chemical adaptation (Kyjaková *et al.* 2015).

The cytological features of the labral gland showed many similarities among all studied species. Additionally, the four species with polymorphic soldiers that we studied showed that the labral gland volume increased with sub-caste size and was particularly pronounced in *Psammotermes hybostoma*.

The common features shared by labral and hypopharyngeal parts of the labral glands include: (1) abundance of smooth ER, (2) the presence of apical microvilli with a central channel, (3) well-developed basal invaginations ensuring the intake of precursors from the haemolymph, and (4) cuticular modifications in the tip of the labral gland allowing gland secretions to reach the exterior (see also Deligne *et al.*, 1981; Quennedey, 1984; Šobotník *et al.*, 2010b; Costa-Leonardo & Hafig, 2014). These ultrastructural features are a conservative account of the characteristics of the two secretory regions in the studied species, which suggest that the labral gland has the same function among all species. The labral gland secretion is stored between the secretory epithelium and the overlying cuticle, as well as within the cuticle itself. Labral secretions from the glandular cells are under neural control, supposedly from the brain, as singular axons have often been detected at the base of the secretory epithelium.

The function of the labral gland is probably not defensive due to the absence of a reservoir, a feature characteristic of defensive glands (Chapman, 2013). Additionally, the labral gland is present in soldiers of all species, irrespective of their defensive strategies, including species having soldiers with nasus glands, with snapping mandibles or performing body rupture. The composition of the labral gland secretion remains unknown despite our repeated attempts to identify labral gland-specific compounds. This may be due to the small size of the labral gland and the unknown nature of its secretion. Nevertheless, the high abundance of a smooth ER suggests that the secretion may have a lipidic and volatile nature and could be used in communication (Percy-Cunningham & MacDonald, 1987; Nakajima, 1997; Tillman *et al.*, 1999; Alberts *et al.*, 2002).

The presence of specialized receptors on the ventral side of the labrum is likely to aid in dosage of labral secretions. As all observed receptors contained several

dendrites, a chemosensory function is likely for all species while a mechanoreceptive function remains hypothetical. The idea that the labral receptors respond to mechanical pressure has a functional parallel in the sternal gland, secretion releases from which are controlled by groups of campaniform sensillae (Stuart & Satir, 1968; Quennedey *et al.*, 2008).

Class 3 cells occur frequently on the dorsal side of the labrum and on the sclerotized body cuticle (Šobotník *et al.*, 2004; Šobotník, Weyda & Hanus, 2005). Class 3 cells may also occur adjacent to the labral gland secretory epithelium but should not be considered as part of the labral gland until the two cell classes are combined, as seen in *G. oculatus* (Šobotník *et al.*, 2010b), the minor soldiers of *D. longilabius* (presented here), *C. cumulans* (Costa-Leonardo & Hafig, 2014) and *T. hospes* (presented here). Class 3 cells have not been observed in the hypopharyngeal part of the labral gland in any of above-mentioned species. The ultrastructure of the class 3 secretory cells is uniform in termites, irrespective of their caste (Costa-Leonardo & Shields, 1990; Šobotník *et al.*, 2004) and position in the gland, such as mandibular (Lambinet, 1959; Cassier, Fain-Maurel & Lebrun, 1977), sternal (Noirot & Quennedey, 1974; Quennedey *et al.*, 2008), tergal (Ampion & Quennedey, 1981; Šobotník *et al.*, 2005) and epidermal (Šobotník *et al.*, 2003). The secretory cells are always rich in rough ER and Golgi apparatus, and contain variable amounts of moderately electron-lucent vesicles released to the extracellular reservoir ('end apparatus'), into which the cuticular canal is inserted. This ultrastructure suggests that rough ER produces proteinaceous water-soluble secretions that are configured in the Golgi apparatus (Hand & Oliver, 1984) before being released on the surface of the body cuticle. These secretions may appear as the uppermost layer of the epicuticles protecting the lower layers from abrasion (Chapman, 2013).

#### CONCLUSION AND FURTHER HYPOTHESES

The labral gland has previously been suggested to be a synapomorphy of Neoisoptera (Šobotník *et al.*, 2010a). The presence of the labral gland in termite soldiers of all studied species suggests that the labral gland evolved with the soldier caste where it has remained an important organ. Moreover, the labral gland has long been thought to primarily have a defensive function. Gland secretion was thought to be on the mandibles and deposited into the wound following bite (Deligne *et al.*, 1981; Quennedey, 1984; Šobotník *et al.*, 2010b; Costa-Leonardo & Hafig, 2014). However, preliminary observations based on the morphology, structure and

ultrastructure of the labral gland suggest that labral gland secretion has a communicative function.

The presence of a labral gland in soldiers of all termite species suggests that it has a fundamental role in colony survival and success. Our data suggest that the function of the labral gland may be related to communication. This hypothesis is supported by personal observations of soldiers wiping their labrum against the floor after encountering an enemy. A better understanding of the function of the labral gland in termites is called for to enhance knowledge of termite defence mechanisms and communication behaviour.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Credit for Figure 1B goes to Aleš Buček (OIST, Japan). We thank Mirek Hylíš from the Laboratory of Electron Microscopy (Faculty of Sciences, Charles University in Prague) for his help and support with SEM and TEM. We are grateful to Yves Roisin for constructive criticism of the manuscript. We also thank three anonymous reviewers for their helpful comments and suggestions. Financial support was provided by the project IGA FLD No. A13/17 (Czech University of Life Sciences, Prague).

#### REFERENCES

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. 2002. *Molecular Biology of the cell: the endoplasmic reticulum*, 4th edn. New York: Garland Science.
- Ampion M, Quennedey A. 1981. The abdominal epidermal glands of termites and their phylogenetic significance. In Howse PE, Clément JL, eds. *Biosystematics of social insects*. London: Academic Press, 249–261.
- Billen J, Šobotník J. 2015. Insect exocrine glands. *Arthropod Structure & Development* **44**: 399–400.
- Bourguignon T, Lo N, Cameron SL, Šobotník J, Hayashi Y, Shigenobu S, Watanabe D, Roisin Y, Miura T, Evans TA. 2015. The evolutionary history of termites as inferred from 66 mitochondrial genomes. *Molecular Biology and Evolution* **32**: 406–421.
- Bourguignon T, Šobotník J, Brabcová J, Sillam-Dussès D, Buček A, Krasulová J, Vytisková B, Demianová Z, Mareš M, Roisin Y, Vogel H. 2016. Molecular mechanism of the two-component suicidal weapon of *Neocapritermes taracua* old workers. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 809–819.
- Bourguignon T, Lo N, Šobotník J, Ho SY, Iqbal N, Coissac E, Lee M, Jendryka MM, Sillam-Dussès D, Krížková B, Roisin Y, Evans TA. 2017. Mitochondrial phylogenomics resolves the global spread of higher termites, ecosystem engineers of the tropics. *Molecular Biology and Evolution* **34**: 589–597.

- Cassier P, Fain-Maurel MA, Lebrun D. 1977.** Electron microscopic study of the mandibular glands of *Kaloterme flavicollis* Fabr. (Isoptera; Calotermitidae). *Cell and Tissue Research* **182**: 327–339.
- Chapman RF. 2013.** The insects: structure and function, 5th edn. In Simpson SJ, Douglas AE, eds. *The integument, gas exchange and homeostasis*. Cambridge: Cambridge University Press, 464–496.
- Costa-Leonardo AM, Shields KS. 1990.** Morphology of the mandibular glands in workers of *Constrictotermes cyphergaster* (Silvestri) (Isoptera: Termitidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **19**: 61–64.
- Costa-Leonardo AM, Hafig I. 2014.** Termite communication during different behavioral activities. In Witzani G, ed. *Biocommunication of animals*. Dordrecht: Springer, 161–190.
- Deligne J, Quenenedey A, Blum MS. 1981.** The enemies and defense mechanisms of termites. In Hermann HR, ed. *Social insects, Vol. 2*. New York: Academic Press, 1–76.
- Hand AR, Oliver C. 1984.** The role of GERL in the secretory process. In Cantin M, ed. *Cell biology of the secretory process*. Basel: Karger Publishers, 148–170.
- Haverty ML. 1977.** The proportion of soldiers in termite colonies: a list and a bibliography. *Sociobiology* **2**: 199–216.
- Kyjaková P, Dolejšová K, Krasulová J, Bednářová L, Hadravová R, Pohl R, Hanus R. 2015.** The evolution of symmetrical snapping in termite soldiers need not lead to reduced chemical defence. *Biological Journal of the Linnean Society* **115**: 818–825.
- Korb J. 2011.** Termite mound architecture, from function to construction. In Bignell ED, Roisin Y, Lo N, eds. *Biology of termites: a modern synthesis*. Dordrecht: Springer, 349–373.
- Křížková B, Bourguignon T, Vytisková B, Šobotník J. 2014.** The clypeal gland: a new exocrine gland in termite imagoes (Isoptera: Serritermitidae, Rhinotermitidae, Termitidae). *Arthropod Structure & Development* **43**: 537–542.
- Lambinet F. 1959.** La glande mandibulaire du termite à cou jaune (*Caloterme flavicollis*). *Insectes Soc.* **6**: 165–17.
- Maddison WP, Maddison DR. 2010.** *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. 2011; Version 2.75*. Available at: [mesquiteproject.org/mesquite/download/download.html](http://mesquiteproject.org/mesquite/download/download.html)
- Nakajima T. 1997.** Cytochrome P450 isoforms and the metabolism of volatile hydrocarbons of low relative molecular mass. *Journal of Occupational Health*, **39**: 83–91.
- Noirot C, Quenenedey A. 1974.** Fine structure of insect epidermal glands. *Annual Review of Entomology* **19**: 61–80.
- Percy-Cunningham JE, MacDonald JA. 1987.** Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands. In Prestchich GD, Blomquist GJ, eds. *Pheromone biochemistry*. London: Academic Press, 27–75.
- Prestwich GD. 1984.** Defense mechanisms of termites. *Annual Review of Entomology* **29**: 201–232.
- Quenenedey A. 1984.** Morphology and ultrastructure of termite defense glands. In Hermann HR, ed. *Defensive mechanisms in social insects*. New York: Praeger, 151–200.
- Quenenedey A, Sillam-Dussès D, Robert A, Bordereau C. 2008.** The fine structural organization of sternal glands of pseudergates and workers in termites (Isoptera): a comparative survey. *Arthropod Structure & Development* **37**: 168–185.
- Redford KH, Dorea JG. 1984.** The nutritional value of invertebrates with emphasis on ants and termites as food for mammals. *Journal of Zoology* **203**: 385–395.
- Stuart AM, Satir P. 1968.** Morphological and functional aspects of an insect epidermal gland. *Journal of Cell Biology* **36**: 527–549.
- Šobotník KJ, Weyda F, Hanus R. 2003.** Ultrastructure of epidermal glands in neotenic reproductives of the termite *Prorethoterme simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Arthropod Structure & Development* **32**: 201–208.
- Šobotník J, Weyda F, Hanus R, Kyjaková P, Doubský J. 2004.** Ultrastructure of the frontal gland in *Prorethoterme simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae) and quantity of the defensive substance. *European Journal of Entomology* **101**, 153–163.
- Šobotník J, Weyda F, Hanus R. 2005.** Ultrastructural study of tergal and posterior sternal glands in *Prorethoterme simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae). *European Journal of Entomology* **102**: 81–88.
- Šobotník J, Jiřosová A, Hanus R. 2010a.** Chemical warfare in termites. *Journal of Insect Physiology* **56**: 1012–1021.
- Šobotník J, Bourguignon T, Hanus R, Weyda F, Roisin Y. 2010b.** Structure and function of defensive glands in soldiers of *Glossotermes oculatus* (Isoptera: Serritermitidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **99**: 839–848.
- Šobotník J, Bourguignon T, Hanus R, Demianová Z, Pytelková J, Mareš M, Foltynová P, Preisler J, Cvačka J, Krasulová J, Roisin Y. 2012.** Explosive backpacks in old termite workers. *Science* **337**: 436.
- Šobotník J, Kutalová K, Vytisková B, Roisin Y, Bourguignon T. 2014.** Age-dependent changes in ultrastructure of the defensive glands of *Neocapriterme taracua* workers (Isoptera, Termitidae). *Arthropod Structure & Development* **43**: 205–210.
- Tillman JA, Seybold SJ, Jurenka RA, Blomquist GJ. 1999.** Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**: 481–514.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Figure S1.** Scanning electron micrograph of the mouth parts of *Nasutitermes lujae*, with antennae and part of the maxillary palp removed.

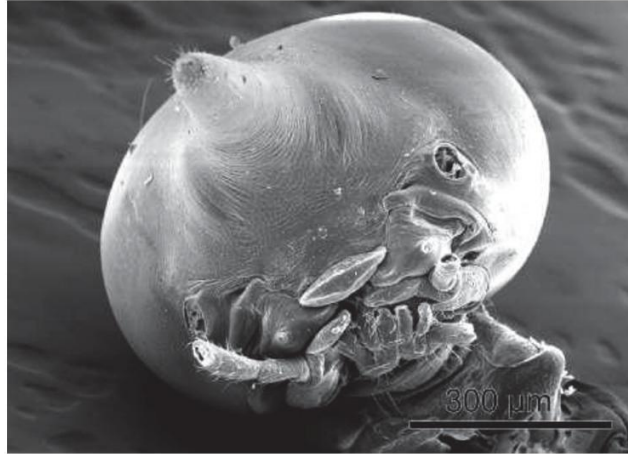
**Figure S2.** Labral gland development. Sagittal sections of the labrum in: (1) *Mastotermes darwiniensis*, (2) *Hodotermopsis sjoestedti*, (3) *Neotermes cubanus* small soldier, (4) *Neotermes cubanus* large soldier, (5) *Dolichorhinotermes longilabius* small soldier, (6) *Dolichorhinotermes longilabius* large soldier, (7) *Prorhinotermes simplex*, (8) *Psammotermes hybostoma* small soldier, (9) *Psammotermes hybostoma* medium soldier, (10) *Psammotermes hybostoma* large soldier, (11) *Termitogeton planus*, (12) *Glossotermes oculatus*, (13) *Reticulitermes flavipes*, (14) *Coptotermes formosanus*, (15) *Sphaerotermes sphaerothorax*, (16) *Pericapritermes* sp., (17) *Microcerotermes* sp., (18) *Spinitermes* sp., (19) *Globitermes globosus* small soldier, (20) *Globitermes globosus* large soldier, (21) *Globitermes sulphureus*, (22) *Termes hospes*, (23) *Inquilinitermes fur*, (24) *Neocapritermes taracua*, (25) *Planicapritermes planiceps*, (26) *Dentispicotermes brevicarinatus*, (27) *Labiotermes labralis*, (28) *Embiratermes neotenicus*, (29) *Indotermes* sp., (30) *Nasutitermes lujae*, (31) *Constrictotermes cavifrons*, (32) *Hirtitermes* sp., (33) *Trinervitermes* sp.

**Figure S3.** Ultrastructure of the labral gland in soldiers. (A) Non-modified epithelium surrounding the labral gland in *Hirtitermes* sp. (B) Labral gland development in *Hirtitermes* sp. (C) Labral gland development in *Nasutitermes lujae*. Note the highly electron-dense vesicles. (D) Pinocytotic activity at the cell base in the labral epithelium in the large soldier of *Dolichorhinotermes longilabius*. Arrows indicate the pinocytotic activity at the base of the cell. (E) View of the central channel present in the microvilli, allowing secretion release from secretory cells. Abbreviations: en, endocuticle; ex, exocuticle; l, lipid-like droplet; mv, microvilli; n, nucleus; v, vesicle.

**Figure S4** Ultrastructural features in the labral gland. (A) Highly modified cuticle underlying the labral gland in *Neocapritermes taracua*. (B) Detail of apical glandular cuticle at the tip of the labral gland in *Nasutitermes lujae* showing epicuticular pores allowing secretion out from the body. (C) Chemoreceptors containing four or five axons going through the labral epithelium in *Hirtitermes* sp. (D) Large microtubule bundles running through secretory cells in *Hodotermopsis sjoestedti*. (E) Tracheae going through labral gland cells in *Mastotermes darwiniensis*. Abbreviations: dd, distal dendrite; dg, electron-dense granule; en, endocuticle; ep, epicuticle; ex, exocuticle; lv, electron-lucent vesicle; m, mitochondria; mb, microtubule bundle; mv, microvilli; n, nucleus; s, secretion; ser, smooth endoplasmic reticulum; tr, trachea; v, vesicle.

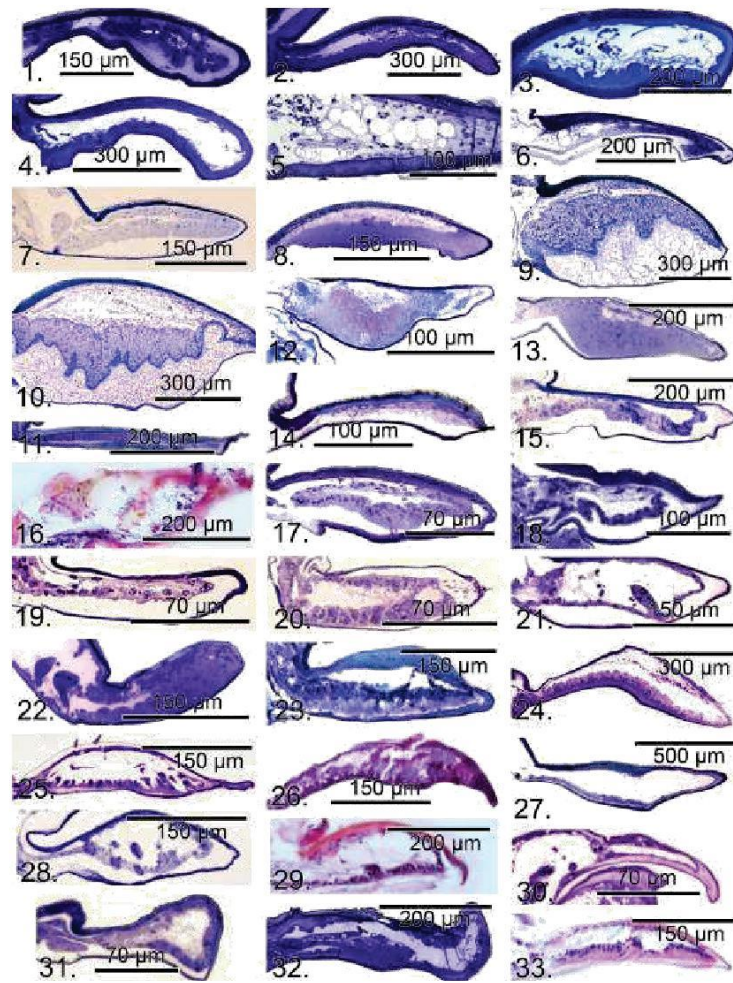
**Table S1.** List of studied termite species, with indication of the fixation buffer used, collection location, species and subcastes (if any), number of repetitions, and labral and hypopharynx epithelium measures ( $\mu\text{m}$ ). The last four columns provide detail of the cells analysed by TEM, with indication of cell type, thickness of cuticular layers, smooth ER and presence of axons. Abbreviations: n.a., not applicable; Y, yes.

Supplementary materials

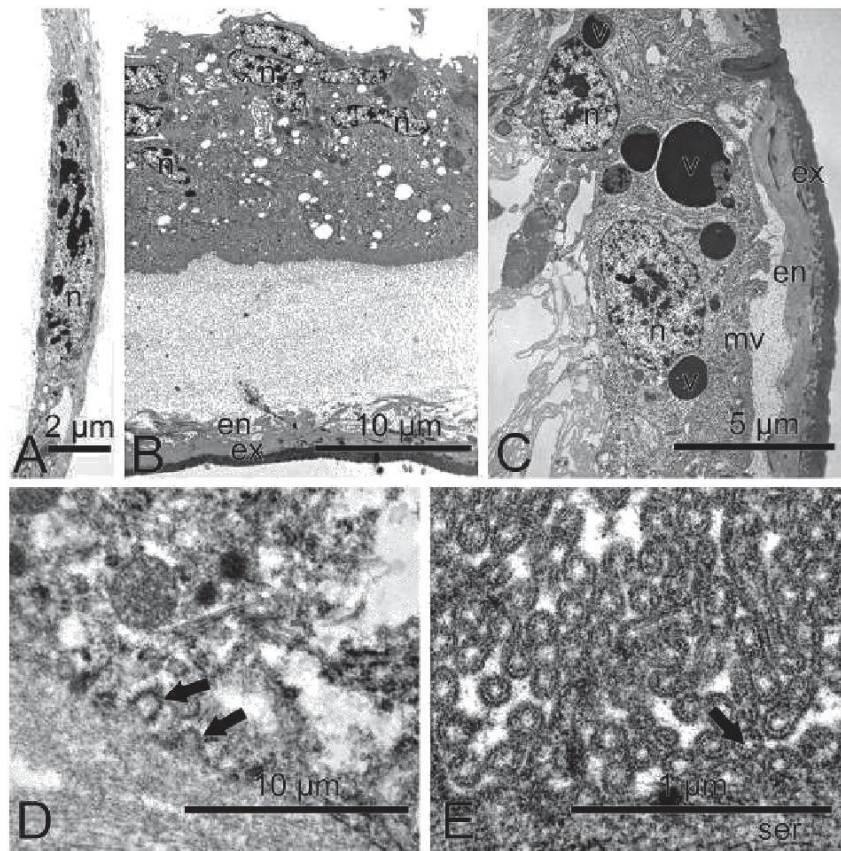


**Figure S1.** Scanning electron microscopy picture of the mouth parts of *N. lujae*, with antennae and part of the maxillary palp removed.

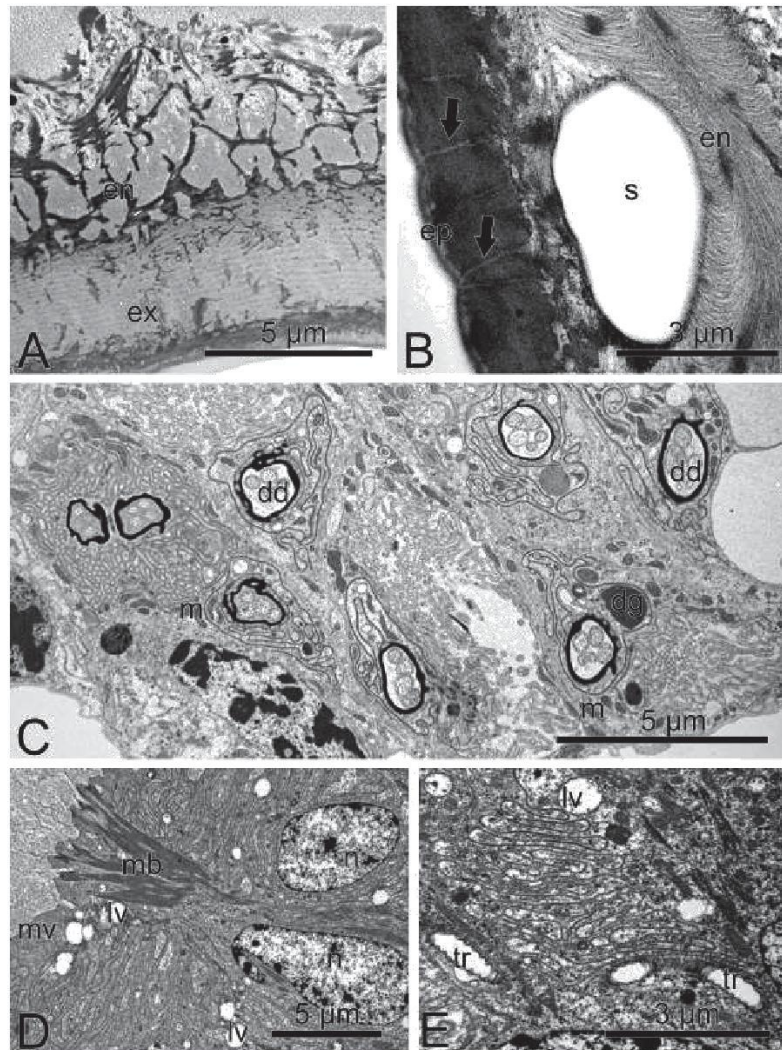




**Figure S2.** Labral gland development. Sagittal sections of the labrum in: 1) *Mastotermes darwiniensis*, 2) *Hodotermopsis sjöstedti*, 3) *Neotermes cubanus* small soldier, 4) *Neotermes cubanus* large soldier, 5) *Dolichorhinotermes longilabius* small soldier, 6) *Dolichorhinotermes longilabius* large soldier, 7) *Prorhinotermes simplex*, 8) *Psammotermes hybostoma* small soldier, 9) *Psammotermes hybostoma* medium soldier, 10) *Psammotermes hybostoma* large soldier, 11) *Termitogeton planus*, 12) *Glossotermes oculatus*, 13) *Reticulitermes flavipes*, 14) *Coptotermes formosanus*, 15) *Sphaerotermes sphaerotherax*, 16) *Pericapritermes* sp., 17) *Microcerotermes* sp., 18) *Spinitermes* sp., 19) *Globitermes globosus* small soldier, 20) *Globitermes globosus* large soldier, 21) *Globitermes sulphureus*, 22) *Termes hospes*, 23) *Inquilinitermes fur*, 24) *Neocapritermes taracua*, 25) *Planicapritermes planiceps*, 26) *Dentispicotermes brevicarinatus*, 27) *Labiotermes labralis*, 28) *Embiratermes neotenicus*, 29) *Indotermes* sp., 30) *Nasutitermes lujae*, 31) *Constrictotermes cavifrons*, 32) *Hirtitermes* sp., 33) *Trinervitermes* sp.



**Figure S3.** Ultrastructure of the labral gland in soldiers. (A) Non-modified epithelium surrounding the labral gland in *Hirtitermes sp.* (B) Labral gland development in *Hirtitermes sp.* (C) Labral gland development in *N. lujae*. Note the highly electron-dense vesicles. (D) Pinocytotic activity at the cell base in the labral epithelium in the large soldier of *D. longilabius*. The arrows indicate the pinocytotic activity at the base of the cell. (E) View of the central channel present in the microvilli, allowing secretion release from secretory cells. Abbreviations: en = endocuticle, ex = exocuticle, l = lipid-like droplet, mv = microvilli, n = nucleus, v = vesicle.



**Figure S4** Ultrastructural features in the labral gland. (A) Highly modified cuticle underlying the labral gland in *N. taracua*. (B) Detail of apical glandular cuticle at the tip of the labral gland in *N. lujae* showing epicuticular pores leading the secretion out from the body. (C) Chemoreceptors containing 4 or 5 axons going through the labral epithelium in *Hirtitermes* sp. (D) Large microtubule bundles running through secretory cells in *H. sjostedti*. (E) Tracheae going through labral gland cells in *M. darwiniensis*. Abbreviations: dd = distal dendrite, en = endocuticle, ep = epicuticle, ex = exocuticle, lv = electron-lucent vesicle, m = mitochondria, mb = microtubule bundle, mv = microvilli, n = nucleus, s = secretion, ser = smooth endoplasmic reticulum, tr = trachea, v = vesicle.

Genus	Species	Group	Sub-Cryst	No. of layers	Fluoride buffer	Embedding medium	TEM	EDX	Collector, plus label (if)	U-Minimum (µm)	U-Maximum (µm)	Hyphal MSD	Methyl Blue	Sections/crystals	Thickness of exocuticle in µm	Thickness of exocuticle in apiculate in µm	Thickness of SPP in µm	Face amount at the base of apiculate
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	1	Phosphate	Resin	Y	Y	BAM, Berlin, Germany	23.64	5.25	29.48	18.00	1	2.7140.12	2.5340.08	0.0240	Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Coccolite	Resin	Y	Y	IRD, Bondy, France	42.75	26.25	26.25	18.1	1	5.6140.2	4.4440.08	0.0640.01	Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	large soldier	1	Phosphate	Resin	Y	Y	CLS, Pagan, Czech Republic	33.10	6.00	24.40	12.11	1	7.9140.21	2.0640.1	0.0340	Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	large soldier	2	Coccolite	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	20.00	7.99	20.00	16.69	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	small soldier	1	Coccolite	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	30.30	3.82	15.76	13.90	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	small soldier	2	Phosphate	Resin	Y	Y	CLS, Pagan, Czech Republic	19.73	5.92	18.43	12.58	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	large soldier	4	Phosphate	Resin	Y	Y	CLS, Pagan, Czech Republic	46.77	27.42	27.42	18.00	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	medium soldier	3	Phosphate	Resin	Y	Y	Kharga, Egypt	10.21	46.67	10.21	5.58	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	small soldier	2	Phosphate	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	20.50	9.11	10.22	34.88	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	small soldier	2	Phosphate	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	10.21	46.67	10.21	5.58	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	6	Coccolite	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	115.04	37.45	152.10	72.84	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Phosphate	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	58.93	13.51	41.43	72.79	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Phosphate	Resin	Y	Y	BAM, Berlin, Germany	33.32	6.57	5.98	29.55	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Phosphate	Paraffin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	10.21	46.67	10.21	5.58	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	10	Boau's	Paraffin	Y	Y	Biabang, Vietnam, China	5.43	1.20	7.68	6.18	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Coccolite	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	11.12	2.78	15.82	15.82	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Coccolite	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	13.01	5.96	23.45	7.20	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	large soldier	1	Coccolite	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	10.21	46.67	10.21	5.58	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	small soldier	1	Coccolite	Resin	Y	Y	Singapore	6.21	1.84	6.09	5.22	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Coccolite	Resin	Y	Y	Phao Dong, Thailand	6.68	2.67	11.80	5.20	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Coccolite	Resin	Y	Y	IRD, Bondy, France	38.83	8.19	35.79	32.1	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	small soldier	2	Coccolite	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	38.83	8.19	35.79	32.1	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	1	Phosphate	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	35.60	8.08	23.17	52.38	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Phosphate	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	30.95	6.41	4.98	15.74	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	4	Phosphate	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	34.42	13.2	13.40	24.97	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Coccolite	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	11.30	2.41	8.35	15.03	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	15	Phosphate	Paraffin	Y	Y	Biabang, Vietnam, China	11.77	4.65	7.01	27.18	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Coccolite	Resin	Y	Y	Perit-Saint, French Guiana	6.67	2.08	8.81	9.19	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	2	Phosphate	Resin	Y	Y	Phao Dong, Thailand	30.29	2.97	7.46	15.15	1				Y
Microtermes	<i>Microtermes</i>	Microtermitidae	n.a.	10	Boau's	Paraffin	Y	Y	Biabang, Vietnam, China	31.14	1.12	17.79	20.51	1				Y

Část III - Labrální žláza termitů: evoluce a funkce

**The labral gland in termites: evolution and function**

**Labrální žláza termitů: evoluce a funkce**

Autoři: Valeria Palma-Onetto, Jitka Pfliegerová, Rudy Plarre, Jiří Synek, Josef

Cvačka, David Sillam-Dussès a Jan Šobotník

Přijato k tisku: 12. prosince 2018 v Biological Journal of the Linnean Society

## The labral gland in termites: evolution and function

VALERIA PALMA-ONETTO<sup>1,2</sup>, JITKA PFLÉGEROVÁ<sup>3</sup>, RUDY PLARRE<sup>4</sup>, JIŘÍ SYNEK<sup>2</sup>, JOSEF CVAČKA<sup>5</sup>, DAVID SILLAM-DUSSES<sup>1,7</sup> and JAN ŠOBOTNÍK<sup>2,\*,7,8</sup>

<sup>1</sup>University Paris 13 - Sorbonne Paris Cité, Laboratory of Experimental and Comparative Ethology, EA 4443, Villetaneuse, France

<sup>2</sup>Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Institute of Entomology, Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic

<sup>4</sup>Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin, Germany

<sup>5</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

Received 16 November 2018; revised 12 December 2018; accepted for publication 12 December 2018

Termites are important contributors to ecosystem functioning. They are highly abundant in tropical and sub-tropical habitats, and represent an important resource for a wide range of predators. Their evolutionary success is driven largely by a life in populous colonies with a complex communication system controlled by a rich set of exocrine glands whose secretions are involved in many aspects of termite life. As many as 20 different exocrine organs are known to occur in termites. Among them, the labral gland has been largely understudied. Here we examine the structure of the labral gland in workers of 28 species and imagoes of 33 species across all termite taxa, and in the *Cryptocercus* wood roach. The labral gland is present in all species, and comprises two secretory regions located on the ventral side of the labrum and the dorso-apical part of the hypopharynx, respectively. The epithelium of the gland consists of class 1 secretory cells with an abundance of smooth endoplasmic reticulum, and long microvilli with a channel inside, which releases secretion through a modified cuticle. Our observations suggest that the labral gland is involved in defensive communication after encounter with a non-nestmate.

ADDITIONAL KEYWORDS: development – evolution – exocrine gland – Isoptera – Termitoidae – ultrastructure.

### INTRODUCTION

Termites are among the most important decomposers of dead plant material and are of prime importance in both natural and urban areas. Their impact in tropical regions is immense: they ingest 50–100% of raw plant biomass in tropical forests (Bignell & Eggleton, 2000). They probably participated in reducing terrestrial carbon reserves after their adaptive radiation at the beginning of the Tertiary (Engel *et al.*, 2009). They also contribute significantly to the world's atmospheric carbon dioxide and methane (Sugimoto *et al.*, 2000). Termites are often called ecosystem engineers due to their dramatic impact on terrestrial environments, including release of nutrients from dead vegetal

matter, soil aeration, transport of tonnes of different materials per hectare and year, and increase in soil heterogeneity and net productivity (Jouquet *et al.*, 2006; Eggleton, 2011; Evans *et al.*, 2011).

The importance of termites is reflected by their abundance, often exceeding 1000 individuals/m<sup>2</sup> in tropical regions (Eggleton *et al.*, 1996; Dahlsjö *et al.*, 2014). Termites also represent an important food source for a wide variety of predators (Deligne *et al.*, 1981; Redford & Dorea, 1984). Selection pressures on termites have resulted in an arms race leading to improved defensive abilities, best expressed in the specialized caste of defenders, soldiers (Haverty, 1977; Deligne *et al.*, 1981; Krishna *et al.*, 2013). However, workers are also important in defence, as they construct below- or above-ground galleries and nests, which have a primarily protective function (Eggleton, 2011). Termite colony members, in general, live in a

\*Corresponding author. E-mail: sobotnik@fd.czu.cz

<sup>7</sup>These authors contributed equally to the study.

protected closed system of chambers and galleries, although the alate imagoes are an exception as they leave the maternal nest to establish new colonies, and this is when they are most at-risk, often being eaten by non-specialized predators or are later outcompeted by older colonies (Nutting, 1979). However, the defensive mechanisms of termites have been almost exclusively studied in soldiers (for a review see Šobotník *et al.*, 2010a), while those of imagoes and workers have largely been neglected (but see e.g. Sands, 1982; Thorne, 1982; Piskorski *et al.*, 2009; Šobotník *et al.*, 2012; Bourguignon *et al.*, 2015).

Exocrine glands can have multiple functions, producing pheromones, defensive chemicals, antibiotics, lubricants and digestive enzymes (Chapman, 2013). They are organs of fundamental importance in all insects, being most abundant and most diverse in social insects (Billen & Šobotník, 2015). The complex lives of social insects are also reflected by plentiful chemical signals produced by as many as 149 different glands described so far. While ants possess 84 exocrine glands producing mostly infochemical signals (Hölldobler & Wilson, 1990; Billen & Šobotník, 2015), only 20 exocrine glands have so far been described in termites. Some termite exocrine glands are present in all castes, but may be inactive in larval instars (Šobotník & Hubert, 2003; Šobotník & Weyda, 2003), while others are limited to only some species and castes. The exocrine glands produce secretions related to sexual behaviour occurring in winged imagoes, or to defence in soldiers, workers and imagoes.

The frontal gland is a defensive organ of prime importance in termites, occurring in most Neoisoptera (Stylotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae, Termitidae) soldiers and imagoes (Prestwich & Collins, 1982; Quennedey, 1984; Šobotník *et al.*, 2004, 2010b; Piskorski *et al.*, 2009; Wu *et al.* 2018), and in some workers (Šobotník *et al.*, 2010c). Another important organ, the labial glands, is universally present in termites (Noirot, 1969; Billen *et al.*, 1989; Šobotník & Weyda, 2003). Their function in workers is connected to feeding (Noirot, 1969; Reinhard *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2008) and nest construction (Noirot, 1969; Reinhard *et al.*, 2002), while in all soldiers and in workers of soldierless species they produce defensive secretions (Sillam-Dussès *et al.*, 2012). Workers in general have developed different means of defence, protecting them during foraging activities or during invasion of predators into the nest (Deligne *et al.*, 1981; Prestwich, 1984; Šobotník *et al.*, 2012; Bourguignon *et al.*, 2015; Poiani & Costa-Leonardo, 2016). The most important contribution of workers to colony defence is via passive defence, such as gallery construction and nest fortification (Šobotník *et al.*, 2010a). Termite workers are often directly engaged in nest defence (Thorne, 1982; Binder, 1988), and this is

of particular interest with regard to (1) conflicts with conspecific colonies defended primarily by soldier-produced toxins due to the presence of specific auto-detoxification mechanisms (Spanton & Prestwich, 1982), (2) soldierless species in which workers are considerably more aggressive than soldiered species (Sands, 1982; Šobotník *et al.*, 2010a), (3) dehiscence mechanisms when the body wall ruptures and intestinal contents contaminate opponents (Sands, 1982); and (4) autothysis connected to the release of toxic or incapacitating compounds from inside the body (Costa-Leonardo, 2004; Šobotník *et al.*, 2010a, 2012; Bourguignon *et al.*, 2015; Poiani & Costa-Leonardo, 2016).

The labral gland is an important termite secretory organ, but has been studied in detail only in soldiers so far (Deligne *et al.*, 1981; Quennedey, 1984; Šobotník *et al.*, 2010d; Costa-Leonardo & Haifig, 2014; Palma-Onetto *et al.*, 2018). It was first reported on the ventral side of the labrum in *Macrotermes bellicosus* (Deligne *et al.*, 1981), later observed on the dorsal side of the hypopharynx in the same species (Quennedey, 1984), and finally reported to occur in all termite soldiers (Palma-Onetto *et al.*, 2018). The gland epithelium in soldiers consists of class 1 secretory cells in most representatives, with additional class 3 secretory cells in a few species (Šobotník *et al.*, 2010d; Costa-Leonardo & Haifig, 2014; Palma-Onetto *et al.*, 2018). Here, we describe the occurrence, structure and ultrastructure of the labral gland in a representative set of termite workers and imagoes, as well as in the wood roach *Cryptocercus punctulatus*.

## MATERIAL AND METHODS

### SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, OPTICAL MICROSCOPY AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

Observations of the labrum and hypopharynx were made using optical, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). We examined workers (including sub-castes if present) of 28 species and imagoes of 33 species representing most extant termite taxa (see Krishna *et al.*, 2013). We also examined nymphs and female adults in the cockroach *Cryptocercus punctulatus*, member of the sister group to termites (Lo *et al.*, 2000; Inward *et al.*, 2007). The procedures used for optical microscopy, TEM and SEM are well established in our lab, and correspond to those provided in detail by Šobotník & Weyda (2003) and Palma-Onetto *et al.* (2018). Important data are summarized in Supporting Information Tables S1–S3. We also used an FEI Helios NanoLab 660 G3 UC scanning electron

microscope with focused ion beam milling equipped for cryo-imaging and correlative light-electron microscopy.

#### BEHAVIOURAL EXPERIMENTS

Two types of bioassays were performed. In the first experimental set-up, we ran arena tests in *Glossotermes oculatus* and *Coptotermes testaceus* groups of five workers and two soldiers, to which we introduced a single intruder, a worker of a different termite species or an ant. The behaviour resulting from subsequent encounters was recorded and specific behavioural patterns were subsequently analysed. The tests were performed under dimmed artificial light, and Canon EOS 60D, 6D or 5D SR cameras combined with Canon EF 100-mm f/2.8L Macro IS USM lenses were used.

In the second experimental set-up, labral extracts were prepared by dissecting 60 labra of *Prorhinotermes canalifrons* soldiers (four replicates), which were then extracted in 400  $\mu$ L of either hexane or methanol (two repetitions for each solvent), and used in behavioural tests (repeated six times for each stimulus). These tests consisted of placing groups of *Prorhinotermes canalifrons* (two soldiers and eight workers) in a Petri dish lined with filter paper split into two sectors: labral extracts (six labra equivalents in 40  $\mu$ L of solvent) vs. control 1 (six legs equivalents in 40  $\mu$ L of solvent; leg extracts prepared as for labra) or control 2 (40  $\mu$ L pure solvent). The same bioassay was performed six times using groups of *Reticulitermes flavipes* consisting of two soldiers and eight workers, to test for a possible effect on another termite species. The number of termites on each sector was recorded using the above-mentioned equipment 10 min after the introduction of termites to the Petri dish. The number of termites choosing the sector treated with labral extracts was compared with the one in solvent via Student's *t*-test (Norusis, 1990). To identify any preference for a sector, t-Student's *t*-tests were used if the comparison between sectors from the same Petri dish was normal, and a Mann-Whitney U test was used if it was not normal (Norusis, 1990).

#### CHEMICAL ANALYSES

Chemical analyses using samples of 100 labra or 100 legs (as control) extracted in methanol or hexane were carried out using a 6890N gas chromatograph (Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to a 5975B quadrupole mass spectrometer equipped with an HP5ms fused silica capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu$ m; Agilent). The carrier gas was helium at 1 mL/min. The injector was operated in split mode (10:1) at 200 °C; the injected volume was 1  $\mu$ L. The temperature programme comprised: 40 °C (2 min), then 8 °C/min to 200 °C, then 15 °C/min to 320 °C (3 min). Standard

70-eV mass spectra were recorded in the *m/z* 25–600 range; a 4 min solvent delay was used. Temperatures of the transfer line, ion source and quadrupole were 280, 230 and 150 °C, respectively. Chemical profiles of labra and legs extracts were compared to detect specific compounds from the labral gland.

## RESULTS

#### SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

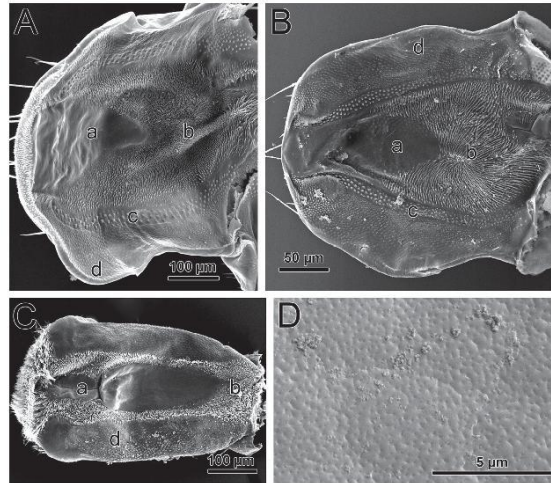
The labrum of a worker or an imago was most often oval shaped (Fig. 1), broadly attached to the clypeus. The labrum usually did not differ greatly in size among species and castes, being *c.* 2.7 times shorter than head length (distance between clypeo-frontal boundary and posterior margin of head), with the exception of *Termes hospes* and *Microcecotermes* sp. workers, *Pseudacanthotermes militaris* small workers and *Coptotermes testaceus* imagoes, in which the labrum was about 3.2–5 times shorter than the head (Tables S1 and S2).

The dorsal side of the labrum was covered by smooth rectangular plates *c.* 10  $\mu$ m in size mixed with a few hair-like sensillae. The ventral faces of the labrum and of the hypopharynx consisted of four regions of similar appearance for workers and imagoes of all studied taxa (see Fig. 1): (a) a smooth region in the apical zone along the midline of the labrum, with a wrinkled structure with numerous pores *c.* 30–50 nm in diameter (Fig. 1A, B, D); (b) a basal zone in the midline extending forward around zone 'a', consisting of many irregular hair-like structures (acanthae based on TEM observations), ranging in length between 5 and 25  $\mu$ m; (c) two lines of sensillae (numerous chemoreceptors usually with four dendrites and relatively few campaniform sensillae located predominantly in the basal parts of the sector) encircling zone 'b' (Fig. 1A, B) on the ventral labrum but missing from the hypopharynx; and (d) lateral regions, consisting of irregular scales ranging in size between 2 and 4  $\mu$ m (Fig. 1).

#### OPTICAL MICROSCOPY

The labral gland was found in workers and imagoes of all studied species. It was located on the ventral side of the labrum, extending to the dorsal side at the labrum apex, and in the dorso-apical region of the hypopharynx (Fig. 2A, B). It appeared as a thickened epithelium composed of columnar cells (Fig. 2). The thickness of the secretory epithelium in workers was in general *c.* 15–30  $\mu$ m (on average 17.98  $\mu$ m). The epithelium was thinnest in *Pseudacanthotermes militaris* small workers (7.80  $\mu$ m) and thickest in *Mastotermes darwiniensis* (29.22  $\mu$ m) workers (Table S1). In imagoes, labral gland thickness was





**Figure 1.** Scanning electron micrographs detailing labral gland development. A, ventral side of labrum in *Embiratermes neotenicus* female imago. B, ventral side of labrum in *Pseudacanthotermes militaris* worker. C, dorsal side of the hypopharynx in *Acanthotermes acanthothorax* female imago. D, detailed view of region 'a' with pores through the epicuticle in labrum of *Microcerotermes* sp. female imago. The sectors are abbreviated as follows: a, zone with small porosities located at the apex of the labrum along the midline; b, zone formed with many irregular hair-like structures located partially around zone 'a'; c, two lines of sensillae located around zone 'b'; d, region with scales of irregular shape located at the labrum margins.

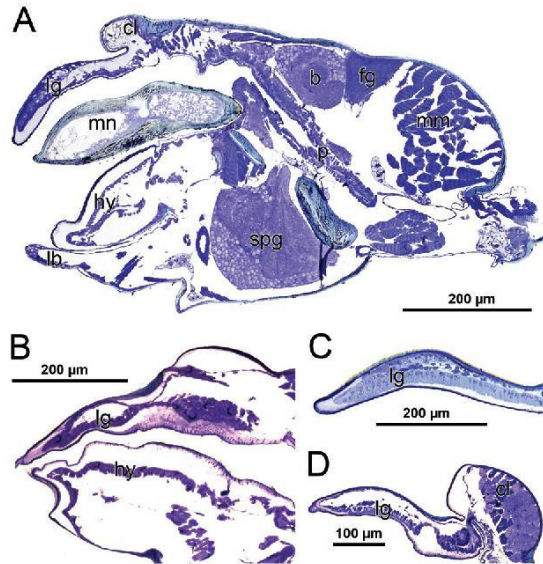
on average 18.21 µm; the thinnest epithelium was found in *Nasutitermes* sp. (8.27 µm) and the thickest in *Neocapritermes araguaia* (32.65 µm) (Table S2). The thickness of the labral gland differed slightly between sexes in imagoes, but without a clear trend. For all termite samples, the hypopharyngeal part of the epithelium was in general significantly thinner, usually between 8 and 15 µm thick, with the exception of the 'lower' termite workers, in which the thickness of the secretory epithelium was similar in the labral and hypopharyngeal portions of the gland.

#### TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

Secretory cells of the labral gland were always made of class 1 (according to the classification of Noirot & Quennedey, 1974), i.e. secretory cells in direct contact with the body cuticle, through which the secretion passes. Their ultrastructure was nearly identical in the labral and hypopharyngeal regions of the labral gland in all castes and therefore our description is based on the observation of both parts of the gland. There was often an abundance of class 3 secretory cells (Noirot & Quennedey, 1974), i.e. cells separated from the body wall by epithelial cells, through which they

release their products via (epi)cuticular canals. They mostly occur at the dorsal face of the labrum, but these cells never mixed with the labral gland epithelium, unlike in some soldiers (Palma-Onetto *et al.*, 2018), and always released their secretion to the dorsal side of the labrum (Fig. 3A). Class 1 and class 3 secretory cells were very different, and also easily distinguished from non-modified epidermal cells (Fig. 3A), which were much thinner (typically c. 0.5 µm) and contained virtually no secretory organelles (Fig. S1B).

Labral gland secretory cells were columnar (Fig. 3A–C), and their cytoplasm contained abundant smooth endoplasmic reticulum (ER), scattered rough ER, small secretory vesicles, abundant mitochondria, numerous microtubules orientated predominantly apico-basally, glycogen granules and sometimes also myelin figures. While the microtubules are scattered throughout the secretory cells in most representatives, they appear grouped into bundles in *Glyptotermes* sp. workers. Apical microvilli were well developed throughout the gland (Fig. 3D), but were longer in the middle part of the epithelium compared to the margins. The microvilli were up to 1.3 µm long and about 80 nm thick, slightly shorter in workers than in imagoes, and always with a central channel about 30 nm in diameter

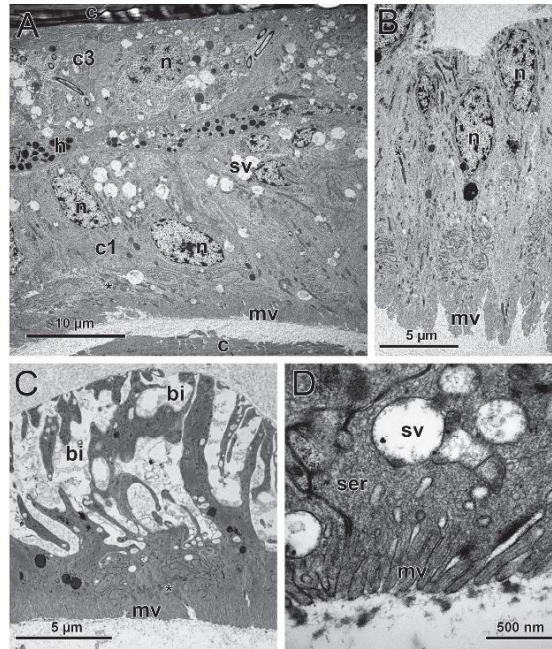


**Figure 2.** Sagittal sections of the labral gland. A, head of *Termitogeton planus* worker. B, labrum and hypopharynx of *Globitermes sulphureus* worker. C, labrum of *Coptotermes testaceus* male imago. D, labrum of *Neocapritermes taracua* worker. Note the secretory epithelium of hypopharynx in A and B. Abbreviations: b, brain; cl, clypeus; fg, frontal gland; hy, hypopharyngeal portion of the labral gland; lb, labium; lg, labral gland; mn, mandible; mm, mandibular muscles; p, pharynx; spg, subesophageal ganglion.

in termite imagoes and about 40 nm in workers (Fig. 3D; Table S3 and Fig. S1D). Numerous small vesicles were observed at the microvilli bases (Fig. 3D). These vesicles were generally electron-lucent when occurring at the base of microvilli, but sometimes appeared more electron-dense deeper in the cells, as in males and females of *G. oculatus* alate imagoes, in female alate imagoes of *Heterotermes tenuis* and in workers of *Thoracotermes* sp. Lipid-like droplets were observed only rarely, but they were more common in *Coptotermes formosanus* imagoes, *Nasutitermes lujae* workers and *Pseudacanthotermes militaris* large workers. The basal parts of the secretory cells differentiated into invaginations typically about 5 µm deep (up to 12 µm in workers of *Neocapritermes taracua* and *Coptotermes formosanus*) with frequent formation of pinocytotic vesicles (Figs 3C, S1C). Free axons were commonly observed inserted within the basal invaginations. The basal parts of secretory cells were covered by a basement membrane (c. 100 nm thick) sometimes strengthened by clusters of collagen fibres (then up to 1.5 µm thick). There was no junction between the

neighbouring secretory cells in the basal parts, while there were always zonulae adherens followed by septate junctions in the apical parts. The nuclei were elliptical, located at the cell bases, and usually c. 5 µm long (up to 7 µm in *N. taracua* workers and *G. oculatus* male alate imagoes). The nuclei contained predominantly dispersed chromatin with a few aggregates.

The cuticle overlying the labral gland was highly modified for secretion evacuation, and always thicker in imagoes than in workers (on average 6.5 and 4 µm, respectively; Fig. 4A). The cuticle was formed by endocuticle of helicoidal structure, exocuticle and a thin epicuticle (c. 30 nm thick; Table S3, Fig. 4B). Modifications to the glandular cuticle were highly pronounced, especially in the smooth middle part of the ventral labrum. These modifications included an increased number of pore canals, which widened towards the cuticle base (Fig. 4A), and plentiful epicuticular pores. The cuticle of the hypopharyngeal portion of the gland was very similar, although the endocuticle was slightly thicker than in the labrum. There was no reservoir and the secretion was stored



**Figure 3.** Ultrastructure of the labral gland in termites. A, middle part of the labrum in *Coptotermes testaceus* female imago, showing the labral gland consisting of class 1 secretory cells at the bottom, and class 3 secretory cells occurring at the dorsal side of the labrum. B, labral gland secretory epithelium in *Coptotermes testaceus* female imago. C, labral gland secretory cells in *Coptotermes formosanus* worker. Note the well-developed invaginations reaching to near cell apices. D, detailed view of the apex of labral gland secretory cells in *Pseudacanthotermes militaris* worker showing well-developed smooth endoplasmic reticulum. Abbreviations: bi, basal invaginations; c, cuticle; c1, class 1 secretory cell; c3, class 3 secretory cell; h, haemocytes; mv, microvilli; n, nucleus; ser, smooth endoplasmic reticulum; sv, secretory vesicle. Asterisk indicates mitochondria in the cell cytoplasm.

only in the space between the secretory epithelium and the cuticle, or inside the porous cuticle.

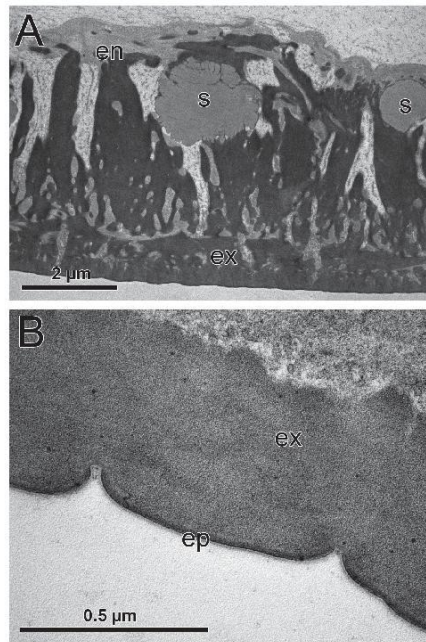
The labral gland was also observed in *Cryptocercus punctulatus* nymphs and female imagoes. The epithelium of the labral gland had the same characteristics as described above, although the microtubules predominantly occur in large bundles (Fig. S1F). An important difference was shallower basal invaginations and shorter microvilli lacking internal central channels.

#### BEHAVIOURAL EXPERIMENTS

We observed potential use of the labral gland in soldiers of *G. oculatus* and *Coptotermes testaceus*

after encounter with an alien termite or ant worker. Immediately after such an encounter, the soldiers changed their behaviour by walking backwards while rubbing the labrum against the substrate (see Video S1).

In a second experimental bioassay, the number of workers and soldiers of *Prorhinotermes canalifrons* present at the two sectors did not differ between labral and leg extracts, using neither methanol ( $P = 0.869$ ) nor hexane ( $P = 0.355$ ) nor pure solvent ( $P = 0.325$  for methanol,  $P = 0.614$  for hexane). Interestingly, the number of workers and soldiers of *R. flavipes* avoiding the sector treated with labral gland extracts was higher than controls irrespective of the solvent, either leg extracts ( $P < 0.0001$ ) or solvent ( $P < 0.0001$ ).



**Figure 4.** Cuticle of the labral gland. A, highly modified cuticle underlying the labral gland in *Coptotermes testaceus* male imago. Note the enlarged pore canals. B, detail of the apical cuticle underlying the labral gland of *Coptotermes testaceus* female imago. Note the distinct layers of the epicuticle. Abbreviations: en, endocuticle; ep, epicuticle; ex, exocuticle; s, secretion.

#### CHEMICAL ANALYSES

No specific compounds were detected in the labral extracts, and the profiles of these extracts and of legs extracts did not differ to any great extent (data not shown).

#### DISCUSSION

The labral gland is an integral part of the labrum in termites, occurring in soldiers (Palma-Onetto *et al.*, 2018), workers and imagoes. While its structure is well known in soldiers (Palma-Onetto *et al.*, 2018), only anecdotal information about its presence in some imagoes has previously been published (Křížková *et al.*, 2014). In the present study, we describe the labral

gland in workers and imagoes of a set of representative termite species and in nymphs and adults of the wood roach *Cryptocercus punctulatus*.

The labrum and the labral gland share the same characteristics in all species and castes studied so far. Common features are a higher degree of sclerotization of the dorsal side of the labrum, which is in general more pronounced in soldiers, the occurrence of class 3 secretory cells at the dorsal side of labrum but rarely within the labral gland, and the presence of the labral gland comprising class 1 secretory cells on the ventral side of labrum and on the dorsal side of hypopharynx. The secretory cells are also quite similar in their ultrastructure, showing well-developed apical microvilli with a central channel (lacking in *Cryptocercus punctulatus*), numerous vesicles of different electron densities, abundant smooth and rough ER, cuticle modified for secretion release, and innervation of the secretory cells through axons running freely within the basal invaginations (Palma-Onetto *et al.*, 2018). At the same time, there are also considerable differences between termite soldiers on the one hand and workers and imagoes on the other: (1) the hyaline tip, present in soldiers of many advanced species, is missing in other castes; (2) the shape of the labrum is highly variable in soldiers whereas it is almost identical in all workers and imagoes; and (3) overall development of microvilli and basal invaginations is lower in workers and imagoes (Palma-Onetto *et al.*, 2018). These observations suggest that the labral gland has the same function in all castes, but plays a more important function in soldiers. We also cannot exclude that the labral secretion is used in a different context by workers and imagoes, as rubbing of labral gland secretory openings against the substrate was observed exclusively in soldiers. Although *Cryptocercus punctulatus* showed differences in the labral gland structure in comparison to termites, such as shorter microvilli devoid of a central channel, the presence of microtubule bundles was shared particularly between *Cryptocercus punctulatus*, and *M. darwiniensis* and *Hodotermopsis sjoestedti* soldiers (Palma-Onetto *et al.*, 2018), and *Glyptotermes* sp. workers, suggesting it is a common feature in basal taxa inherited from cockroach ancestors.

The hyaline tip, a transparent and extensible apical part of the labrum, is probably an evolutionary novelty occurring in some soldiers of Rhinotermitidae and Termitidae. Our mapping of ancestral characters (Palma-Onetto *et al.*, 2018) suggests that the hyaline tip evolved in a common ancestor of Rhinotermitidae and Termitidae, and was subsequently lost at least in four independent cases: (1) all soldiers of Nasutitermitinae in which the whole labrum is highly reduced in size as well as all other mouth parts; (2 and 3) in snapping soldiers, represented by two independent lineages,

*Pericapritermes* and *Neocapritermes*, in which the labrum is highly modified; and (4) in *Microcerotermes* for no clear reason apart from the general small size of the labrum in the soldier caste (Palma-Onetto *et al.*, 2018). At the same time, workers and imagoes of other lineages show similarly developed labra without a hyaline tip, even in taxa with highly modified labra in soldiers. However, the ultrastructure of secretory cells is always similar, although the overall size of the labral gland is much larger in soldiers having a secretory epithelium approximately twice as thick, apart from the larger size of the labrum in general (see Palma-Onetto *et al.*, 2018).

An interesting question is how labral gland secretion release is controlled. It seems clear that the release from secretory cells is under neuronal control, similarly to sternal gland secretion in Mastotermitidae, Archotermopsidae and Kalotermitidae (Quennedey, 1969, 1975; Quennedey *et al.*, 2008), the nasus gland of *Angularitermes* soldiers (Šobotník *et al.*, 2015), the salivary glands of different insects (Whitehead, 1971; Ali *et al.*, 1993; Ali & Orchard, 1996; Ali, 1997), including the termite species *Kalotermes flavicollis* (Alibert, 1983) and *Prorhinotermes simplex* (Šobotník & Weyda, 2003). After release from secretory cells, the secretion is presumably evacuated from the body by pressing the labrum (and hypopharynx) against the substrate, and the pressure is probably controlled by groups of campaniform sensillae similarly to trail pheromone release from the sternal gland (Stuart & Satir, 1968; Quennedey *et al.*, 2008). The chemoreceptors are clearly more populous within area 'c', but it remains unknown if these receptors are also involved in the control of secretion release or if they play a gustatory function.

The labral gland does not form any specific reservoir, and the secretion is stored only in the space between the secretory epithelium and the overlying cuticle, as well as within the cuticle itself. The absence of a reservoir, a feature characteristic of defensive glands (Chapman, 2013), excludes a potential defensive function of the labral gland, in contrast to previous speculations (see e.g. Deligne *et al.*, 1981 or Quennedey, 1984). The gland also has a very similar structure in all castes and species, which indicates that it is not linked to defense. In addition, the high abundance of smooth ER, an organelle known to produce lipidic and volatile secretions, typical of pheromone-producing glands (Percy-Cunningham & MacDonald, 1987; Nakajima, 1997; Tillman *et al.*, 1999; Alberts *et al.*, 2002), provides additional evidence for communicative function rather than strictly defensive function.

We repeatedly observed soldiers wiping the labrum against the substrate after encountering a threat (heterospecific termite or an ant worker), and the observed behaviour (moving backwards combined

with wiping the labrum against the surface) suggests that the soldiers are warning their nestmates by using labral gland secretion. Unfortunately, this function was not proven by our experiments irrespective of the setting, and only the avoidance of heterospecifics (which can be considered as potential competitors or enemies) to labral gland extracts was statistically significant. However, this avoidance effect can also result from other compounds dissolved from the labra, such as cuticular hydrocarbons as species-recognition cues (Howard & Blomquist, 1982, 2005) or frontal gland secretion, which inevitably contaminates all body parts of termite soldiers (Piskorski *et al.*, 2007, our unpublished observations). Therefore, the function of the secretion need to be rigorously tested, especially since we did not detect any labral gland-specific compounds, probably due to the small quantity of the secretion linked to the small gland size and the absence of a reservoir.

## CONCLUSION

The labral gland has been thought to have a defensive function (Deligne *et al.*, 1981; Quennedey, 1984). However, Palma-Onetto *et al.* (2018) suggested based on gland morphology, structure and ultrastructure that it may have a communicative function rather than defensive function. The presence of the labral gland in other castes and in the closest relative of termites, the wood roach *Cryptocercus punctulatus*, as well as the occurrence of the same basic features of the gland structure and ultrastructure, reinforce its alternative function and suggest its essential role in colony survival and success. Moreover, our behavioural observations suggest that the labral gland produces volatiles secreted in response to a threat. A better understanding of labral gland function in termites and cockroaches is needed to enhance knowledge of termite chemical communication behaviour.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mirek Hylíš from the Laboratory of Electron Microscopy (Faculty of Sciences, Charles University in Prague) for his help and support with SEM and TEM. We acknowledge the Imaging Methods Core Facility at BIOCEV, supported by the Czech-BioImaging large RI projects (LM2015062 and CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001/775, funded by MEYS CR), for their support with obtaining high-resolution SEM imaging data presented in this paper. We are grateful to Thomas Bourguignon (OIST, Japan) for his help during species identification, to Aleš Buček (OIST, Japan) for assistance during recording the behavioural

experiments, Jean-Luc Durand (LEEC, France) for his help with statistics, and Anna Jirošová and Jaromír Hradecký (both CULS, Czech Republic) for their help and support during the realization of bioassays and chemical identification. We thank Régis Vigoroux and other Hydreco members as well as people from Ebogo II (Cameroon) for their hospitality during fieldwork. Financial support was provided by the projects IGA FLD No. A30/17 (Czech University of Life Sciences, Prague), CIGA No. 20184307 (Czech University of Life Sciences, Prague) and 'EVA4.0', No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000803 financed by OP RDE.

## REFERENCES

- Ali DW. 1997. The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary glands. *Journal of Experimental Biology* **200**: 1941–1949.
- Ali DW, Orchard I. 1994. Characterization of dopamine and serotonin receptors on the salivary gland of the locust, *Locusta migratoria*. *Biogenic Amines* **10**: 195–212.
- Ali DW, Orchard I. 1996. Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in the ventral nerve cord of the stick insect, *Carausius morosus*, including neurons innervating the salivary glands. *Cell Tissue Research* **285**: 453–462.
- Ali DW, Orchard I, Lange AB. 1993. The aminergic control of locust (*Locusta migratoria*) salivary glands: evidence for serotonergic and dopaminergic innervation. *Journal of Insect Physiology* **39**: 623–632.
- Alibert PJ. 1983. Innervation de l'appareil salivaire du termite *Kaloterme flavicollis* Fabr. Histologie et ultrastructure: relation des axones avec les cellules de la glande et du réservoir. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale* **72**: 133–162.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell: the endoplasmic reticulum*, 4th edn. New York: Garland Science.
- Bignell DE, Eggleton P. 2000. Termites in ecosystems. In: Abe T, Bignell DE, Higashi M, eds. *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht: Kluwer, 363–387.
- Billen J, Joye L, Leuthold RH. 1989. Fine structure of the labial gland in *Macrotermes bellicosus* (Isoptera, Termitidae). *Acta Zoologica* **70**: 37–45.
- Billen J, Šobotník J. 2015. Insect exocrine glands. *Arthropod Structure & Development* **44**: 399–400.
- Binder BF. 1988. Intercolonial aggression in the subterranean termite *Heterotermes aureus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Psyche: A Journal of Entomology* **95**: 123–137.
- Bourguignon T, Šobotník J, Brabcová J, Sillam-Dussès D, Buček A, Krasulová J, Vytisková B, Demianová Z, Mareš M, Roisin Y. 2015. Molecular mechanism of the two-component suicidal weapon of *Neocapritermes taracua* old workers. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 809–819.
- Costa-Leonardo AM. 2004. A new interpretation of the defense glands of neotropical *Ruptitermes* (Isoptera, Termitidae, Apicotermitinae). *Sociobiology* **44**: 391–402.
- Costa-Leonardo AM, Hafig I. 2014. Labral gland in soldiers of the neotropical termite *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae: Syntermitinae). *Micron* **64**: 39–44.
- Chapman RF. 2013. *The insects: structure and function*, 5th edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Dahlsjö CAL, Parr CL, Malhi Y, Rahman H, Meir P, Jones DT, Eggleton P. 2014. First comparison of quantitative estimates of termite biomass and abundance reveals strong intercontinental differences. *Journal of Tropical Ecology* **30**: 143–152.
- Deligne J, Quennedey A, Blum MS. 1981. The enemies and defense mechanisms of termites. In: Herman HR, ed. *Social insects*, Vol. II. New York: Academic Press, 1–76.
- Eggleton P. 2011. An introduction to termites: biology, taxonomy and functional morphology. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N, eds. *Biology of termites: a modern synthesis*. Dordrecht: Springer, 1–26.
- Eggleton P, Bignell DE, Sands WA, Mawdsley NA, Lawton JH, Wood TG, Bignell NC. 1996. The diversity, abundance and biomass of termites under differing levels of disturbance in the Mbalmayo Forest Reserve, southern Cameroon. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **351**: 51–68.
- Engel MS, Grimaldi DA, Krishna K. 2009. Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *American Museum Novitates* **3650**: 1–27.
- Evans TA, Dawes TZ, Ward PR, Lo N. 2011. Ants and termites increase crop yield in a dry climate. *Nature Communications* **2**: 262.
- Fujita AI, Miura T, Matsumoto T. 2008. Differences in cellulose digestive systems among castes in two termite lineages. *Physiological Entomology* **33**: 73–82.
- Haverty MI. 1977. The proportion of soldiers in termite colonies. A list and bibliography. *Sociobiology* **2**: 199–216.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. *The ants*. Berlin: Springer-Verlag, 732.
- Howard RW, Blomquist GJ. 1982. Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* **27**: 149–172.
- Howard RW, Blomquist GJ. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* **50**: 371–393.
- Inward D, Beccaloni G, Eggleton P. 2007. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology Letters* **3**: 331–335.
- Jouquet P, Dauber J, Lagerlöf J, Lavelle P, Lepage M. 2006. Soil invertebrates as ecosystem engineers: intended and accidental effects on soil and feedback loops. *Applied Soil Ecology* **32**: 153–164.
- Klemm N. 1972. Mono-amine containing nervous fibres in foregut and salivary gland of the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forskål (Orthoptera: Acridae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Comparative Physiology* **43**: 207–211.
- Krishna K, Grimaldi DA, Krishna V, Engel MS. 2013. Treatise on the Isoptera of the world. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **377**: 1–2704.

- Křížková B, Bourguignon T, Vytisková B, Šobotník J. 2014. The clypeal gland: a new exocrine gland in termite imagoes (Isoptera: Serritermitidae, Rhinotermitidae, Termitidae). *Arthropod Structure & Development* **43**: 537–542.
- Lo N, Tokuda G, Watanabe H, Rose H, Slaytor M, Maekawa K, Bandi C, Noda H. 2000. Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. *Current Biology* **10**: 801–804.
- Nakajima T. 1997. Cytochrome P450 isoforms and the metabolism of volatile hydrocarbons of low relative molecular mass. *Journal of Occupational Health* **39**: 83–91.
- Noirot C. 1969. Glands and secretion. In: Krishna K, Weesner FM, eds. *Biology of termites*. New York: Academic Press, 89–124.
- Noirot C, Quennedey A. 1974. Fine structure of insect epidermal glands. *Annual Review of Entomology* **19**: 61–80.
- Nutting WL. 1979. Termite flight periods: strategies for predator avoidance? *Sociobiology* **4**: 141–151.
- Palma-Onetto V, Hošková K, Křížková B, Krejčířová R, Pfliegerová J, Bubeníčková F, Plarre R, Dahlsjö CAL, Synek J, Bourguignon T, Sillam-Dussès D, Šobotník J. 2018. The labral gland in termite soldiers. *Biological Journal of the Linnean Society* **123**: 535–544.
- Percy-Cunningham JE, MacDonald JA. 1987. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands. In: Blomquist GJ, Prestwich GD, eds. *Pheromone biochemistry*. Orlando: Academic Press, 27–75.
- Piskorski R, Hanus R, Kalinová B, Valterová I, Křeček J, Bourguignon T, Roisin Y, Šobotník J. 2009. Temporal and geographic variations in the morphology and chemical composition of the frontal gland in imagoes of *Prorhinotermes* species (Isoptera: Rhinotermitidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **98**: 384–392.
- Piskorski R, Hanus R, Vašíčková S, Cvačka J, Šobotník J, Svatoš A, Valterová I. 2007. Nitroalkenes and sesquiterpene hydrocarbons from the frontal gland of three *Prorhinotermes* termite species. *Journal of Chemical Ecology* **33**: 1787–1794.
- Poiani SB, Costa-Leonardo AM. 2016. Dehiscent organs used for defensive behavior of kamikaze termites of the genus *Ruptitermes* (Termitidae, Apicotermitinae) are not glands. *Micron* **82**: 63–73.
- Prestwich GD. 1984. Defense mechanisms of termites. *Annual Review of Entomology* **29**: 201–232.
- Prestwich GD, Collins MS. 1982. Chemical defense secretions of the termite soldiers of *Acorhinotermes* and *Rhinotermes* (Isoptera, Rhinotermitinae). *Journal of Chemical Ecology* **8**: 147–161.
- Quennedey A. 1969. Innervation de type neurosécréteur dans la glande sternale de *Kalotermes flavicollis* (Isoptera). Étude ultrastructurale. *Journal of Insect Physiology* **15**: 1807–1814.
- Quennedey A. 1975. Morphology of exocrine glands producing pheromones and defensive substances in subsocial and social insects. In: Noirot C, Howse PE, Masne GL, eds. *Pheromones and defensive secretions in social insects*. Dijon: IUSSI Symposium, 1–21.
- Quennedey A. 1984. Morphology and ultrastructure of termite defense glands. In: Herman HR, ed. *Defensive mechanisms in social insects*. New York: Praeger, 151–200.
- Quennedey A, Sillam-Dussès D, Robert A, Bordereau C. 2008. The fine structural organization of sternal glands of pseudergates and workers in termites (Isoptera): a comparative survey. *Arthropod Structure & Development* **37**: 168–185.
- Redford KH, Dorea JG. 1984. The nutritional value of invertebrates with emphasis on ants and termites as food for mammals. *Journal of Zoology* **203**: 385–395.
- Reinhard J, Lacey MJ, Ibarra F, Schroeder FC, Kaib M, Lenz M. 2002. Hydroquinone: a general phagostimulating pheromone in termites. *Journal of Chemical Ecology* **28**: 1–14.
- Robertson HA. 1975. The innervation of the salivary gland of the moth, *Manduca sexta*: evidence that dopamine is the transmitter. *Journal of Experimental Biology* **63**: 413–419.
- Sands WA. 1982. Agonistic behavior of African soldierless Apicotermitinae (Isoptera: Termitidae) [*Alyscotermes kilimandjarius*; Kenya]. *Sociobiology* **7**: 61–72.
- Sillam-Dussès D, Krasulová J, Vrkošlav V, Pytelková J, Cvačka J, Kutalová K, Bourguignon T, Miura T, Šobotník J. 2012. Comparative study of the labial gland secretion in termites (Isoptera). *PLoS One* **7**: e46431.
- Šobotník J, Bourguignon T, Carrijo TF, Bordereau C, Robert A, Křížková B, Constantini JP, Canello EM. 2015. The nasus gland: a new gland in soldiers of *Angularitermes* (Termitidae, Nasutitermitinae). *Arthropod Structure & Development* **44.5**: 401–406.
- Šobotník J, Bourguignon T, Hanus R, Demianová Z, Pytelková J, Mareš M, Foltynová P, Preisler J, Cvačka J, Krasulová J, Roisin Y. 2012. Explosive backpacks in old termite workers. *Science* **337**: 436.
- Šobotník J, Bourguignon T, Hanus R, Sillam-Dussès D, Pfliegerová J, Weyda F, Kutalová K, Vytisková B, Roisin Y. 2010b. Not only soldiers have weapons: evolution of the frontal gland in imagoes of the termite families Rhinotermitidae and Serritermitidae. *PLoS One* **5**: e15761.
- Šobotník J, Bourguignon T, Hanus R, Weyda F, Roisin Y. 2010d. Structure and function of defensive glands in soldiers of *Glossotermes oculatus* (Isoptera: Serritermitidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **99**: 839–848.
- Šobotník J, Hubert J. 2003. The morphology and ontogeny of the exocrine glands of *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* **67**: 83–98.
- Šobotník J, Jirošová A, Hanus R. 2010a. Chemical warfare in termites. *Journal of Insect Physiology* **56**: 1012–1021.
- Šobotník J, Sillam-Dussès D, Weyda F, Dejean A, Roisin Y, Hanus R, Bourguignon T. 2010c. The frontal gland in workers of Neotropical soldierless termites. *Naturwissenschaften* **97**: 495–503.
- Šobotník J, Weyda F. 2003. Ultrastructural ontogeny of the labial gland apparatus in termite *Prorhinotermes simplex* (Isoptera, Rhinotermitidae). *Arthropod Structure & Development* **31**: 255–270.
- Šobotník J, Weyda F, Hanus R, Kyjaková P, Doubský J. 2004. Ultrastructure of the frontal gland in *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae) and quantity of the

- defensive substance. *European Journal of Entomology* **101**: 153–163.
- Spanton SG, Prestwich GD. 1982.** Chemical defense and self-defense: biochemical transformations of contact insecticides produced by soldier termites. *Tetrahedron* **38**: 1921–1930.
- Norusis MJ. 1990.** *SPSS: advanced statistics user's guide*. Chicago: SPSS.
- Stuart AM, Satir P. 1968.** Morphological and functional aspects of an insect epidermal gland. *The Journal of Cell Biology* **36**: 527–549.
- Sugimoto A, Bignell DE, MacDonald JA. 2000.** Global impact of termites on the carbon cycle and atmospheric trace gases. In: Abe T, Bignell DE, Higashi M, eds. *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht: Springer, 409–435.
- Thorne BL. 1982.** Termite–termite interactions: workers as an agonistic caste. *Psyche: A Journal of Entomology* **89**: 133–150.
- Tillman JA, Seybold SJ, Jurenka RA, Blomquist GJ. 1999.** Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**: 481–514.
- Whitehead AT. 1971.** The innervation of the salivary gland in the American cockroach: light and electron microscopic observations. *Journal of Morphology* **135**: 483–506.
- Wu LW, Bourguignon T, Šobotník J, Wen P, Liang WR, Li HF. 2018.** Phylogenetic position of the enigmatic termite family Stylotermitidae. *Invertebrate Systematics* **32**: 1111–1117.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

**Figure S1.** Ultrastructure of the labral gland. A, non-modified cuticle at the dorsal side of the labrum in *Embiratermes neotenicus* male imago. B, non-modified epithelium surrounding the labral gland in *Coptotermes formosanus* worker. C, pinocytotic activity at the cell base in the labral gland epithelium in the male imago of *Glossotermes oculatus*. Arrows indicate pinocytotic activity at the base of the cell. D, view of the central channels in the microvilli of *Coptotermes testaceus* female imago, which allow secretion release from secretory cells. E, detail of basal part of the labral gland in a worker of *Neocapritermes taracua* showing free axons located within the basal invagination. F, large microtubule bundle running through secretory cells in the wood roach *Cryptocercus punctulatus*. Abbreviations: a, axon; en, endocuticle; ex, exocuticle; m, mitochondria; mb, microtubule bundle; n, nucleus; ser, smooth endoplasmic reticulum; sj, septate junction; v, vesicle.

**Table S1.** List of termite workers used in analyses, with additional information and secretory epithelium measures. Blank spaces indicate lack of information. All measurements are in micrometres.

**Table S2.** List of termite imagoes used in our analyses, with additional information and secretory epithelium measures. Blank spaces indicate lack of information. All measurements are in micrometres.

**Table S3.** List of termite workers and imagoes used for transmission electron microscopy. Abbreviations: NM, not modified cuticle; NV, not visible (due to low sample quality). Blank spaces indicate lack of information. All measurements are in micrometres.

**Video S1.** Encounter of *Glossotermes oculatus* with the ant *Solenopsis invicta*. Note the soldier of *G. oculatus* walking backwards while rubbing the labrum against the substrate immediately after the encounter.



Figure S1

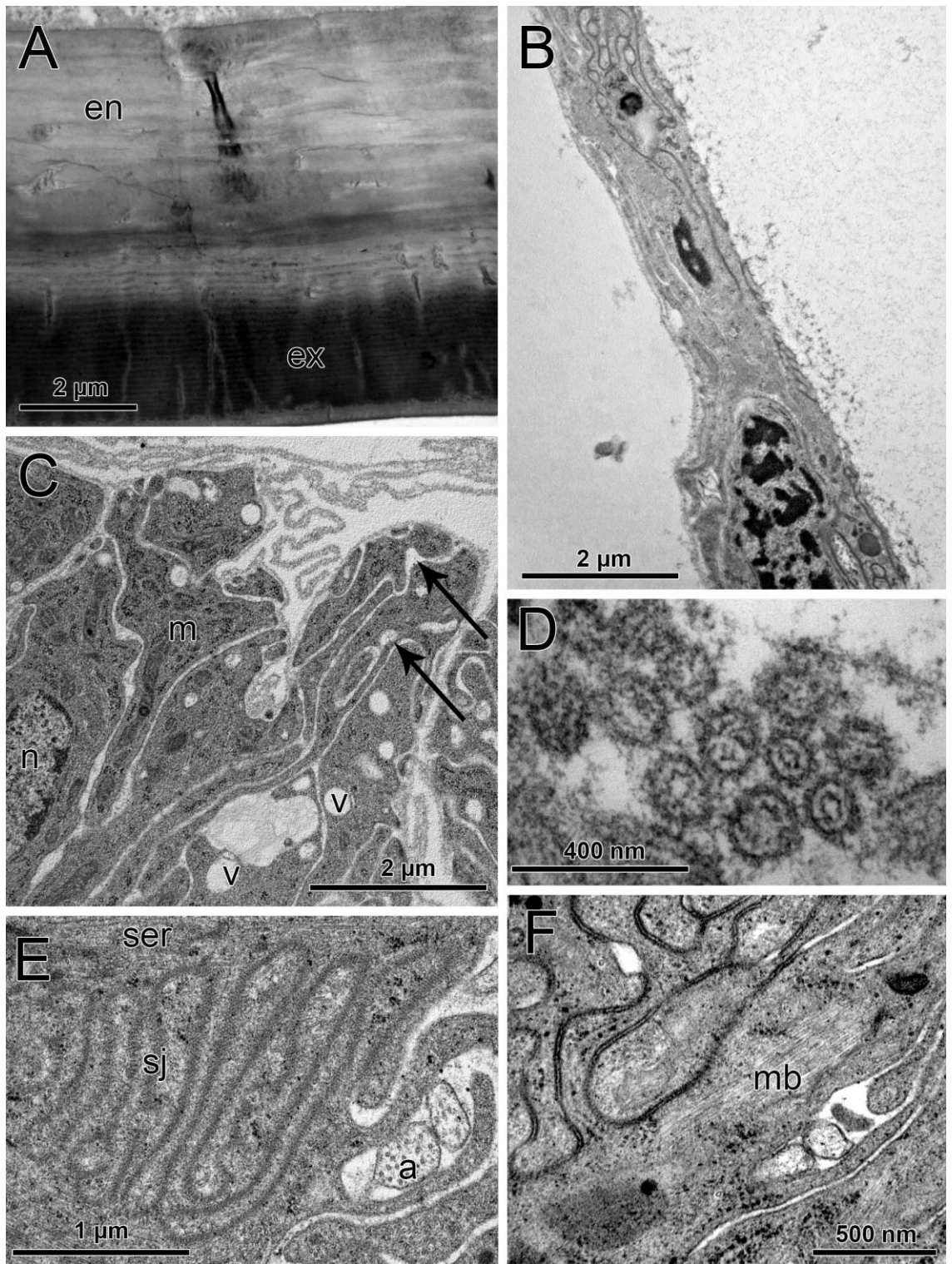


Table S1

Family	Sub-family	Genus	Species	Sub-caste	Gland elsewhere	No. of observations	irritative buffer	Labial gland thickness			Hypopharyngeal gland thickness			Head length/ Labrum length				
								Average	SD	Minimum	Maximum	Average	SD		Minimum	Maximum		
Cryptoceridae		<i>Cryptocercus</i>	<i>parvicutatus</i>			2	Phosphate	16.41	2.09	13.54	18.46	29.17	13.78	12.5	42.59	752.72	338.38	2.22
Mastotermitidae		<i>Mastotermes</i>	<i>darwiniensis</i>	nymph	hypopharynx	3	Phosphate	29.22	11.35	18.95	50.23	45.19	7.31	35.19	55.82	2008	967.5	2.08
Archaeomorphidae		<i>Holotermitis</i>	<i>spaecefti</i>		hypopharynx	3	Cacodylate	29.03	6.8	18.72	39.49	8.04	2.34	5.1	11.31	904.59	330.71	2.74
Kalotermitidae		<i>Cryptotermes</i>	sp.		hypopharynx	2	Phosphate	15.48	5.27	11.46	15.87	19.02	3.85	13.44	24.59	936.28	359.59	2.6
Rhinotermitidae		<i>Dalichorhinotermes</i>	<i>longilabrus</i>		hypopharynx	2	Cacodylate	22.94	8.06	12.45	34.34	6.08	1.58	4.35	9.51	606.88	230.9	2.63
Rhinotermitidae		<i>Parfinotermitis</i>	<i>simplex</i>		hypopharynx	3	Phosphate	16.14	5.42	9.1	24.18	13.99	3.63	8.95	17.84	880.6	312.52	2.82
Rhinotermitidae		<i>Termitogiton</i>	<i>planus</i>		hypopharynx	2	Phosphate	9.86	1.71	7.03	13.64	12.39	5.41	3.83	17.84	880.6	312.52	2.82
Rhinotermitidae		<i>Reticulitermes</i>	<i>lucifugus</i>		hypopharynx	1	Phosphate	21.62	7.78	15.78	34.96	8.95	7.8	1.15	6.66	8.26	315.95	2.62
Rhinotermitidae		<i>Cryptotermitis</i>	<i>formosus</i>		hypopharynx	3	Phosphate	13.74	3.6	8.81	19.17	23.855	5.8	14.82	30.98	878.18	295.41	3
Termitidae	Macrotermittinae	<i>Glossotermes</i>	<i>oculatus</i>	small worker	hypopharynx	1	Cacodylate	8.45	2.74	3.63	13.99	11.17	4.7	6.6	19.25	1051.08	276.42	3.8
Termitidae	Macrotermittinae	<i>Pseudocanthotermes</i>	<i>militaris</i>	large worker	hypopharynx	2	Cacodylate	7.8	1.15	6.66	8.95	11.17	4.7	6.6	19.25	1051.08	276.42	3.8
Termitidae	Sphaerotermittinae	<i>Pseudocanthotermes</i>	<i>militaris</i>		hypopharynx	2	Cacodylate	38.82	13.53	20.83	55.27	23.855	5.8	14.82	30.98	878.18	295.41	3
Termitidae	Sphaerotermittinae	<i>Sphaerotermes</i>	<i>sphaeroborax</i>		hypopharynx	3	Phosphate	21.38	4.51	12.81	30.13	11.17	4.7	6.6	19.25	1051.08	276.42	3.8
Termitidae	Termitinae	<i>Microcotermes</i>	sp.		hypopharynx	1	Cacodylate	20.78	3.9	14.75	25.36	15.99	3.21	11.09	18.76	694.9	212.5	3.27
Termitidae	Termitinae	<i>Spinitermes</i>	<i>trispinosus</i>		hypopharynx	1	Cacodylate	11.58	3.6	5.31	17.55	2.896	0.76	1.44	3.63	802.09	278.5	2.88
Termitidae	Termitinae	<i>Gobitermes</i>	<i>subpallens</i>		labrum	1	Cacodylate	16.48	2.37	11.1	19.07	15.99	3.21	11.09	18.76	694.9	212.5	3.27
Termitidae	Termitinae	<i>Termitis</i>	<i>hoges</i>		labrum	1	Cacodylate	18.29	3.44	14.99	25.63	23.855	5.8	14.82	30.98	878.18	295.41	3
Termitidae	Termitinae	<i>Neocryptotermes</i>	<i>baracca</i>			2	Phosphate	16.89	5.28	6.54	23.88	15.99	3.21	11.09	18.76	694.9	212.5	3.27
Termitidae	Apicotermitinae	<i>Apicotermitis</i>	<i>cingulatus</i>			5	Cacodylate	26.46	7.5	16.58	36.19	15.96	7.21	4.51	34.03	724.96	284.3	2.55
Termitidae	Apicotermitinae	<i>Apicotermitis</i>	sp. Q		hypopharynx	2	Cacodylate	10.49	3.12	6.28	15.65	24.28	3.69	19.52	30.33	1193.82	442.22	2.61
Termitidae	Apicotermitinae	<i>Apicotermitis</i>	<i>tuberculatus</i>			3	Phosphate	26.88	13.62	7.33	35.27	15.99	3.21	11.09	18.76	694.9	212.5	3.27
Termitidae	Apicotermitinae	<i>Apicotermitis</i>	<i>baeri</i>			1	Phosphate	34.3	5.12	31.68	37.69	15.99	3.21	11.09	18.76	694.9	212.5	3.27
Termitidae	Synthermitinae	<i>Synthermitis</i>	sp.		hypopharynx	2	Cacodylate	17.58	4.72	12.18	25.52	15.99	3.21	11.09	18.76	694.9	212.5	3.27
Termitidae	Termitinae	<i>Termitodes</i>	<i>pedanticus</i>			1	Phosphate	14.91	4.88	6.64	23.41	15.99	3.21	11.09	18.76	694.9	212.5	3.27
Termitidae	Termitinae	<i>Termitodes</i>	sp.			1	Phosphate	14.91	4.88	6.64	23.41	15.99	3.21	11.09	18.76	694.9	212.5	3.27
Termitidae	Termitinae	<i>Termitodes</i>	sp.			1	Phosphate	14.91	4.88	6.64	23.41	15.99	3.21	11.09	18.76	694.9	212.5	3.27
Termitidae	Termitinae	<i>Termitodes</i>	sp.			1	Phosphate	14.91	4.88	6.64	23.41	15.99	3.21	11.09	18.76	694.9	212.5	3.27
Termitidae	Termitinae	<i>Termitodes</i>	sp.			2	Cacodylate	20.77	6.87	10.99	27.99	31.75	1.98	29.94	35.05	1146.62	286.66	4
Termitidae	Termitinae	<i>Nasutitermitis</i>	<i>lujye</i>			3	Cacodylate	25.07	8.34	11.31	42.97	31.75	1.98	29.94	35.05	1146.62	286.66	4

Family	Sub-family	Genus	Species	Sex	Gland elsewhere	No. of observ.	Residue buffer	Thickness of the labial gland				Thickness of the hypopharyngeal gland				Head length/ Labrum length		
								Average	SD	Minimum	Maximum	Average	SD	Minimum	Maximum	Head length	Labrum length	
Cryptoceridae		<i>Cryptocercus</i>	<i>pauciclavus</i>	Female			2 Phosphate	44.38	2.69	32.07	46.76							
Rhinotermitidae		<i>Parthitermes</i>	<i>brunni</i>	Male			1 Ethanol	21.18	8.88	10.4	32.93							
Rhinotermitidae		<i>Schedorhinotermes</i>	<i>translaevis</i>	Male			1 Ethanol	18.92	5.47	8.9	25.5							
Rhinotermitidae		<i>Dolichorhinotermes</i>	<i>longilabius</i>	Male			1 Ethanol	9.25	0.98	8.13	10.52							
Rhinotermitidae		<i>Rhinotermes</i>	<i>simplex</i>	Female			2 Ethanol	29.32	5.21	22.6	38.15	16.14	2.15	12.52	18.42			
Rhinotermitidae		<i>Psammotermes</i>	<i>siniplex</i>	Male			1 Phosphate	7.49	3.18	4.89	12.72				1076.25	973.76	2.95	
Rhinotermitidae		<i>Psammotermes</i>	<i>alacrus</i>	Male			1 Ethanol	23.37	5.41	12.47	30.34	12.46	2.68	8.62	16.85	1235.97	476.57	2.59
Rhinotermitidae		<i>Psammotermes</i>	<i>alacrus</i>	Female			2 Ethanol	14.79	3.33	9.5	20.55	17.29	3.86	11.75	20.79			
Rhinotermitidae		<i>Psammotermes</i>	<i>alacrus</i>	Male			1 Ethanol	13.88	3.38	10.28	17.02				654.24	361.34	1.83	
Rhinotermitidae		<i>Termitopsis</i>	<i>alacrus</i>	Male			1 Ethanol	10.38	3.26	7.19	17.11				623.61	231.13	2.62	
Stratitermitidae		<i>Glossitermes</i>	<i>scutellaris</i>	Male			2 Caodylate	16.99	5.98	9.11	25.91	8.58	0.95	7.68	1147.86	432.91	2.65	
Rhinotermitidae		<i>Glossitermes</i>	<i>scutellaris</i>	Female			3 Caodylate	18.22	5.17	10.77	25.37				1008.88	430.53	2.34	
Rhinotermitidae		<i>Heistermies</i>	<i>brunni</i>	Male			1 Caodylate	15.13	2.75	11.22	18.51	15.02	5.31	7.38	2133			
Rhinotermitidae		<i>Heistermies</i>	<i>brunni</i>	Female			1 Caodylate	10.42	2.99	6.06	15.58	19.37	3.4	16.59	2415			
Rhinotermitidae		<i>Heistermies</i>	<i>paradoxus</i>	Male			1 Ethanol	15.02	2.55	16.48	23.33	9.49	2.32	6.57	122.6			
Rhinotermitidae		<i>Coptitermes</i>	<i>testaceus</i>	Female			3 Caodylate	24.06	6.61	14.35	35.16	16.15	2.09	14.07	19.38	1321.18	920.38	4.13
Rhinotermitidae		<i>Coptitermes</i>	<i>testaceus</i>	Female			2 Dubios. Bral	22.29	7.32	9.7	31.65				1021.09	274.33	3.72	
Termitidae	Macrotermiinae	<i>Protermes</i>	<i>sp.</i>	Male			1 Ethanol	27.69	1.87	25	29.95	33.81	5.07	24.75	41.01			
Termitidae	Macrotermiinae	<i>Ancistrotermes</i>	<i>anzhorax</i>	Male			1 Ethanol	19.97	4.94	14.08	28.86							
Termitidae	Macrotermiinae	<i>Ancistrotermes</i>	<i>anzhorax</i>	Female			1 Ethanol	19.13	7.17	11.25	28.01	17.96	4.2	12.25	2378	1282.03	451.45	2.84
Termitidae	Macrotermiinae	<i>Spilogitermes</i>	<i>spilogibbosus</i>	Male			1 Ethanol	17.52	3.58	12.5	23.72				823.18	203.31	2.59	
Termitidae	Macrotermiinae	<i>Spilogitermes</i>	<i>spilogibbosus</i>	Female			1 Ethanol	17.52	3.58	12.5	23.72				706.21	272.45	2.59	
Termitidae	Macrotermiinae	<i>Spilogitermes</i>	<i>spilogibbosus</i>	Male			2 Ethanol	11.24	3.16	6.26	15.25							
Termitidae	Macrotermiinae	<i>Apicitermitinae</i>	<i>sp.</i>	Female			1 Caodylate	11.4	3.88	6.12	21.19	9.07	1.98	6.26	13.81			
Termitidae	Apicitermitinae	<i>Rugitermes</i>	<i>sp.</i>	Female			2 Ethanol	19.95	6.07	12.54	32.35				1417.04	475.56	2.98	
Termitidae	Apicitermitinae	<i>Angulitermes</i>	<i>sp.</i>	Female			2 Ethanol	19.36	3.14	14.67	24.64				1517.92	478.83	3.17	
Termitidae	Apicitermitinae	<i>Amalitermes</i>	<i>beauvoisii</i>	Male			2 Ethanol	24.91	5.88	19.22	34.29	14.81	3.58	10.35	19.58	948.89	955.39	2.67
Termitidae	Termitiinae	<i>Amalitermes</i>	<i>beauvoisii</i>	Female			2 Ethanol	25.11	5.43	17.87	33.62	19.18	6.12	14.24	27.8	825.72	337.34	2.46
Termitidae	Termitiinae	<i>Dentispicotermitinae</i>	<i>brevicarinatus</i>	Female			2 Caodylate	9.76	1.71	7.78	12.06				1038.25	364.5	2.85	
Termitidae	Termitiinae	<i>Palmitermes</i>	<i>impostor</i>	Male			2 Caodylate	28.57	3.05	24.91	34.37				994.06	352.55	2.82	
Termitidae	Termitiinae	<i>Palmitermes</i>	<i>impostor</i>	Female			2 Caodylate	24.66	6.87	14.37	31.89				1006.28	361.11	2.79	
Termitidae	Termitiinae	<i>Termitinae</i>	<i>terralis</i>	Male			1 Caodylate	20.1	4.43	13.94	27.52				1096.98	390.17	2.81	
Termitidae	Termitiinae	<i>Termitinae</i>	<i>terralis</i>	Female			1 Caodylate	25.5	5.02	15.21	31.84							
Termitidae	Termitiinae	<i>Termitinae</i>	<i>terralis</i>	Male			2 Caodylate	21.6	8.97	14.25	40.29							
Termitidae	Termitiinae	<i>Termitinae</i>	<i>terralis</i>	Female			1 Ethanol	10.02	2.34	6.63	14.59	19.21	2	17.16	21.93			
Termitidae	Syntermitinae	<i>Embiastermes</i>	<i>testaceus</i>	Male			1 Caodylate	24.79	8.88	13.09	36.55							
Termitidae	Syntermitinae	<i>Embiastermes</i>	<i>testaceus</i>	Female			1 Caodylate	26.25	7.43	13.39	35.06				1375.02	431.04	3.19	
Termitidae	Syntermitinae	<i>Rhycolitermes</i>	<i>pacaratus</i>	Male			1 Ethanol	16.88	6.96	8.35	28.91				988.71	355.65	2.78	
Termitidae	Nasutitermitinae	<i>Nasutitermes</i>	<i>sp. G</i>	Male			2 Caodylate	8.49	0.71	7.36	9.32							
Termitidae	Nasutitermitinae	<i>Nasutitermes</i>	<i>sp. G</i>	Female			1 Caodylate	8.27	2.25	5.97	11.26	5.41	1	3.82	6.29			
Termitidae	Nasutitermitinae	<i>Nasutitermes</i>	<i>principis</i>	Male			1 Ethanol	18.05	3.59	12.05	22.22				1118.95	957.49	3.13	
Termitidae	Nasutitermitinae	<i>Nasutitermes</i>	<i>comiger</i>	Male			1 Ethanol	15.63	2.77	10.81	18.88				875.56	285.57	3.08	
Termitidae	Nasutitermitinae	<i>Nasutitermes</i>	<i>comiger</i>	Female			1 Ethanol	20.99	2.78	17.8	25.92							
Termitidae	Nasutitermitinae	<i>Conitermes</i>	<i>elevandi</i>	Male			1 Ethanol	12.78	2.04	9.29	17.14							
Termitidae	Nasutitermitinae	<i>Subitermes</i>	<i>sp.</i>	Male			1 Caodylate	19.11	7.58	10.79	33.79				593.11	203.12	2.92	
Termitidae	Nasutitermitinae	<i>Subitermes</i>	<i>sp.</i>	Female			1 Caodylate	13.58	5.25	7.25	26.26				610.78	193.78	3.11	
Termitidae	Nasutitermitinae	<i>Postopitermes</i>	<i>postopius</i>	Male			1 Ethanol	21.27	7.23	11.25	26.26							

Table 52.



Část IV - Chemické a vibrační signály používané při poplašné komunikaci termity *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae)

**Chemical and vibratory signals used in alarm communication in the termite**

***Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae)**

**Chemické a vibrační signály používané při poplašné komunikaci termity *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae)**

Autoři: Olivier Delattre, Jan Šobotník, Vojtěch Jandák, Jiří Synek, Josef Cvačka, Ondřej Jiříček, Thomas Bourguignon a David Sillam-Dussès

Přijato: 22. listopadu 2017 v Insectes Sociaux



## Chemical and vibratory signals used in alarm communication in the termite *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae)

O. Delattre<sup>1,2</sup> · J. Šobotník<sup>1</sup> · V. Jandák<sup>3</sup> · J. Synek<sup>1</sup> · J. Cvačka<sup>4</sup> · O. Jiříček<sup>3</sup> · T. Bourguignon<sup>1,5</sup> · D. Sillam-Dussès<sup>2,6</sup>

Received: 22 November 2017 / Revised: 3 December 2018 / Accepted: 4 December 2018  
© International Union for the Study of Social Insects (IUSSI) 2018

### Abstract

Termites have evolved diverse defence strategies to protect themselves against predators, including a complex alarm communication system based on vibroacoustic and/or chemical signals. In reaction to alarm signals, workers and other vulnerable castes flee away while soldiers, the specialized colony defenders, actively move toward the alarm source. In this study, we investigated the nature of alarm communication in the pest *Reticulitermes flavipes*. We found that workers and soldiers of *R. flavipes* respond to various danger stimuli using both vibroacoustic and chemical alarm signals. Among the danger stimuli, the blow of air triggered the strongest response, followed by crushed soldier head and light flash. The crushed soldier heads, which implied the alarm pheromone release, had the longest-lasting effect on the group behaviour, while the responses to other stimuli decreased quickly. We also found evidence of a positive feedback, as the release of alarm pheromones increased the vibratory communication among workers and soldiers. Our study demonstrates that alarm modalities are differentially expressed between castes, and that the response varies according to the nature of stimuli.

**Keywords** Communication · Defence · Pheromones · Positive feedback · Vibratory behaviour

### Introduction

Alarm communication is common in social animals, and it increases rates of survival (Wyatt 2003; Hunt and Richard 2013). Almost all social insects use alarm communication to coordinate the defensive activities of the entire colony (Leonhardt et al. 2016). These alarm signals are shared through different communication channels, with vibratory and pheromonal communication being the most common (Greenfield 2002; Cocroft and Rodríguez 2005). In termites, as well as their sister group, the subsocial roaches *Cryptocercus* (Seelinger and Seelinger 1983; Connétable et al. 1999; Röhrig et al. 1999; Reinhard and Clément 2002; Hager and Kirchner 2013; Delattre et al. 2015), vibratory and/or chemical signals are produced by disturbed colony members and induce the retreat of workers and other vulnerable castes while attracting soldiers (Reinhard and Clément 2002; Šobotník et al. 2008a, 2010). These mechanisms are essential for termite colony defence, and greatly contribute to their ecological success. For example, tamandua anteaters are specialized predators of *Nasutitermes*, which they find in wood pieces, but they are unable to feed on this termite directly in the nest where the soldier proportion is higher (Lubin and Montgomery 1981).

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00040-018-00682-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ J. Šobotník  
sobotnik@fd.czu.cz

<sup>1</sup> Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6 Suchbát, Czech Republic

<sup>2</sup> Institute of Research for Development, Sorbonne Universités, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, U 242, 32 Avenue Henri Varagnat, 93140 Bondy, France

<sup>3</sup> Faculty of Electrical Engineering, Czech Technical University in Prague, Technická 2, 166 27 Prague 6, Czech Republic

<sup>4</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám., 166 10 Prague, Czech Republic

<sup>5</sup> Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, 1919-1 Tancha, Onna-son, Kunigami-gun, Okinawa 904-0495, Japan

<sup>6</sup> Laboratory of Experimental and Comparative Ethology, EA4443, University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, 93430 Villetteuse, France

Many termite species produce substrate-borne vibrations by hitting their heads and/or abdomens on the substrate (Connétable et al. 1999; Röhrig et al. 1999; Hager and Kirchner 2013). All colony members are able to detect vibrations with their subgenual organs, specialized chordotonal vibroreceptors, located on the leg tibiae (Howse 1962, 1965a; Chapman 1998). Such unique alarm communication mechanism may have evolved only once in the common ancestor of termites and *Cryptocercus* (Seelinger and Seelinger 1983), probably after its diet switched from loose substrates to wood, a material through which vibratory signals easily spread. The vibratory alarm signals are generated using several types of oscillatory movements in termites. In this paper, we will follow the terminology introduced by Hill (2014), who recognized two categories of vibrational mechanisms: (1) drumming, commonly used in termites to produce substrate-borne vibrations; (2) tremulation, a body movement performed without any hit on the substrate, used to propagate the alarm selectively to calm nestmates (Kettler and Leuthold 1995; Šobotník et al. 2008b).

Another mean of alarm signalling is the chemical channel. Social insects evolved a rich set of exocrine glands (Billen and Šobotník 2015) producing a wide range of infochemicals. In termites, alarm pheromones are produced either by the frontal or labial glands, which are the defensive glands of soldiers (Šobotník et al. 2008a, 2010; Delattre et al. 2015). Alarm compounds are mostly mono- or sesquiterpenes (see Šobotník et al. 2010 for a review), except in *Mastotermes darwiniensis*, that uses benzoquinone (Delattre et al. 2015).

In certain termite species, the efficiency of alarm signalling is enhanced by positive feedback, a mechanism implying amplification of the signal by newly alerted specimens (Vrkoč et al. 1978; Roisin et al. 1990; Röhrig et al. 1999; Hager and Kirchner 2013; Cristaldo et al. 2015; Delattre et al. 2015). Vibratory positive feedback has been demonstrated in *M. darwiniensis* (Delattre et al. 2015), in several Macrotermitinae (Termitidae; Connétable et al. 1999; Hager and Kirchner 2013; Röhrig et al. 1999), and in *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae; Nasutitermitinae; Cristaldo et al. 2015). Chemical positive feedback relies upon the alarm pheromone present in soldier defensive secretion and is known in *M. darwiniensis* (Delattre et al. 2015) and in several *Nasutitermes* species (Termitidae; Nasutitermitinae) (Roisin et al. 1990; Vrkoč et al. 1978).

While the nature of vibratory or chemical alarm signals is well-known and has been the focus of many studies, the alarm transmission mechanisms have seldom been investigated. Cristaldo et al. (2015) demonstrated that individuals react to alarm pheromone stimulation by vibratory alarm signalling in *C. cyphergaster*, and Delattre et al. (2015) showed that artificial vibratory alarm signals trigger the release of the alarm pheromones in *M. darwiniensis*. In this study, we

carried out a careful examination of alarm communication mechanisms in *Reticulitermes flavipes* (Kollar, 1837) (Rhinotermitidae), including a vibrational and chemical analysis of this behaviour. Since only the basal termites and the most derived termites have been studied, this study aims to improve our understanding of the evolution of alarm communication in termites. *Reticulitermes* is a temperate genus that includes many pest species responsible for billions of dollars of damage annually worldwide (Su and Scheffrahn 2000). We characterized the vibratory and chemical communication in workers and soldiers, and determined their responses to particular danger stimuli, including the alarm pheromones of their colony mates.

## Materials and methods

### Insect material

All the experiments were carried out on one colony of *Reticulitermes flavipes* collected in Île d'Oléron (France) in 1998, and kept in laboratory stable conditions (26 °C, 90% relative humidity) since then.

### Behavioural experiments

All experiments were performed at 26 °C under dimmed red light. We first conducted a behavioural experiment to assess how *R. flavipes* workers and soldiers react to various danger stimuli. To avoid any effect of social deprivation, we formed groups ( $N=12$ ) of 38 workers and 2 soldiers (natural caste ratio; see Haverty 1977) that were put in 85 mm Petri dishes lined with moist clean Whatman No. 1 filter paper. The groups were left to settle for at least 2 h prior to testing, and between two tests. The stimuli set included: (1) light flash (3 s, 800 lx intensity, 5500–6000 K colour temperature), (2) blow of air, delivered through a fine straw for 3 s, which mimics a breach into the colony, (3) one crushed worker head and (4) one crushed soldier head. Crushed heads were prepared by cutting termites at the level of the prothorax and the heads were crushed on filter paper using a small spatula, allowing the impregnation of the filter paper by the contents of the frontal gland (soldier frontal gland is known to produce alarm pheromone; Reinhard and Clément 2002). We recorded group activity without any stimulation as controls for experiments (1) and (2). For experiments (3) and (4), the controls consisted in the insertion of a blank filter paper. Pieces of filter paper were carefully inserted into the Petri dish through a fine slit in the lid. Each stimulus was tested six times in random order and on randomly chosen groups (3 stimuli per group in random order). Behavioural reactions were recorded using a Canon EOS 6D combined with EF 100 mm f/2.8L Macro IS USM for 3 min before stimulation and 6 min after the stimulation.

We chose to analyse the speed-of-motion of individuals, to assess their reaction to our stimuli. Speed-of-motion increases as workers flee the disturbance source, and soldiers gather next to it (Reinhard and Clément 2002; Šobotník et al. 2008a, 2010). We tracked two randomly chosen workers and both soldiers per group for each record. We estimated the group behaviour 1 min before the stimulus introduction, and 1 and 6 min after (short-term and long-term responses, respectively), using the Mouse-Tracer Software (see Šobotník et al. 2008a). We then computed the variation of speed-of-motion for all the stimuli using the difference between the mean speed before and after the introduction of the stimulus. This method allowed us to normalize the variance between the different termite groups. Variations in speed-of-motion for all danger stimuli were compared to their respective controls.

### Chemical analyses

We carried out two experiments to identify the alarm compounds in workers and soldiers of *R. flavipes*. In the first experiment, 20 termites were cut at the level of the prothorax and the anterior parts were successively extracted with 60  $\mu$ l and 40  $\mu$ l of hexane. Both extractions took place over two successive nights at 4 °C. Both extracts were merged and one termite equivalent was injected in a 6890N gas chromatograph (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The most abundant compounds were identified based on spectral characteristics and published records (summarized in Šobotník et al. 2010). In the second experiment, we crushed heads of five individuals of each caste in a 1.2 mL glass vial with a Pasteur pipette. The headspace extraction of volatiles was carried out using SPME fibre holder for manual sampling equipped with a fused silica fibre coated with 30  $\mu$ m polydimethylsiloxane (Supelco, Bellefonte, USA). The analytes were desorbed at 220 °C in a split/splitless injector of a 5975B quadrupole mass spectrometer coupled to a gas chromatograph. The separation was achieved on a DB-5 ms capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm, a film thickness of 0.25  $\mu$ m, Agilent) at a constant flow mode (1 mL/min) with helium as a carrier gas. The column temperature was held at 40 °C (1 min), gradually increased at 5 °C/min to 200 °C, then gradually increased at 15 °C/min to 320 °C, and held at 320 °C for 3 min. The temperatures of the transfer line, ion source and quadrupole were 280, 230, and 150 °C, respectively. The compounds were ionized at 70 eV electrons.

### Vibroacoustic experiments

To decipher the vibratory component of *R. flavipes* behaviour, we formed ten new groups of termites, using the same ratio we used in our behavioural experiments. The aim of this experiment was to determine the interaction between a chemical stimulation and the vibratory component of alarm signalling

in *R. flavipes*. We crushed one worker and one soldier head on different pieces of filter paper (following the same protocol as the behavioural experiment), and used another identical piece of blank filter paper for control. Due to methodological constraints and to avoid the absorption of the termite-produced vibrations, termite groups were placed into a 85 mm Petri dish without filter paper, and moisture was provided by a piece of wet cotton attached to the lid. The bottom of the Petri dish was heavily scratched to allow termites to walk. Our experiments were carried out in an anechoic room at the Czech Technical University in Prague under dimmed red light. All experiments took place on a table hung from the ceiling to avoid any perturbations from the experimenters (see Supplementary video SV1). All experiments were recorded using a SONY DCR-SR72 camera in night-shot mode fixed above the experimental arena. These records were only used to link the behaviour of termite groups to recorded vibrations, and were not used for behavioural analyses.

Vibratory communication was recorded using accelerometers (Brüel and Kjær type 4507 B 005) glued to the bottom of Petri dishes. We analysed the recorded vibratory signals using a Soft dB Tenor recorder (24 bits, sampling frequency 48 kHz) and Matlab software (R 2012a; see ESM 1). Prior to each experiment, we recorded high-resolution videos of both, disturbed and undisturbed groups of termites, to decipher the repertoire of vibrations generated by *R. flavipes* workers and soldiers. We considered recorded frequencies below 15 Hz as low-frequency vibrations, and frequencies above 15 Hz as high-frequency vibrations. These preliminary tests were also used to determine the optimal parameters of frequency filters used for post-processing of vibration records of *R. flavipes* groups in the described environment. This allowed us to reduce the background noise.

In these experiments, because termite signals overlap, we were unable to analyse individual signals. Therefore, we computed the total amount of energy produced by group vibratory signals after each stimulation. This variable  $E_R$  was computed using the following equation:

$$E_R = 10 \cdot \log \left[ \frac{T_B \int_0^{T_A} |x_f(t)|^2 dt}{T_A \int_{-T_B}^0 |x_f(t)|^2 dt} \right],$$

in which  $T_A$  is the evaluation period after disturbance (60 s and 360 s, respectively),  $T_B$  is the evaluation period before disturbance (60 s), and  $x_f(t)$  is the filtered acceleration signal (bandpass filter 50–500 Hz) and is a function of time ( $t$ ).

### Statistics

We performed Kruskal–Wallis tests and two-by-two post hoc permutation tests (10,000 permutations) for independent



samples, and we carried out Friedman tests and two-by-two post hoc permutation tests (10,000 permutations) for paired samples. Bonferroni–Holm corrections (Holm 1979) were applied for multiple comparisons among groups. All statistical tests were performed with StatXact software (Cytel Studio, version 9.0.0, 2010).

## Results

### Behavioural experiments

All groups significantly reacted to all experimental stimuli. We found significant differences among stimulations for both soldiers and workers, both 1 and 6 min after stimulations (short-term vs. long-term responses, respectively; Table 1).

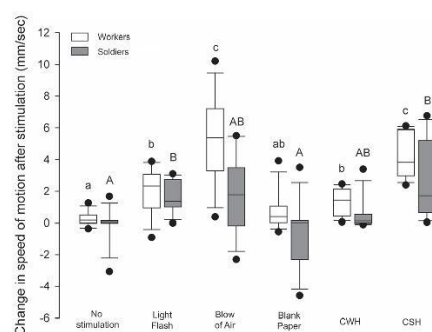
Workers were sensitive to the blow of air, the crushed soldier head (CSH) and light flash exposure, but not to the crushed worker head (CWH). Soldiers revealed similar responses, but were also sensitive to the crushed worker head during the first minute after the stimulus introduction (Fig. 1, Fig. S1).

### Chemical analyses

Analytical approaches revealed a set of monoterpenes present in soldier extracts and SPME, while no candidate compound was detected in workers, irrespective of method used (Table 2). Extracts of workers and soldiers also contained the cuticular hydrocarbons specific to *R. flavipes* (see, e.g. Bagnères et al. 1990; Vauchot et al. 1998; Perdureau et al. 2010).

### Vibroacoustic experiments

In response to the stimuli, soldiers and workers displayed body vibrations that they used to spread alarm within the groups. Using vibroacoustic preliminary tests in conjunction with high-resolution video recordings, we observed that these vibrations were mainly drumming or tremulation. Drumming was produced by abdomen hits against the



**Fig. 1** Change in speed-of-motion of workers (white bars) and soldiers (grey bars) in *R. flavipes* during a 1-min period after exposition to experimental stimuli in comparison to controls.  $N=12$  for each caste and each stimulus. Box plots show the median and 25–75th percentiles. Whiskers show all data excluding outliers outside the 10th and 90th percentiles (circles). Statistical differences are given for  $P < 0.05$ . CWH crushed worker head, CSH crushed soldier head

substrate, while tremulation was produced by tactile stimulation of nestmates with the head. In a few cases, soldiers displayed another kind of drumming signal consisting in powerful hits to the ground with their mandibles.

We found that drumming and tremulation were used in combination by workers and soldiers, forming thus complex vibrations. These vibrations occurred in two kinds of bursts (series of hits). The first kind of burst was at a high frequency of  $31 \pm 4$  Hz, while the second kind of burst occurred at a low frequency of  $7.4 \pm 1.3$  Hz. High and low-frequency vibrations were often performed together, the high-frequency bursts preceding the low-frequency bursts (Fig. 2, video SV1). This could be defined as the typical pattern of vibratory behaviour in *R. flavipes*. Occasionally, the high- and low-frequency bursts were performed separately after disturbance. A third kind of drumming burst was specifically displayed by soldiers,

**Table 1** Differences in speed-of-motion between all stimulations after stimulus introduction for workers and soldiers in *R. flavipes*

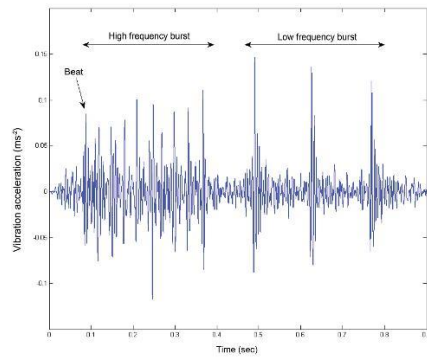
	Workers	Soldiers
Short-term response (1 min)	$H_3 = 46$ $P < 0.001$	$H_3 = 39.61$ $P < 0.001$
Long-term response (6 min)	$H_3 = 46.01$ $P < 0.001$	$H_3 = 27.24$ $P < 0.001$

Kruskal–Wallis for multiple comparisons statistic values ( $H_3$ ) and  $P$  values are provided for both castes

**Table 2** Chemical compounds identified by GC–MS from *Reticulitermes flavipes* worker and soldier samples (hexane extracts or head-space SPME)

Extracts	SPME	
	Workers	Soldiers
Workers		
CHC	$\alpha$ -Pinene $\beta$ -Pinene Limonene CHC	$\emptyset$ $\alpha$ -Pinene $\beta$ -Pinene Limonene Unknown compound

$\emptyset$  no volatile compound detected, CHC cuticular hydrocarbons



**Fig. 2** Example of vibratory behaviour showing the typical structure of the vibratory movements of workers and soldiers of *Reticulitermes flavipes*. The complex vibrations occurred at two distinct frequencies, described as high- (31 Hz) and low- (7.4 Hz) frequency bursts

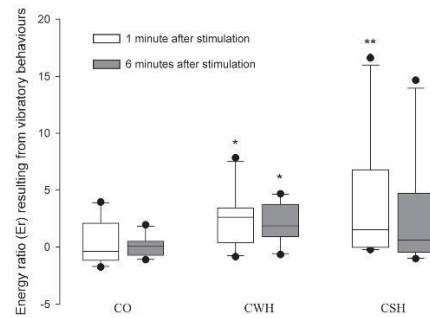
**Table 3** Differences in vibratory behaviour (permutation tests for paired samples) recorded in termite groups ( $N=10$ ) before and after the introduction of the stimulus

Stimulation	Short-term response (1 min)	Long-term response (6 min)
CO	-0.959 $P=0.359$	-0.5501 $P=0.5977$
CWH	-2.067 $P=0.021$	-2.279 $P=0.014$
CSH	-1.908 $P=0.006$	-1.574 $P=0.057$

CO control blank paper, CWH crushed worker head, CSH crushed soldier head

and consisted of repeated hits to the substrate with the mandibles, at an average frequency of  $26 \pm 2$  Hz. Unfortunately, this particular behaviour occurred too scarcely (only 40 series recorded in all experiments combined) to be analysed in our vibroacoustic work.

*Reticulitermes flavipes* groups reacted to the alarm pheromone by producing vibroacoustic signals (Fig. S2). The intensity of these signals was nearly identical 1 and 6 min after the stimulation, with the exception of the response to CSH, which was lower after 6 min (Table 3; Fig. 3). The responses to CSH were stronger in the first minute after the stimulus introduction, while CWH stimulation triggered a long-lasting effect increasing with time during the timeframe of the experiment (Table 4).



**Fig. 3** Energy ratio difference in vibrations recorded in groups ( $N=10$ ) before and after the introduction of the stimulus. Box plots show the median and 25th–75th percentiles. Whiskers show all data excluding outliers outside the 10th and 90th percentiles (circles). Statistical differences are shown for  $*P<0.05$  and  $**P<0.01$ . CO control blank paper, CWH crushed worker head sample, CSH crushed soldier head sample

**Table 4** Comparison between vibrational responses to crushed termite heads ( $N=10$ ) (permutation tests for paired samples)

Stimulation comparison	Short-term response (1 min)	Long-term response (6 min)
CO vs. CWH	-1.839 $P=0.063$	-2.378 $P=0.027$
CO vs. CSH	-1.841 $P=0.047$	-1.579 $P=0.088$

CO control blank paper, CWH crushed worker head, CSH crushed soldier head

## Discussion

Alarm communication is an important component of the defensive strategies of many gregarious, colonial and social animals, and is used to coordinate defensive activities. In *Reticulitermes flavipes*, alarm signals are spread via tremulations, substrate-borne vibrations and alarm pheromones. Irrespective of the communication channel, two modes of alarm transmission can be distinguished in natural situations: general alarm responses follow strong disturbance and affect large termite groups, while subtler specific alarm communication involves a few specimens reacting to low-level disturbance, such as the encounter of alien individual into the gallery system (Howse 1965b; Stuart 1963, 1988).

Here we studied the general alarm responses of *R. flavipes*, and clearly showed that potential dangers, represented

by air current, light flash, or crushed nestmate heads, are treated with differing types of alarm responses. The responses to air currents and crushed soldier heads were the most pronounced, and triggered immediate increase of speed-of-motion and quantity of vibroacoustic signals in workers and soldiers. These behavioural changes were abrupt and often lasted over 6 min.

The observed vibroacoustic signals were made of complex vibratory movements, combining drumming and tremulations. They were produced by workers and soldiers repeatedly hitting their abdomen on the substrate. These examples of vibroacoustic communication combine two kinds of bursts differing in beat frequencies, as described in *Coptotermes gestroi*, another species of Rhinotermitidae (see Hertel et al. 2011). A duration-dependent effect could be perceived and CSH samples elicited the strongest reaction during the first minute after the stimulation.

CSHs were not the only stimuli which could trigger vibrations, CWH revealed significant effect as well, as evidenced by the walking activity of soldiers and vibratory activity of both soldiers and workers. Our results concur with previous observations on *C. cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae) (Cristaldo et al. 2015), in which the CWH also provoke marked behavioural responses in soldiers. *C. cyphergaster* workers possess enlarged mandibular glands with defensive function (Costa-Leonardo and Shields 1990), which are possibly the source of chemicals responsible for the change in behaviour. In contrast, no gland with defensive role is known in *R. flavipes* workers, and the source of the excitement remains unknown.

Soldiers of *R. flavipes* also used their head and mandibles to perform powerful hits to the substrate, which produced a strong substrate-borne vibratory drumming-like signal, much stronger than the abdominal drumming. The same way of drumming has also been observed in Archotermopidae (Kirchner et al. 1994), Rhinotermitidae (Hertel et al. 2011) and Macrotermitinae (Termitidae) (Connétable et al. 1999; Hager and Kirchner 2013; Kettler and Leuthold 1995; Röhrig et al. 1999). The strongest signals are probably used to warn nestmates and recruit soldiers from deeper inside the colony.

Our chemical analysis showed high quantity of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, and limonene produced by the frontal gland of *R. flavipes* soldiers. These compounds form the alarm pheromone in *R. flavipes*, as it has been previously suggested by several authors (Bagnères et al. 1990; Parton et al. 1981; Reinhard et al. 2003), although not all compounds might be necessary for the function, as they were never tested separately. The alarm pheromones involve various compounds classes, such as monoterpenes (also in *R. flavipes*), sesquiterpenes (for review see Šobotník et al. 2010) or quinones (Delattre et al. 2015), and are known to be released from the soldier defensive glands, namely the labial glands in

Mastotermitidae and the frontal gland in Rhinotermitidae and Termitidae (Delattre et al. 2015; Kaib 1990; Kriston et al. 1977; Pasteels and Bordereau 1998; Reinhard and Clément 2002; Roisin et al. 1990; Šobotník et al. 2008a; Vrkoč et al. 1978).

Until recently, alarm positive feedback was only demonstrated either for vibroacoustic (Connétable et al. 1999; Delattre et al. 2015; Hager and Kirchner 2013; Röhrig et al. 1999) or chemical signals (Roisin et al. 1990; Vrkoč et al. 1978). Integrative studies appeared only recently, and vibroacoustic feedback to chemical alarm has been shown only in the basal *Mastotermes* (Mastotermitidae; Delattre et al. 2015) and the derived *Constrictotermes* (Termitidae: Nasutitermitinae; Cristaldo et al. 2015). In this study, we found the third example of vibroacoustic feedback to chemical alarm, as workers' and soldiers' speed-of-motion increased after exposure to head volatiles. Moreover, as showed in Connétable et al. (1999), it is likely that termites spread the alarm further using complex vibratory communication based on tremulations and drumming, contributing to the general state of colonial defensive activity (i.e. running away from the threat).

Our work is the first exhaustive study on the alarm communication strategies in a species of Rhinotermitidae. Both workers and soldiers of *R. flavipes* reacted to all stimulations (light flash, air currents and crushed nestmate heads) with various degrees of excitement and displaying different vibratory movements. These observations show specialized alarm communication strategy based on complementary modalities, which could trigger an efficient response according to the nature and intensity of endangering stimulus. Moreover, *R. flavipes* is a pest species in Western USA (Evans 2011; Evans et al. 2013) and has been introduced to several places around the world (Bagnères et al. 1990; Smith et al. 2006; Evans et al. 2013), where it became invasive (originally described as *R. santonensis*, and later synonymized with *R. flavipes* by Austin et al. 2005). The dominance of *R. flavipes* over *R. grassei*, which has already been observed in the field (Perdereau et al. 2011), might, at least partially, be explained by its sophisticated alarm communication strategy.

**Acknowledgements** This work was supported by the project IGA A30/17 of the Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, by the project CIGA 20184303 of the Czech University of Life Sciences Prague, and by the BQR 2014/2015 from the University Paris 13-SPC.

## References

- Austin JW, Szalanski AL, Scheffrahn RH, Messenger MT, Dronnet S, Bagnères A-G (2005) Genetic evidence for the synonymy of two *Reticulitermes* species: *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes santonensis*. *Ann Entomol Soc Am* 98:395–401

- Bagnères A-G, Clément JL, Blum MS, Severson RF, Joulie C, Lange C (1990) Cuticular hydrocarbons and defensive compounds of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *R. santonensis* (Feytaud): polymorphism and chemotaxonomy. *J Chem Ecol* 16:3213–3244
- Billen J, Šobotník J (2015) Insect exocrine glands. *Arthropod Struct Dev* 44:399–400
- Chapman RF (1998) The insects—structure and function, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Cocroft RB, Rodríguez RL (2005) The behavioral ecology of insect vibrational communication. *Bioscience* 55:323–334
- Connétable S, Robert A, Bouffault F, Bordereau C (1999) Vibratory alarm signals in two sympatric higher termite species: *Pseudacanthotermes spiniger* and *P. militaris* (Termitidae, Macrotermitinae). *J Insect Behav* 12:329–342
- Costa-Leonardo AM, Shields KS (1990) Morphology of the mandibular glands in workers of *Constrictotermes cyphergaster* soldiers (Termitidae, Nasutermitinae). *Int J Insect Morphol Embryol* 19:61–64
- Cristaldo P, Jandák V, Kotalová K, Rodrigues VB, Brothánek M, Jiříček O, DeSouza O, Šobotník J (2015) The nature of alarm communication in *Constrictotermes cyphergaster* (Blattodea: Termitoidea: Termitidae). *Biol Open* 4:1649–1659
- Delattre O, Sillam-Dussès D, Jandák V, Brothánek M, Rücker K, Bourguignon T, Vytisková B, Cvačka J, Jiříček O, Šobotník J (2015) Complex alarm strategy in the most basal termite species. *Behav Ecol Sociobiol* 69:1945–1955
- Evans TA (2011) Invasive termites. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N (eds) *Biology of termites: a modern synthesis*. Springer, Dordrecht, pp 519–562
- Evans TA, Forschler BT, Grace JK (2013) Biology of invasive termites: a worldwide review. *Annu Rev Entomol* 58:455–474
- Greenfield MD (2002) Signalers and receivers: mechanisms and evolution of arthropod communication. Oxford University Press, New York
- Hager FA, Kirchner WH (2013) Vibrational long-distance communication in the termites *Macrotermes natalensis* and *Odontotermes* sp. *J Exp Biol* 216:3249–3256
- Haverty M (1977) The proportion of soldiers in termite colonies: a list and a bibliography (Isoptera). *Sociobiology* 2:199–216
- Hertel H, Hanspach A, Piarre R (2011) Differences in alarm responses in drywood and subterranean termites (Isoptera: Kalotermitidae and Rhinotermitidae) to physical stimuli. *J Insect Behav* 24:106–115
- Hill PSM (2014) Stretching the paradigm or building a new? Development of a cohesive language for vibrational communication. In: Cocroft RB, Gogala M, Hill PSM et al (eds) *Studying vibrational communication*. Springer, Heidelberg, pp 13–30
- Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6:65–70
- Howse PE (1962) The perception of vibration by the subgenual organ in *Zootermopsis angusticollis* Emerson and *Periplaneta americana* L. *J Cell Mol Life Sci* 18:457–458
- Howse PE (1965a) The structure of the subgenual organ and certain other mechanoreceptors of the termite *Zootermopsis angusticollis* (Hagen). *Proc R Entomol Soc A* 40:137–146
- Howse PE (1965b) On the significance of certain oscillatory movements of termites. *Insect Soc* 12:335–346
- Hunt JH, Richard F-J (2013) Intracolony vibroacoustic communication in social insects. *Insect Soc* 60:403–417
- Kaib M (1990) Intra- and interspecific chemical signals in the termite *Schedorhinotermes*-production sites, chemistry, and behaviour. In: Gribakin FG, Wiese K, Popov AV (eds) *Sensory systems and communication in arthropods*. Birkhauser, Basel, pp 26–32
- Kettler R, Leuthold RH (1995) Inter- and intraspecific alarm response in the termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). *Insect Soc* 42:145–156
- Kirchner WH, Broecker I, Tautz J (1994) Vibrational alarm communication in the damp-wood termite *Zootermopsis nevadensis*. *Physiol Entomol* 19:187–190
- Kriston MI, Watson JAL, Eisner T (1977) Non-combative behaviour of large soldiers of *Nasutitermes exitiosus* (Hill): an analytical study. *Insect Soc* 24:103–111
- Leonhardt SR, Menzel F, Nehring V, Schmitt T (2016) Ecology and evolution of communication in social insects. *Cell* 164:1277–1287
- Lubin YD, Montgomery GG (1981) Defenses of *Nasutitermes* termites (Isoptera, Termitidae) against *Tamandua* anteaters (Edenata, Myrmecophagidae). *Biotropica* 13:66–76
- Parton AH, Howse PE, Baker R, Clément JL (1981) Variation in the chemistry of the frontal gland secretion of European *Reticulitermes* species. In: Howse PE, Clément JL (eds) *Biosystematics of social insects*. Academic Press, London, pp 193–209
- Pasteels JM, Bordereau C (1998) Releaser pheromones in termites. In: Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE, Winston ML (eds) *Pheromone communication in social insects*. Westview Press, Boulder, pp 193–215
- Perdereau E, Dedeine F, Christides JP, Bagnères A-G (2010) Variations in worker cuticular hydrocarbons and soldier isoprenoid defensive secretions within and among introduced and native populations of the subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*. *J Chem Ecol* 36:1189–1198
- Perdereau E, Dedeine F, Christides JP, Dupont S, Bagnères A-G (2011) Competition between invasive and indigenous species: an insular case study of subterranean termites. *Biol Invasions* 13:1457–1470
- Reinhard J, Clément JL (2002) Alarm reaction of European *Reticulitermes* termites to soldier head capsule volatiles (Isoptera, Rhinotermitidae). *J Insect Behav* 15:95–107
- Reinhard J, Quintana A, Sreng L, Clément JLA (2003) Chemical signals inducing attraction and alarm in European *Reticulitermes* termites (Isoptera, Rhinotermitidae). *Sociobiology* 42:675–691
- Röhrig A, Kirchner WH, Leuthold RH (1999) Vibrational alarm communication in the African fungus-growing termite genus *Macrotermes* (Isoptera, Termitidae). *Insectes Soc* 46:71–77
- Roisin Y, Everaerts C, Pasteels JM, Bonnard O (1990) Caste-dependent reactions to soldier defensive secretion and chiral alarm/recruitment pheromone in *Nasutitermes princeps*. *J Chem Ecol* 16:2865–2875
- Seelinger G, Seelinger U (1983) On the social organization, alarm and fighting in the primitive cockroach *Cryptocercus punctulatus* Scudder. *Z Tierpsychol* 61:315–333
- Smith J, Su N-Y, Escobar RN (2006) An areawide population management project for the invasive eastern subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) in a low-income community in Santiago, Chile. *Am Entomol* 52:253–260
- Šobotník J, Hanus R, Kalinová B, Piskorski R, Cvačka J, Bourguignon T, Roisin Y (2008a) (E,E)- $\alpha$ -farnesene, the alarm pheromone of *Prorhinotermes canalifrons* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Chem Ecol* 34:478–486
- Šobotník J, Hanus R, Roisin Y (2008b) Agonistic behaviour of the termite *Prorhinotermes canalifrons* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Insect Behav* 21:521–534
- Šobotník J, Jirošová A, Hanus R (2010) Chemical warfare in termites. *J Insect Physiol* 56:1012–1021
- Stuart AM (1963) Studies on the Communication of Alarm in the Termite *Zootermopsis nevadensis* (Hagen), Isoptera. *Physiol Zool* 36:85–96
- Stuart AM (1988) Preliminary studies on the significance of head-banging movements in termites with special reference to *Zootermopsis angusticollis* (Hagen) (Isoptera: Hodotermitidae). *Sociobiology* 14:49–60
- Su NY, Scheffrahn RH (2000) Termites as pests of buildings. In: Abe T, Bignell D, Higashi M (eds) *Termites, evolution, sociality,*

- symbioses, ecology. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 437–453
- Vauchot B, Provost E, Bagnères A-G, Riviere G, Roux M, Clément J-L (1998) Differential adsorption of allospecific hydrocarbons by the cuticles of two termite species, *Reticulitermes santonensis* and *R. lucifugus grassei*, living in a mixed colony. *J Insect Physiol* 44:59–66
- Vrkoč J, Křeček J, Hrdý I (1978) Monoterpenic alarm pheromones in two *Nasutitermes* species. *Acta Entomol Bohemoslov* 75:1–8
- Wyatt TD (2003) Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste. Cambridge University Press, Cambridge

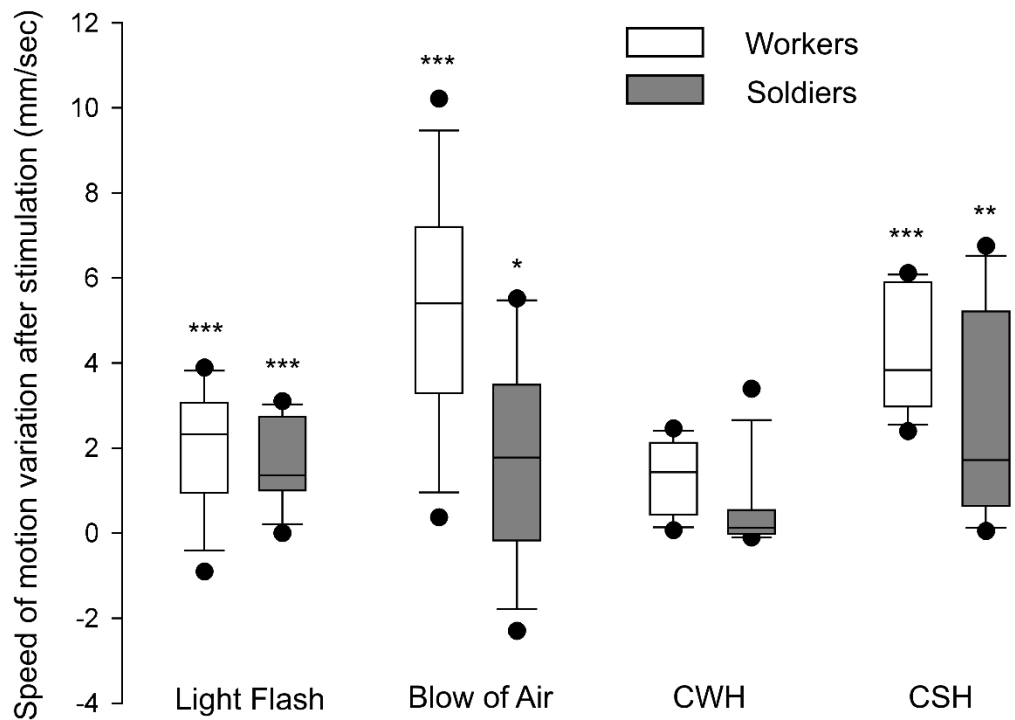


Fig. S1. Variation in speed-of-motion of workers (white bars) and soldiers (grey bars) in *R. flavipes* during a 6-minute period after the introduction of the stimulus in comparison to the respective controls. N=12 for each caste and stimulus. Box plots show the median and 25–75th percentiles. Whiskers show all data excluding outliers outside the 10th and 90th percentiles (circles). Statistical differences are shown for \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . Abbreviations: CO, control blank paper; CWH, crushed worker head sample; CSH, crushed soldier head sample.

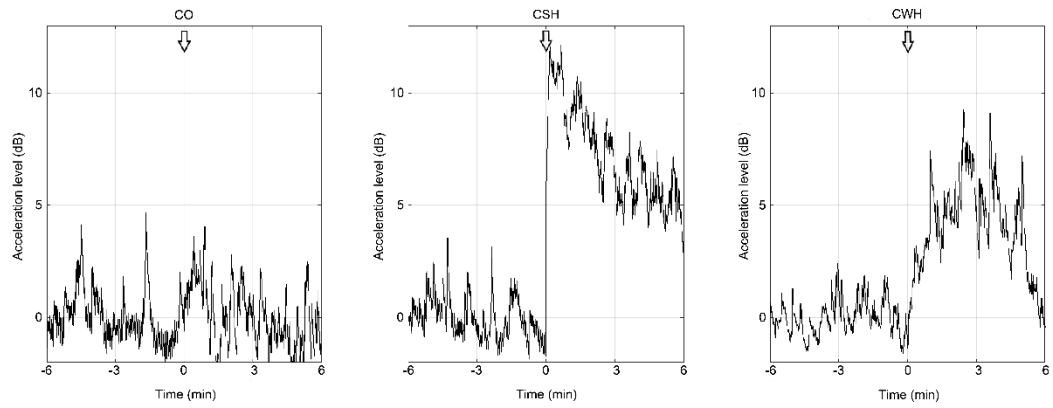


Fig S2. Typical vibroacoustic responses of *Reticulitermes flavipes* termite groups obtained after the introduction of the stimulus (arrow). Abbreviations: CO, control blank paper; CWH, crushed worker head; CSH, crushed soldier head.

## 4) Diskuse

### Část I - Orální žláza, nový exokrinní orgán termitů

Mezi žlázy, které najdeme u všech druhů termitů patří labrální, mandibulární, labiální a sternální žláza (Lambinet, 1959; Noirot, 1969; Šobotník a Hubert, 2003; Šobotník a Weyda 2003; Palma-Onetto et al., 2018; 2019) a částečně sem můžeme zařadit frontální žlázu, kterou najdeme u naprosté většiny druhů Neoisoptera (Deligne et al., 1981; Quennedy 1984; Kutalová et al., 2013). Veškeré ostatní žlázy se vyskytují pouze u některých skupin nebo kast (Billen a Šobotník, 2015). Nově popsaná orální žláza byla pozorována jak u dělníků a vojáků dřevožravých druhů *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae) a *Sphaerotermes spaherotherax* (Termitidae: Sphaerotermittinae), tak u dělníků a vojáků hlínožravých termitů *Spinitermes trispinosus* (Termitidae: termitinae). To že byla orální žláza pozorována jak u „vyšších“ a „nižších“ termitů, tak u termitů dřevožravých a hlínožravých, poukazuje na přítomnost žlázy u všech druhů/kast, nebo alespoň u naprosté většiny. Pokud by se opravdu jednalo o žlázu přítomnou u všech druhů, naznačovalo by to funkci důležitou pro běžný život termitích kolonií. Konkrétní význam a funkce žlázy zatím není znám, ale nabízí se nám několik hypotéz založených na umístění a struktuře žlázy. Pro komunikační funkci hovoří to, že cytoplazma sekrečních buněk je převážně tvořena hladkým endoplazmatickým reticulum, tedy organelou která je známa produkcí lipidových substancí, které jsou často používány pro chemickou komunikaci (Tillman et al., 1999). Produkce lipidových substancí je dále potvrzena přítomností kapek umístěných volně v cytoplazmě u několika pozorovaných vzorků. Ostatní pozorované organely jako například drsné endoplazmatické retikulum nebo Golgiho aparát dosahovaly prokazatelně nižší abundance a patrně slouží pouze pro udržování sekrečních funkcí. Proti komunikační funkci ale hovoří její umístění přímo za ústním otvorem. Nabízí se tedy teorie, že sekrece orální žlázy slouží k lubrikaci začátku trávicího traktu, čímž usnadňuje polykání částí potravy, které mohou být suché nebo tvořeny většími kusy (Donovan et al., 2001). Žláza by také mohla sloužit k produkci primer feromonu, který reguluje kastovní vývoj v kolonii. Ve skutečnosti jsou termití kolonie založeny již bezkřídlými imagy a vývoj sekundárních pohlavních jedinců je inhibován právě zakládajícím párem pomocí substance předávané vzájemným kontaktem mezi jedinci (Lüscher 1961; Springhetti, 1972). Volatilní látky tvořící primer feromony byly nedávno identifikovány (Matsuura et al., 2010; Funaro et al., 2018) a teoreticky mohou být produkovány orální žlázou. Stejný příklad najdeme u vojáků, kteří inhibují proces tvorby nových vojáků (Lefeuvre and Borderau, 1984; Mitaka et al., 2017). Přítomnost neoteniků je velice běžná



a to především mezi termity „nižšími“, z použitých modelových rodů byli pozorováni u *Prorhinotermes* a *Microcerotermes* (Myles, 1999). Tím pádem by primer feromon mohl být vylučován orální žlázou a následně předáván dalším členům kolonie pomocí orální trophallaxie, která je u termitů zcela běžná (McMahan, 1969), tak jak již bylo dříve naznačováno (Lüscher, 1961). Ostatní funkce, jako například obrana nebo tvorba trávicích enzymů, se zdá velmi nepravděpodobná, vzhledem k velikosti žlázy (nejmenší ze všech pozorovaných žláz u termitů), struktuře a ultrastruktuře.

## Část II - Labrální žláza termitích vojáků

Labrální žláza je vnitřní součástí labra a tvoří tenkou vrstvu která pokrývá dolní část preorální dutiny. Poprvé byla popsána jako exokrinní žláza v roce 1981 (Deligne et al. 1981). Quennedey (1984) popsal hypofaryngeální část labrální žlázy a navrhnul, že přítomnost průsvitné špičky potvrzuje přítomnost žlázy u termitů vojáků. Až poměrně nedávno se objevily další práce zabývající se touto žlázou. Šobotník et al. (2010d) se zabýval obranými žlázami druhu *Glossotermes oculatus* a Costa-Leonardo a Haifig (2014) publikovali práci o labrální žláze *Cornitermes cumulans*. Křížková et al. (2014) prokázala její přítomnost u imag některých druhů. Z výsledků vyplývá, že žláza patří mezi základní části těla termitů, ačkoli její přítomnost byla doposud zkoumána jen výjimečně. Zde byla její přítomnost prokázána u vojáků všech 28 zkoumaných druhů napříč fylogenezí, což bylo velmi překvapující vzhledem k jejímu doposud prokázanému výskytu pouze u tří druhů (Deligne et al., 1981; Quennedey, 1984; Šobotník et al, 2010d; Costa-Leonardo a Haifig, 2014). Labrální žláza je rozdělena na dva sekreční regiony umístěné na ventrální části labra a dorsoapikální části hypofarynxu. Ačkoli epithelium v hypofaryngeální části je vždy tenčí než v labrální části, tak ultrastruktura buněk obou částí je identická. Takže předpokládáme, že obě části plní stejnou roli a měly by být považovány za jednu žlázu. Také změna v názvosloví z „labrální žlázy“ na „cibariální žlázu“ kterou navrhl Quennedey (1984), a která byla založena na rozdělení do dvou regionů je zcela zbytečná.

Průsvitná špička je tradičně popisován podle morfologických znaků. Dorsální strana labra je vždy sklerotizovaná, zatímco ventrální strana je vždy pokryta lucentní membránovitou kutikulou. Nicméně druhy se mohou lišit mírou sklerotizace dorsální strany, především na apexu labra. Zatímco někteří vojáci vykazují nezměněnou míru sklerotizace labra (bez průsvitné špičky), tak u některých druhů se míra sklerotizace značně snižuje směrem k apexu labra (s průsvitnou špičkou). Všechny basální taxy primárně postrádají průsvitnou špičku, který se vyvinul až u společných předků Rhinotermitidae a Termitidae a byl nezávisle ztracen přinejmenším čtyřikrát: (i) Nasutitermitinae, kde je celé labrum velikostně značně zredukováno; (ii + iii) dvakrát nezávisle u linií s luskacími mandibulami, *Pericapritermes* a *Neocapritermes* + *Planicapritermes*; (iv) a také u rodu *Microcerotermes*. Zatímco byla u některých skupin prokázána ztráta průsvitné špičky, nijak to nesouvisí s přítomností labrální žlázy, která byla prokázána u všech druhů. Z toho vyplývá, že vývoj luskacích mandibul nezpůsobil ztrátu labrální žlázy a tato mandibulární adaptace nemusí souviset s potlačením nebo ztrátou chemických adaptací (Kyjaková et al. 2015).

Cytologické funkce vykazovaly spoustu podobností mezi všemi studovanými druhy. Navíc čtyři studované druhy, které měly polymorfní vojáky, prokázaly, že velikost labrální žlázy se zvětšuje s velikostí subkasty, což bylo nejvíce zjevné u *Psammotermes hybostoma*. Stejně funkce, které sdílí labrální a hypofaringeální část byly: (i) výskyt hladkého endoplazmatického retikula; (ii) přítomnost apikálních mikrovill s centrálním kanálkem; (iii) dobře vyvinuté bazální invaginace zajišťující příjem prekurzorů z haemolymphy; (iv) modifikace kutikuly v okraji labrální žlázy zajišťující vývod sekrecí (viz Deligne et al., 1981; Quennedey, 1984; Šobotník et al., 2010; Costa-Leonardo a Haifig, 2014). Tyto ultrastrukturální funkce jsou konzervativním popisem obou sekrečních regionů všech studovaných druhů a naznačují stejnou funkci labrální žlázy u všech druhů termitů. Sekrece labrální žlázy je ukládána mezi sekrečním epitelem a kutikulou a také v kutikule samotné. Labrální sekrece z buněk žlázy je neurálně kontrolována, pravděpodobně z mozku, protože jednotlivé axony byly často pozorovány na bázi sekrečního epithelu.

Funkce žlázy velice pravděpodobně není obraná, vzhledem k tomu že zde zcela chybí sekreční reservoár a funkční struktury typické pro obrané žlázy (Chapman, 2013). Navíc je labrální žláza přítomna u vojáků všech druhů, bez závislosti na jejich defenzivních strategiích, včetně vojáků kteří mají žlázu v nasu, luskacími vojáky nebo druhy které si protrhávají tělní stěnu. Složení sekrecí labrální žlázy zůstává neznámé, i přes opakované pokusy identifikace látek, provedené v rámci publikace III. Nicméně vysoký výskyt hladkého endoplazmatického retikula naznačuje, že sekrece můžou mít lipidovou nebo nestálou povahu a mohou být používány pro komunikaci (Percy-Cunningham a MacDonald, 1987; Nakajima, 1997; Tillman et al, 1999; Alberts et al., 2002).

Přítomnost specializovaných receptorů a ventrální straně labra pravděpodobně pomáhá při dávkování labrálních sekrecí. Všechny pozorované receptory totiž obsahovaly několik dendritů, takže chemosensorická funkce je pravděpodobnější pro většinu druhů, zatímco mechanosensorická funkce je pouze teoretická. To, že by měly labrální receptory reagovat na mechanický tlak, by mělo paralelu u sternální žlázy, kde je uvolňování sekrecí řízeno skupinou campaniformních sensil (Stuart a Satir, 1968; Quennedey et al, 2008).

Buňky III. třídy se často vyskytovaly v dorsální části labra a na sklerotizované části kutikuly (Šobotník et al., 2004; Šobotník et al., 2005). Buňky III. třídy se také mohou vyskytovat přilehlé k sekrečnímu epithelu labra, ale neměly by být považovány za součást labrální žlázy, dokud nedojde ke kombinaci s druhou třídou buněk, jak bylo pozorováno u *Glossotermes oculatus* (Šobotník et al., 2010d), minoritních vojáků *Dolichorhinotermes longilabius* (viz výsledky část II), *Cornitermes cumulans* (Costa-Leonardo a Haifig, 2014) a

*Termes hospes* (výsledky část II). Buňky třetího typu nebyly pozorovány v hypofaryngeální části labrální žlázy u žádného z výše zmíněných druhů. Ultrastruktura buněk III. třídy je jednotná u všech druhů termitů bez ohledu na kastu (Costa-Leonardo a Shields, 1990; Šobotník et al, 2004) nebo umístění v labrální žláze, stejně tak v mandibulární (Lambinet, 1959; Cassier et al., 1977), sternální (Noirot a Quennedey, 1981; Quennedey et al., 2008), tergální (Ampion a Quennedey, 1981; Šobotník et al., 2005) a epidermální (Šobotník et al., 2003). Sekreční buňky jsou vždy bohaté na drsné endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát a obsahují rozdílné množství mírně elektronově-lucentních váčků uvolňovaných do extracelulárních reservoárů, do kterých ústí kutikulární kanálek. Tato ultrastruktura naznačuje, že drsné endoplazmatické retikulum produkuje proteinové vodou rozpustné sekrece, které jsou konfigurovány v Golgiho aparátu (Hand a Oliver, 1984), než jsou vypuštěny na povrch tělesné kutikuly. A tyto sekrece se mohou objevit jako úplně nejsvrchnější vrstvy při tělesném otěru (Chapman, 2013).

### Část III - Labrální žláza termitů: evoluce a funkce

Bylo potvrzeno že labrální žláza se vyskytuje nejen u vojáků všech druhů (viz část II), ale také u dělníků a imag všech druhů termitů a byla také zjištěna u nymf a dospělců dřevožravého švába *Cryptocercus punctulatus*. Labrum a labrální žláza sdílí stejné charakteristiky u zatím všech studovaných druhů a kast. Společným znakem je vyšší stupeň sklerotizace, který je většinou výraznější u vojáků, výskyt buněk III. třídy na dorsální straně labra, ale vzácněji jako součást labrální žlázy a přítomnost labrální žlázy obsahující buňky prvního typu na ventrální straně labra a na dorsální straně hypofarynxu. Sekreční buňky jsou také poměrně stejné, co se týče ultrastruktury, vykazující apikální mikrovilly s centrálním kanálkem (chybějící u *Cryptocercus punctulatus*), početné váčky různých elektronových hustot, vysoký výskyt hladkého a drsného endoplazmatického retikula, modifikovaná kutikula pro vypouštění sekrecí a inervování sekrečních buněk přes volně umístěné axony v basálních invaginacích (viz část II). Na druhou stranu jsou zde značné rozdíly mezi vojáky a dělníky a dospělci: (i) průsvitná špička, která se vykystuje u vojáků mnoha druhů, chybí u ostatních kast; (ii) tvar labra je u vojáků různých druhů velmi rozdílný, zatímco u dělníků a dospělců je prakticky identický u všech druhů; (iii) celkový výskyt mikrovill a basálních invaginací je mnohem nižší u vojáků a dospělců (viz část II). Toto zjištění naznačuje, že je pravděpodobně funkce labrální žlázy stejná u všech kast, ale hraje mnohem důležitější roli u vojáků. Nesmíme také opomenout fakt, že sekrece labrální žlázy je pravděpodobně používána v jiném kontextu u dělníků a dospělců, než u vojáků, protože tření konce labra s vývodem sekrece o substrát bylo pozorováno výhradně u vojáků. Ačkoli *Cryptocercus punctulatus* ve struktuře labrální žlázy vykazoval odlišnosti v porovnání s termity, jako například kratší mikrovilly bez centrálních kanálků, tak přítomnost svazků mikrotubulů byla společná s vojáky *Mastotermes darwiniensis* a vojáky *Hodotermopsis sjoestedti* (viz část II) a dělníky *Glyptotermes sp.* a poukazuje že, je to společný znak basálních skupin zděděná po švábích předcích.

Zajímavou otázkou je způsob, kterým je kontrolováno vypouštění sekrece žlázy. Zdá se jasné, že uvolňování ze sekrečních buněk je pod neurální kontrolou, podobně jako u sternální žlázy čeledi Mastotermitidae, Archotermopsidae a Kalotermitidae (Quennedey 1969, 1975; Quennedey et al., 2008), nasální žlázy vojáků rodu *Angularitermes* (Šobotník et al., 2015) a sliných žláz různých skupin hmyzu (Whitehead, 1971; Ali et al., 1993; Ali a Orchard, 1996; Ali, 1997), včetně druhů *Kalotermes flavicollis* (Alibert, 1983) a *Prorhinotermes simplex* (Šobotník a Weyda, 2003). Po uvolnění ze sekrečních buněk je sekrece pravděpodobně vyloučena z těla tlakem labra (a hypofarynxu) na substrát a tlak

je pravděpodobně kontrolován skupinami campaniformních sensil (viz část II) podobných sensilám kontrolujících vypouštění stopovacího feromonu ze sternální žlázy (Stuart a Satir, 1968; Quennedey et al., 2008). Chemoreceptory jsou očividně mnohem hojnější v oblasti „c“ (viz kapitola výsledky, část III, fig. 1), ale zůstává nezjištěno jestli tyto receptory jsou také zapojeny do uvoňování sekrecí nebo hrají roli při „ochutnávání“.

U všech kast zcela chybí v labrální žláze rezervoár a sekrece je ukládána mezi sekrečním epitelem a kutikulou (viz část II). Je tak vyvrácena domněnka (část II), že labrální žláza má obranou funkci (například Deligne et al., 1981; Quennedey 1984). Stejně jako u vojáků, i u ostatních kast je struktura žlázy velmi podobná u všech druhů a vysoký výskyt hladkého endoplasmatického retikula je častý pro produkci lipidických a nestálých látek, typických ve feromonové komunikaci (Percy-Cunnigham a MacDonald, 1987; Nakajima, 1997; Tillman et al., 1999; Alberts et al., 2002) a poskytuje další důkaz pro spíše komunikační funkci (viz část II).

Opakovaně byli pozorováni vojáci, kteří otírali labrum o substrát po tom, co se setkali s hrozbou (cizí termít nebo mravenec) a pozorované chování (pohyb vzad kombinované s třením labra) poukazuje na to, že vojáci varují ostatní jedince před hrozbou pomocí labrálních sekrecí. Bohužel tuto funkci se nepodařilo prokázat pomocí laboratorních testů a pouze vyhýbání se cizím termitům (kteří mohou být považováni za konkurenty nebo hrozbu) v návaznosti na sekreci labrální žlázy bylo statisticky významné. Nicméně tento efekt mohl být způsoben jinými složkami vyloučenými labrem, jako například kutikulárními uhlovodíky sloužícími k rozpoznávání stejného druhu/obyvatele hnízda (Howard a Blomquist, 1982, 2005) nebo sekrece frontální žlázy, která prokazatelně kontaminuje všechny části těla termitích vojáků (Piskorski et al., 2007). Takže funkce sekrece musí být přesně otestována, zvláště když se nepodařilo zjistit pro labrální žlázu žádné specifické složky, pravděpodobně kvůli malému množství sekrece, které je spojeno s chybějícím rezervoárem a relativně malou velikostí žlázy.

#### Část IV - Chemické a vibrační signály používané při poplašné komunikaci termita *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae)

Poplašná komunikace je důležitou součástí obranných strategií mnoha společenských, koloniálních a sociálních druhů zvířat, a slouží ke koordinaci obranných aktivit. U druhu *Reticulitermes flavipes* jsou poplašné signály šířeny tremulací, vibracemi substrátu a poplašnými feromony. Bez ohledu na komunikační kanál, mohou být v přírodních podmínkách rozlišeny dva druhy přenosu: (i) po silném narušení následuje poplašná odezva, která ovlivňuje velké skupiny termitů; (ii) zatímco jemnější specifická poplašná komunikace ovlivňuje pouze několik jedinců, kteří reagují na narušení malého významu, jako například proníknutí cizího jedince do systému galerií (Howse, 1965; Stuart, 1963, 1988). Cílem studie byla všeobecná poplašná komunikace druhu *Reticulitermes flavipes* a zcela jasně se ukázalo, že potenciální nebezpečí, zde reprezentováno proudem vzduchu, světelným zábleskem a rozdrčenou hlavou hnízdního jedince, je nádlesdováno rozdílnými poplašnými reakcemi. Nejvýraznější reakce následovaly po závanu vzduchu a vložení rozdrčené hlavy a spouštěly okamžité zrychlení pohybu a množství vibroakustických signálů, jak u vojáků, tak u dělníků. Tyto behaviorální změny byly výrazné a trvaly často více než šest minut. Pozorované vibroakustické signály se skládaly z komplexu vibračních pohybů, kombinací bubnování a tremulací. Byly produkovány vojáky a dělníky opakovanými údery abdomenů na substrát. Tyto příklady vibroakustické komunikace kombinují dva druhy zřetelně oddělených frekvencí klepání, stejně jako bylo popsáno u *Coptotermes gestroi*, dalšího druhu z čeledi Rhinotermitidae (Hertel et al., 2011). Také byl zaznamenán účinek v závislosti na délce trvání a vložení rozdrčené hlavy vojáka vykazovalo nejsilnější účinek během první minuty po vložení. Rozdrčené hlavy vojáků nebyly jedinou stimulací schopnou vyvolat poplašné reakce, rozdrčené hlavy dělníků také vykazovaly statisticky významné reakce, především zvýšením pohybové aktivity a poplašných vibrací u dělníků i vojáků. Naše výsledky se shodují s předešlým pozorováním u *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae: Nasutitermitinae) (Cristaldo et al., 2015), u kterého rozdrčené hlavy dělníků také vyvolaly významné behaviorální reakce u vojáků. Dělníci *C. cyphergaster* také nesou zvětšené mandibulární žlázy s obranou funkcí (Costa-Leonardo a Shields, 1990), které jsou pravděpodobně zdrojem chemikálií zodpovědných za změny v chování. Na druhou stranu u dělníků *R. flavipes* není známa žádná žláza s obranou funkcí a zdroj chemikálií zůstává neznámý. Vojáci *R. flavipes* také používají hlavy a mandibuly k silným úderům na substrát, což vyvolává silné vibrační signály, které se šíří podložím a je mnohem silnější než bubnování abdomenem. Stejně

bubnování bylo pozorováno u čeledi Archotermopsidae (Kirchner et al., 1994), Rhinotermitidae (Hertel et al., 2011) a podčeledi Macrotermitinae (Termitidae) (Connétable et al., 1999; Hager a Kirchner 2013; Kettler a Leuthold 1995; Röhrig et al., 1999). Nejsilnější signály jsou pravděpodobně používány k varování ostatních jedinců a přivolání vojáků ze vzdálenějších částí hnízda.

Chemické analýzy ukázaly vysoké hodnoty  $\alpha$ -pinenu,  $\beta$ -pinenu a limonenu produkovaných frontální žlázou vojáků *R. flavipes*. Tyto složky tvoří poplašný feromon *R. flavipes*, jak bylo dříve naznačováno několika autory (Bagnères et al., 1990; Parton et al., 1981; Reinhard et al., 2003), ačkoli ne všechny složky musí být nezbytné pro funkci žlázy, protože nikdy nebyly testovány samostatně. Poplašné feromony zahrnují různé třídy látek, jako například monoterpeny (včetně *R. flavipes*), seskviterpeny (Šobotník et al., 2010b) nebo chinony (Dalettre et al., 2015) a je známo že jsou vypouštěny z obraných žláz vojáků, především žlázy labiální u Mastotermitidů a frontální žlázy u Rhinotermitidů a Termitidů (Delattre et al., 2015; Kaib, 1990, Kriston et al., 1977; Pasteels a Bordereau 1998; Reinhard a Clément; 2002; Roisin et al., 1990; Šobotník et al., 2008; Vrkoč et al., 1978). Až do nedávna byla prokázána poplašná zpětná reakce pouze u vibroakustiky (Connétable et al., 1999; Delattre et al., 2015; Hager a Kirchner 2013; Röhrig et al., 1999) nebo chemických signálů (Roisin et al., 1990; Vrkoč et al., 1978). Integrativní studie se objevily pouze nedávno a vibroakustická závislost na poplašných chemikáliích byla prokázána pouze u bazálního rodu *Mastotermes* (Mastotermitidae) (Delattre et al., 2015) a *Constrictotermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) (Cristaldo et al., 2015). V této studii byl prokázán třetí příklad vibroakustické odezvy na poplašné chemické látky, zvýšením pohybové aktivity vojáků i dělníků po vystavení hlavovým těkavým sloučeninám. Navíc jak bylo poukazováno Connétablem et al. (1999), je pravděpodobné že termiti šíří poplašné látky za použití komplexní vibrační komunikace založené na tremulaci a bubnování, přispívající ke všeobecným obraným aktivitám kolonie (například útěk od hrozby).

Tento článek je první komplexní prací o poplašné komunikaci druhu z čeledi Rhinotermitidae. Obě kasty (dělníci i vojáci) *R. flavipes* reagovaly na všechny druhy stimulací s různými stupni reakcí a vykazovaly různé vibrační pohyby. Tato pozorování prokazují různé komunikační strategie, které mohou spustit účinné reakce odpovídající povaze a síle patřičného stimulu. Navíc *R. flavipes* je považován za škůdce v západní USA (Evans, 2011; Evans et al., 2013) a byl rozšířen na několik míst po celém světě (Bagnères et al., 1990; Evans et al., 2013), kde se stal invazivním druhem (původně popsán jako *R. santonensis* a později synonymizován Austinem et al., 2015), a proto má pochopení jeho komunikace a chování celkově ještě větší význam. Dominance *R. flavipes* nad *R. grassei*,



která již byla zdokumentována v terénu (Perdereau et al., 2011) a může být způsobena (alespoň částečně) jeho sofistikovanou poplašnou komunikační strategií.

## 5) Závěr a doporučení pro praxi

V části jedna se zcela jednoznačně podařilo popsat novou žlázu termitů, která se v jistých vlastnostech, především velikostí žlázy, vymyká od ostatních žláz. Bohužel vzhledem k umístění a také velikosti je se současnou technologií nemožné zjistit její složení nebo její funkci, o které můžeme pouze spekulovat. Jelikož se bude pravděpodobně jednat o žlázu se všeobecným použitím (spojenou s běžnou činností termitů), pro vysvětlení její funkce by pomohlo nalezení druhu/skupiny termitů, který ji postrádá, pokud tedy takový existuje. Provedené pozorování na vybraných druzích naznačuje široké rozšíření žlázy mezi všemi termity, které je však nutno potvrdit na širším spektru druhů a kast.

V části dvě a tři bylo jednoznačně potvrzeno, že labrální žláza je přítomna u všech druhů a kast termitů. Což také naznačuje, že funkce žlázy bude mít všeobecnou funkci nutnou pro přežití termití kolonie, což je podpořeno i její přítomností u dřevožravého švába *C. punctulatus*. Dále byla vyvrácena domněnka že funkce žlázy je obranná. Vzhledem k její struktuře a ultrastruktuře se jeví jako jedinná možnost funkce komunikační. Tato domněnka je podpořena tím, že bylo pozorováno klepání vojáků labrem o podložku při setkání s „nepřátelským“ jedincem. Pravděpodobně se bude jednat o vylučování poplašného feromonu, ale pro potvrzení této domněnky, je zapotřebí behaviorálních pokusů.

V části čtyři bylo prokázáno, že vojáci a dělníci *R. flavipes* rozdílně reagují na různé simulace nebezpečí a také že vypuštění poplašného feromonu zvyšuje vibroakustickou komunikaci. Jedná se teprve o třetí publikaci u termitů a první u čeledi Rhinotermitidae, kdy to bylo prokázáno. *R. flavipes* je invazivním druhem a významným škůdcem a komplexní pochopení jeho poplašné komunikace by mohlo vést k potlačení nebo celkovému zabránění škod, které působí.

Ačkoli jsou termity nepostradatelnou a všudypřítomnou složkou tropických ekosystémů, stále dochází k objevům a prvním popisům zcela nových rodů (Scheffrahn et al., 2018), unikátních příkladů polyethismu (Šobotník et al., 2012) nebo rodičovské manipulace (Maekawa et al., 2012). Výše uvedené příklady přinášejí nové a důležité poznatky, ale také ukazují, že stále o termitech a jejich chování víme jen velmi málo a i zcela základní výzkumy, mohou přinést důležité a překvapivé výsledky. Když vezmeme v potaz mizení rostlinných druhů a porostů celkově, a to především v tropických oblastech (Ledford, 2019; Gomez et al, 2019), skoro jistě dochází i ke ztrátě stále nepopsaných druhů těchto unikátních živočichů. A pokud jim nebudeme věnovat dostatečnou pozornost,

můžeme ztratit šanci k pochopení fungování tropických ekosystému a možnosti jejich obnovy.

## 6) Seznam literatury a použitých literárních zdrojů

ABE, T. Studies on the distribution and ecological role of termites in a lowland rain forest of West Malaysia. Food and feeding habits of termites in Pasoh Forest Reserve. *Japanese Journal of Ecology*. 1979, vol. 29, s. 121-135.

AHMAD, M. The phylogeny of termite genera based on imago-worker mandibles. *Bulletin of American Museum of Natural History*. 1950, vol. 95, s. 40-86.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular biology of the cell: the endoplasmic reticulum, 4th edition*. New York: Garland Science, 2002. 1464 s. ISBN 0-8153-3218-1

ALI, D., W. The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary glands. *Journal of Experimental Biology*. 1997, vol. 200, s. 1941-1949.

ALI, D., W.; ORCHARD, I. Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in the ventral nerve cord of the stick insect, *Carausius morosus*, including neurons innervating the salivary glands. *Cell Tissue Research*. 1996, vol. 285, s. 453-462.

ALI, D., W.; ORCHARD, I.; LANGE, A., B. The aminergic control of locust (*Locusta migratoria*) salivary glands: evidence for serotonergic and dopaminergic innervation. *Journal of Insect Physiology*. 1993, vol. 39, s. 623-632.

ALIBERT, P., J. Innervation de l'appareil salivaire du termite *Kaloterme flavicollis* Fabr. Histologie et ultrastructure: relation des axones avec les cellules de la glande et du réservoir. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*. 1983, vol. 72, s. 133-162.

AMPION, M. Les glandes tergales des termites: étude comparative et signification évolutive. Thèse, Université de Dijon. 1980.

AMPION, M.; QUENNEDEY, A. The abdominal epidermal glands of termites and their phylogenetic significance. In: HOWSE, P., E.; CLÉMENT, J., L. (Eds): *Biosystematics of Social Insects*. London: Academic Press, 1981. S 249-261. ISBN 9780123571809

ARAUJO, R., L. Termites of the neotropical region. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F., M. (Eds): *Biology of termites, vol. II*. New York: Academic press, 1970. S. 527-576. ISBN 9780323144582

AUSTIN, J., W.; SZALANSKI, A., L.; CABRERA, B., J. Phylogenetic analysis of the subterranean termite family Rhinotermitidae (Isoptera) by using the mitochondrial cytochrome oxidase II gene. *Annals of the Entomological Society of America*. 2004, vol. 97, s. 548-555.

AUSTIN, J., W.; SZALANSKI, A., L.; SCHEFFRAHN, R., H.; MESSENGER, M., T.; DRONNET, S.; BAGNÈRES, A-G. Genetic evidence for the synonymy of two *Reticulitermes* species: *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes santonensis*. *Annals of the Entomological Society of America*. 2005, vol. 98, s. 395-401.

BACETI, B.; DALLAI, R. The spermatozoon of Arthropoda. XXX. The multiflagellate spermatozoon in the termite *Mastotermes darwiniensis*. *Journal of Cell Biology*. 1978, vol. 76, s. 569-576.

BACCHUS, S. New exocrine gland on the legs of some Rhinotermitidae (Isoptera). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 1979, vol. 8, s. 135-142.

BAGNÈRES, A-G.; CLÉMENT, J. L.; BLUM, M. S.; SEVERSON, R. F.; JOULIE, C.; LANGE, C. Cuticular hydrocarbons and defensive compounds of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *R. santonensis* (Feytaud): polymorphism and chemotaxonomy. *Journal of Chemical Ecology*. 1990, vol. 16, s. 3213-3244.

BARBOSA, J., R., C. *Sistema de castas de Serritermes serrifer* (Isoptera: Serritermitidae). M.Sc. thesis, Universidade de Brasilia, 2012, 33 pp.

BARBOSA, J., R.; CONSTANTINO, R. Polymorphism in the neotropical termite *Serritermes serrifer*. *Entomol Exp Appl*. 2017, vol. 163, s. 43-50.

BARTZ, S., H. Evolution of eusociality in termites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979, vol. 76, s. 5764-5768.

BERRIDGE, M., J.; OSCHMAN, J., L. *Transporting epithelia*. New York: Academic Press, 1972. 91 s. ISBN 0124541356

BIGNELL, D, E. The role of symbionts in the evolution of termites and their rise to ecological dominance in the tropics. In: HURST, C., J. (ed.). *The mechanistic benefits of microbial symbionts*. Advances in environmental microbiology. Springer: Dordrecht, 2016. S. 121-172. ISBN 978-3-319-28066-0

BIGNELL, D., E. Morphology, Physiology, Biochemistry and Functional Design of the Termite Gut: An Evolutionary Wonderland. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds): *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Dordrecht: Springer, 2011. S. 375-412. ISBN 978-90-481-3976-7

BIGNELL, D., E.; EGGLETON, P. Termites in ecosystems. In: ABE, T.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M. (eds.). *Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2000. s. 363-387. ISBN 978-90-481-5476-0

BILLEN, J. Diversity and morphology of exocrine glands in ants. *Proceedings of the 19th Symposium of the Brazilian Myrmecological Society, Ouro Preto (Brasil)*. 2009, s. 1-6.

BILLEN, J.; JOYE, L.; LEUTHOLD, R., H. Fine structure of the labial gland in *Macrotermes bellicosus* (Isoptera, Termitidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*. 1989, vol. 70, s. 37-45.

BILLEN, J.; ŠOBOTNÍK, J. Insect exocrine glands. *Arthropod structure & development*. 2015, vol. 44. DOI 10.1016/j.asd.2015.08.010.

BORDEREAU, C.; CANCELLO, E., M.; SÉMON, E.; COURRENT, A.; QUENNEDEY, B. Sex pheromone identified after Solid Phase Microextraction from tergal glands of female alates in *Cornitermes bequaerti* (Isoptera, Nasutitermitidae). *Insectes Sociaux*. 2002, vol. 49, s. 209-215.

BORDEREAU, C.; PASTEELS, J., M. Pheromones and chemical ecology of dispersal and foraging in termites. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds): *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer, Dordrecht, 2011. S. 279-320. ISBN 978-9048139767

BORDEREAU, C.; ROBERT, A.; VAN TUYEN, V.; PEPPUY, A. Suicidal defensive behaviour by frontal gland dehiscence in *Globitermes sulphureus* Haviland soldiers (Isoptera). *Insectes Sociaux*. 1997, vol. 44, s. 289-297.

BOURGUIGNON, T.; LO, N.; ŠOBOTNÍK, J.; SILLAM-DUSSÈS, D.; ROISIN, Y.; EVANS, T. Oceanic dispersal, vicariance and human introduction shaped the modern distribution of the termites *Reticulitermes*, *Heterotermes* and *Coptotermes*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016, vol. 283. DOI 10.1098/rspb.2016.0179.

BOURGUIGNON, T.; LO, N.; ŠOBOTNÍK, J.; HO, S. Y. W.; IQBAL, N.; COISSAC, É.; LEE, M.; JENDRYKA, M.; SILLAM-DUSSÈS, D.; KRIZKOVA, B.; ROISIN, Y.; EVANS, T. Mitochondrial Phylogenomics Resolves the Global Spread of Higher Termites, Ecosystem Engineers of the Tropics. *Molecular biology and evolution*. 2017, vol. 34, s. 589-597.

BOURGUIGNON, T.; ROISIN, Y. Revision of the termite family Rhinotermitidae (Isoptera) in New Guinea. *ZooKeys*. 2011, vol. 148, s. 55-103.

BOURGUIGNON, T.; SOBOTNIK, J.; HANUS, R.; ROISIN, Y. Developmental pathways of *Glossotermes oculus* (Isoptera, Serritermitidae): at the cross-roads of worker caste evolution in termites. *Evolution & Development*. 2009, vol. 11, s. 659-668.

BOURGUIGNON, T.; ŠOBOTNÍK, J.; DAHLSÖ, C.; ROISIN, Y. The soldierless Apicotermatinae: insights into a poorly known and ecologically dominant tropical taxon. *Insectes Sociaux*. 2015, vol 62, s. 383-524.

BOURGUIGNON, T.; ŠOBOTNÍK, J.; SILLAM-DUSSÈS, D.; JIROŠ, P.; HANUS, R.; ROISIN, Y.; MIURA, T. Developmental Pathways of *Psammotermes hybostoma* (Isoptera: Rhinotermitidae): Old Pseudergates Make up a New Sterile Caste. *PLoS one*. 2012, Vol. 7. e44527. DOI 10.1371/journal.pone.0044527.

BOURGUIGNON, T.; ŠOBOZNÍK, J.; LEPOINT, G.; MARTIN, M.; HARDY, O., J.; DEJEAN, A.; ROISIN, Y: Feeding ecology and phylogenetic structure of a complex neotropical termite assemblage, revealed by nitrogen stable isotope ratios. *Ecological Entomology*. 2011, vol. 36, s. 261-269.

BREZNAK, J., A.; BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology*. 1994, vol. 39, s. 453-487.

BROSSUT, R. Evolution du système glandulaire exocrine céphalique des Blattaria et des Isoptera. *International Journal of Insect Morphology & Embryology*. 1973, vol. 2, s. 35-54.

BRUNE, A. Symbionts aiding digestion. In: Cardé R.T. & Resh V.H. (Eds): *Encyclopedia of insects, 2nd edition*. New York: Academic Press, 2009. S. 978-983. ISBN 9780123741448

BUCHLI, H., H., R. L'origine des castes et les potentialités ontogénétiques des termites européens du genre *Reticulitermes* Holmgren. *Annales des Sciences Naturelles - Zoologie et Biologie Animale*. 1958, vol. 20, s. 263-429.

CAMERON, S., L.; LO, N.; BOURGUIGNON, T.; SVENSON, G., J.; EVANS, T., A. A mitochondrial genome phylogeny of termites (Blattodea: Termitidae): robust support for interfamilial relationships and molecular synapomorphies define major clades. *Molecular Phylogenetics & Evolution*. 2012, vol. 65, s. 163-173.

CASSIER, P.; FAIN-MAUREL, M., A.; LEBRUN, D. Electron microscopic study of the mandibular glands of *Kaloterms flavicollis* Fabr. (Isoptera, Calotermitidae). *Cell Tissue Research*. 1977, vol. 182, s. 327-339.

CLÉMENT, J., L. Écologie des *Reticulitermes* (Holmgren) français (Isopteres). Position systématique des populations. *Bulletin de la Société Zoologique de France*. 1977, vol. 102, s. 169-185.

CLEVELAND, L. R.; HALL, S. R.; SANDERS, E. P.; COLLIER, J. The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its protozoa, and the symbiosis between protozoa and roach. *Memoirs of the American Academy of Arts and Science*. 1934, vol. 17, s. 185-342.

CONNÉTABLE, S.; ROBERT, A.; BOUFFAULT, F.; BORDEREAU, C. Vibratory alarm signals in two sympatric higher termite species: *Pseudacanthotermes spiniger* and *P. militaris* (Termitidae, Macrotermitinae). *Journal of Insect Behavior*. 1999, vol. 12, s. 329-342.

CONSTANTINI, J.; CARRIJO, T.; PALMA ONETTO, V.; SCHEFFRAHN, R.; CARNOHAN, L.; ŠOBOTNÍK, J.; CANCELLO, E. *Tonsuritermes*, a new soldierless termite genus and two

new species from South America (Blattaria: Isoptera: Termitidae: Apicotermitinae). *Zootaxa*. 2018, vol. 4531, s. 383.

CONSTANTINO, R.; COSTA-LEONARDO, A., M. A new species of *Constrictotermes* from Central Brazil with notes on the mandibular glands of workers (Isoptera; Termitidae: Nasutitermitinae). *Sociobiology*. 1997, vol. 30, s. 213-223.

COSTA-LEONARDO, A., M. A new interpretation of the defense glands of Neotropical *Ruptitermes* (Isoptera, Termitidae, Apicotermitinae). *Sociobiology*. 2004, vol. 44, s. 391-401.

COSTA-LEONARDO, A., M. Secretion of salivary glands of the Brazilian termite *Serritermes serrifer* Hagen and Bates (Isoptera: Serritermitidae). *Annales de la Societe Entomologique de France*. 1997, vol. 33, s. 29-37.

COSTA-LEONARDO, A., M. The leg exocrine system in *Serritermes serrifer* (Hagen, 1858), phylogenetic implications (Isoptera: Serritermitidae). *Insectes Sociaux*. 1994, vol. 41, s. 111-114.

COSTA-LEONARDO, A., M.; BARSOTTI, R., C. Soldier head morphology of the Neotropical termites: *Embiratermes festivellus* Silvestri and *Spinitermes brevicornutus* (Desneux) (Isoptera, Termitidae). *Revista Brasileira de Zoologia*. 1996, vol. 13, s. 321-330.

COSTA-LEONARDO, A., M.; HAIFIG, I. MRT letter: A novel tegumental gland in female imagoes of the neotropical termite *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae, Syntermitinae). *Microscopy Research & Techniques*. 2010, vol. 73, s. 1005-1008.

COSTA-LEONARDO, A., M.; KITAYAMA, K. Frontal gland dehiscence in the Brazilian termite *Serritermes serrifer* (Isoptera: Serritermitidae). *Sociobiology*. 1991, vol. 19, s. 333-338.

COSTA-LEONARDO, A., M.; PATRICIO, G., B. Structure of the spermatheca in five families of Isoptera. *Sociobiology*. 2005, vol. 45, s. 659-670.

COSTA-LEONARDO, A., M.; SHIELDS, K., S. Morphology of the mandibular glands in workers of *Constrictotermes cyphergaster* (Silvestri) (Isoptera: Termitidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 1990, vol. 19, s. 61-64.

COSTA-LEONARDO, A.; JANEI, V.; LARANJO, L.; HAIFIG, I. Location, morphology and function of nephrocytes in termites. *Arthropod structure & development*. 2015a, vol. 44., s. 346-354.

COSTA-LEONARDO, A.; SOARES, H. X.; HAIFIG, I.; LARANJO, L. T. Tarsomere and distal tibial glands: Structure and potential roles in termites (Isoptera: Rhinotermitidae, Termitidae). *Arthropod Structure & Development*. 2015b, vol. 44, s. 426-432.



COSTA-LEONARDO, A.; M., HAIFIG, I. Termite communication during different behavioral activities. In WITZANI, G. (ed.) *Biocommunication of animals*. Dordrecht: Springer, 2014. S. 161-190. ISBN 9400774133

CRISTALDO, P.; JANDÁK, V.; KUTALOVÁ, K.; RODRIGUES, V.; B., BROTHÁNEK, M.; JIŘÍČEK, O.; DESOUZA, O.; ŠOBOTNÍK, J. The nature of alarm communication in *Constrictotermes cyphergaster* (Blattodea: Termitoidea: Termitidae). *Biology Open*. 2015, vol. 4, s. 1649-1659.

CZOLIJ, R., T.; SLAYTOR, M. Morphology of the salivary glands of *Mastotermes darwiniensis* Froggatt (Isoptera: Mastotermitidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology*. 1988, vol. 17, s. 207-220.

DAHLSÖ, C.; PARR, C.; MALHI, Y.; RAHMAN, H.; MEIR, P.; JONES, D. T.; EGGLETON, P. First comparison of quantitative estimates of termite biomass and abundance reveals strong intercontinental differences. *Journal of Tropical Ecology*. 2014, vol. 30, s. 143-152.

DAVIS, R.; BALDAUF, S.; MAYHEW, P. Eusociality and the success of the termites: insights from a supertree of dictyopteran families. *Journal of Evolutionary Biology*. 2009, vol. 22, s. 1950-1761.

DEHAL, P.; SATOU, Y.; CAMPBELL, R., K.; CHAPMAN, J.; DEGNAN, B.; DE TOMASO, A.; DAVIDSON, B.; DI GREGORIO, A.; GELPKE, M.; GOODSTEIN, D. M.; HARAFUJI, N.; HASTINGS, K. E.; HO, I.; HOTTA, K.; HUANG, W.; KAWASHIMA, T.; LEMAIRE, P.; MARTINEZ, D.; MEINERTZHAGEN, I. A.; NECULA, S.; NONAKA, M.; PUTNAM, N.; RASH, S.; SAIGA, H.; SATAKE, M.; TERRY, A.; YAMADA, L.; WANG, H. G.; AWAZU, S.; AZUMI, K.; BOORE, J.; BRANNO, M.; CHIN-BOW, S.; DESANTIS, R.; DOYLE, S.; FRANCINO, P.; KEYS, D. N.; HAGA, S.; HAYASHI, H.; HINO, K.; IMAI, K. S.; INABA, K.; KANO, S.; KOBAYASHI, K.; KOBAYASHI, M.; LEE, B. I.; MAKABE, K. W.; MANOHAR, C.; MATASSI, G.; MEDINA, M.; MOCHIZUKI, Y.; MOUNT, S.; MORISHITA, T.; MIURA, S.; NAKAYAMA, A.; NISHIZAKA, S.; NOMOTO, H.; OHTA, F.; OISHI, K.; RIGOUTSOS, I.; SANO, M.; SASAKI, A.; SASAKURA, Y.; SHOGUCHI, E.; SHIN-I, T.; SPAGNUOLO, A.; STAINIER, D.; SUZUKI, M. M.; TASSY, O.; TAKATORI, N.; TOKUOKA, M.; YAGI, K.; YOSHIZAKI, F.; WADA, S.; ZHANG, C.; HYATT, P. D.; LARIMER, F.; DETTER, C.; DOGGETT, N.; GLAVINA, T.; HAWKINS, T.; RICHARDSON, P.; LUCAS, S.; KOHARA, Y.; LEVINE, M.; SATOH, N.; ROKHSAR, D. S. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science*. 2002, vol. 298, s. 2157.

DELATTRE, O.; SILLAM-DUSSÈS, D.; JANDÁK, V.; BROTHÁNEK, M.; RÜCKER, K.; BOURGUIGNON, T.; VYTISKOVÁ, B.; CVAČKA, J.; JIŘÍČEK, O.; ŠOBOTNÍK, J. Complex alarm

strategy in the most basal termite species. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 2015, vol. 69, s. 1945-1955.

DELIGNE, J. Description, développement et affinités de *Verrucositermes hirtus* sp. n. Fonction glandulaire des tubercules du soldat (Isoptères, Nasutitermitinae). *Revue de zoologie africaine*. 1983, vol. 97, s. 533-548.

DELIGNE, J.; QUENNEDEY, A.; BLUM, M. S. The enemies and defense mechanisms of termites. In: HERMANN, H. R. (Ed.): *Social insects, vol. II*. Academic Press, New York, 1981. S. 1-76. ISBN 978-0-12-342202-6

DONOVAN, S., E.; EGGLETON, P.; BIGNELL, D., E. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. *Ecological Entomology*. 2001, vol. 26, s. 356-366.

DONOVAN, S., E.; JONES, D., T.; SANDS, W., A.; EGGLETON P. Morphological phylogenetics of termites (Isoptera). *Biological Journal of the Linnean Society*. 2000, vol. 70, s. 467-513.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K., E., L. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Applied Environmental Microbiology*. 1996, vol. 62, s. 1151-1158.

EGGLETON, P. An Introduction to Termites: Biology, Taxonomy and Functional Morphology. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds): *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer, Dordrecht, 2011. S. 1-26. ISBN 978-9048139767

EGGLETON, P. Global Patterns of Termite Diversity. In: ABE, T.; BIGNELL, D., E.; HIGASHI, M. (Eds.): *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. S. pp. 25-51. ISBN 978-90-481-5476-0

EGGLETON, P.; BIGNELL, D., E.; SANDS, W., A.; MAWDSLEY, N., A.; LAWTON, J., H.; WOOD, T., G.; BIGNELL, N., C. The diversity, abundance and biomass of termites under differing levels of disturbance in the Mbalmayo Forest Reserve, southern Cameroon. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*. 1996, vol. 351, s. 51-68.

EMERSON, A., E. Geographical origin and dispersions of termite genera. *Fieldiana, Zoology*. 1955, vol. 37, s. 465-521.

EMERSON, A., E.; KRISHNA, K. The termite family Serritermitidae (Isoptera). *American Museum Novitates*. 1975, vol. 2570, s. 1-31.

ENGEL, M., S.; GRIMALDI, D., A.; KRISHNA, K. Termites (Isoptera): Their Phylogeny, Classification, and Rise to Ecological Dominance. *American Museum Novitates*. 2009, no. 3650, s. 1.

EVANS, T., A. Invasive termites. In: BIGNELL, D., E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds): *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Dordrecht : Springer, 2011. S. 519-562. ISBN 978-90-481-3976-7

EVANS, T., A.; DAWES, T., Z.; WARD, P., R.; LO, N. Ants and termites increase crop yield in a dry climate. *Nature Communications*. 2011, vol. 2, s. 1257.

EVANS, T., A.; FORSCHLER, B., T.; GRACE, J., K. Biology of invasive termites: a worldwide review. *Annual Review of Entomology*. 2013, vol. 58, s. 455-474.

FITTKAU, E., J.; KLINGE, H. On biomass and trophic structure of the Central Amazonian rain forest ecosystem. *Biotropica*. 1973, vol. 5, s. 2-14.

FOUGEYROLLAS, R.; DOLEJŠOVÁ, K.; SILLAM-DUSSÈS, D.; ROY, V.; POTEAUX, C.; HANUS, R.; ROISIN, Y. Asexual queen succession in the higher termite *Embiratermes neotenicus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015, vol 282. DOI 10.1098/rspb.2015.0260.

FOX-DOBBS, K.; DOAK, D., F.; BRODY, A., K.; PALMER, T., M. Termites create spatial structure and govern ecosystem function by affecting nitrogen fixation in an East African savanna. *Ecology*. 2010, vol. 91, s. 1296-1307.

FREUDENBERG, K.; NASH, A., C. (eds) *Constitution and Biosynthesis of Lignin*. Berlin: Springer-Verlag, 1968. 132 s. ISBN 3540042741

FUNARO, C., F.; BÖRÖCZKY, K.; VARGO, E., L.; SCHAL, C. Identification of a queen and king recognition pheromone in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2018, vol. 115, s. 3888-3893.

GAY, F., J. Species introduced by man. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F., M. (Eds.): *Biology of Termites, vol. I*. New York: Academic Press, 1969, s. 459-494. ISBN 9780323144582

GIRARD, C.; JOUANIN, L. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1999, vol. 29, s. 1129-1142.

GOMES, V., H., F.; VIEIRA, I., C., G.; SALOMAO, R., P.; TER STEEGE, H. Amazonian tree species threatened by deforestation and climate change. *Nature climate change*. 2019, vol. 9, s. 547-553.

GONZALVES, T., T.; DESOUZA, O.; BILLEN, J. A novel exocrine structure of the bicellular unit type in the thorax of termites. *Acta Zoologica Stockholm*. 2010, vol. 91, s. 193-198.

GRASSÉ, P., P. *Termitologia, vol. III*. Paris: Masson, 1986. 715 s. ISBN 2-225-75427-

GRASSÉ, P., P. *Termitologia. Vol. I: Anatomie Physiologie Reproduction*. Paris: Masson, 1982. 676 s. ISBN 978-2225754272

GREENBERG, S., L.; PLAVCAN, K., A. Morphology and chemistry of the mandibular gland complex in the primitive termite *Zootermopsis angusticollis* (Hagen) (Isoptera: Hodotermitidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 1986, vol. 15, s. 283-292.

GRUBE, S.; RUDOLPH, D. The labial gland reservoirs (water sacs) in *Reticulitermes santonensis* (Isoptera: Rhinotermitidae): Studies of the functional aspects during microclimatic moisture regulation and individual water balance. *Sociobiology*. 1999, vol. 33, s. 307-323.

GRUBE, S.; RUDOLPH, D.; ZERBST-BOROFFKA, I. Morphology, fine structure, and functional aspects of the labial gland reservoirs of the subterranean termite *Reticulitermes santonensis* de Feytaud (Isoptera: Rhinotermitidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. 1997, vol. 26, s. 49-53.

HAGER, F., A.; KIRCHNER, W., H. Vibrational long-distance communication in the termites *Macrotermes natalensis* and *Odontotermes* sp. *Journal of Experimental Biology*. 2013, vol. 216, s. 3249-3256.

HAND, A., R.; OLIVER, C. The role of GERL in the secretory process. In CANTIN, M. (ed.) *Cell biology of the secretory process*. Basel: Karger Publishers, 1984. S. 148-170. ISBN 9783318044034

HARW, L. Termite phylogeny as evidenced by soldier mandible development. *Annals of the Entomological Society of America*. 1937, vol. 37, s. 459-486.

HERTEL, H.; HANSPACH, A.; PLARRE, R. Differences in alarm responses in drywood and subterranean termites (Isoptera: Kalotermitidae and Rhinotermitidae) to physical stimuli. *Journal of Insect Behavior*. 2011, vol. 24, s. 106–115.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E., O. *"The Ants"*. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press, 1990. 746 s. ISBN: 3540520929

HOLT, J., A.; LEPAGE, M. Termites and soil properties. In: ABE, T.; BIGNELL, D., E.; HIGASHI, M. (Eds.): *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. S. pp. 389-407. ISBN 978-90-481-5476-0

HONGO, Y.; DEEVONG, P.; INOUE, T.; MORIYA, S.; TRAKULNALEAMSAI, S.; OHKUMA, M.; VONGKALUANG, C.; NOPARATNARAPORN, N.; KUDO, T. Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite host. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71, s. 6590-6599.

HONGO, Y.; EKPORNPRASIT, L.; INOUE, T.; MORIYA, S.; TRAKULNALEAMSAI, S.; OHKUMA, M.; NOPARATNARAPORN N.; KUDO, T. Intracolony variation of bacterial gut microbiota among castes and ages in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus*. *Molecular Ecology*. 2006, vol. 15, s, 505-516.

HONGO, Y.; OHKUMA, M.; KUDO, T. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiology Ecology*. 2003, vol. 44, s. 231-242.

HOWARD, R., W.; BLOMQUIST, G., J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*. 2005, vol. 50, s. 371-393.

HOWARD, R., W.; BLOMQUIST, G., J. Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*. 1982, vol. 27, s. 149-172.

HOWARD, R.; MATSUMURA, F.; COPPEL, H., C. Trail-following pheromones of the Rhinotermitidae: Approaches to their authentication and specificity. *Journal of Chemical Ecology*. 1976, vol. 2, s. 147-166.

HOWSE, P., E. On the significance of certain oscillatory movements of termites. *Insectes Sociaux*. 1965, vol. 12, s. 335-346.

HOWSE, P., E. Sociochemicals of termites. In BELL, W., J.; CARDÉ, R., T. (Eds.). *Chemical ecology of insects*. London, UK:Chapman and Hall, 1984. S. 475-519. ISBN 9781498769402

HUANG, G.; GAO, B.; MAIER, T.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R., S. A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne inkognita*. *Plant Pathology and Microbiology Publications*. 2003, vol. 16, s. 376-381.

CHAPMAN, R., F. Structure of digestive system. In: KERKUT, G., A.; GILBERT, L., I. (eds): *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology, Volume 4: Regulation: Digestion, nutrition, excretion*. Pergamon press, Oxford UK, 2013. S. 165-205. ISBN 0-08-030805-8

CHE, Y.; WANG, D.; SHI, Y.; DU, X.; ZHAO, Y.; LO, N.; ZONGQING, W. A global molecular phylogeny and timescale of evolution for *Cryptocercus* woodroaches. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2016, vol. 98, s. 201-209.

CHOE, J., C.; CRESPI, B., J. *The evolution of social behavior in insects and arachnids*. New York : Cambridge University Press, 1997. 537 s. ISBN 0-521-58977-0.

CHOUVENC, T.; LI, H-F.; AUSTIN, J.; BORDEREAU, C.; BOURGUIGNON, T.; CAMERON, S.; CANCELLO, E.; CONSTANTINO, R.; COSTA-LEONARDO, A.; EGGLETON, P.; EVANS, T.; FORSCHLER, B.; GRACE, J.; HUSSENER, C.; KŘEČEK, J.; LEE, C-Y.; LEE, T.; LO,

N.; MESSENGER, M.; SU, N. Revisiting *Coptotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae): A global taxonomic road map for species validity and distribution of an economically important subterranean termite genus. *Systematic Entomology*. 2016, vol. 41, s. 299-306.

CHUAH, C., H.; GOH, S.; THO, Y. Chemical defense secretions of some species of Malaysian Rhinotermitidae (Isoptera, Rhinotermitidae). *Journal of chemical ecology*. 1990, vol. 16, s. 685-692.

Inoue, J., I.; Noda, S.; Hongoh, Y.; Ui, S.; Ohkuma, M. Identification of endosymbiotic methanogen and ectosymbiotic spirochetes of gut protists of the termite *Coptotermes formosanus*. *Microbes and Environments*. 2008, vol. 23, s. 94-97.

Inoue, T.; Kitade, O.; Yoshimura, T.; Yamaoka, I. Symbiotic associations with protists. In: ABE, T.; BIGNELL, D., E.; HIGASHI, M. (Eds.): *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. S. 275-288. ISBN 978-90-481-5476-0

INWARD, D., J., G.; VOGLER, A., P.; EGGLETON, P. Death of an order: A comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology Letters*. 2007, vol. 3, s. 331-335.

JOUQUET, P.; DAUBER, J.; LAGERLÖF, J.; LAVELLE, P.; LEPAGE M. Soil invertebrates as ecosystem engineers: Intended and accidental effects on soil and feedback loops. *Applied soil ecology*. 2006, vol. 32, s. 153-164.

KAIB, M. Intra- and interspecific chemical signals in the termite *Schedorhinotermes*-production sites, chemistry, and behaviour. In: GRIBAKIN, F., G.; WIESE, K.; POPOV, A., V. (eds) *Sensory systems and communication in arthropods*. Basel: Birkhauser, 1990. S. 26-32.

KAIB, M.; ZIESMANN, J. The labial gland in termite *Schedorhinotermes lamanianus* (Isoptera: Rhinotermitidae): Morphology and function during communal food exploitation. *Insectes Sociaux*. 1992, vol. 39, s. 373-384.

KAMBHAMPATI, S.; EGGLETON, P. Taxonomy and phylogeny of termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D., E.; HIGASHI, M.; (Eds): *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2000. S. 1-23. ISBN 978-90-481-5476-0

KAMBHAMPATI, S.; KJER, K.,M.; THORNE, B., L. Phylogenetic relationship among termite families based on DNA sequence of mitochondrial 16s ribosomal RNA gene. *Insect Molecular Biology*. 1996, vol. 5, s. 229-238.

KETTLER, R.; LEUTHOLD, R., H. Inter- and intraspecific alarm response in the termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). *Insectes Sociaux*. 1995, vol. 42, s. 145-156.

KIRCHNER, W., H.; BROECKER, I.; TAUTZ, J. Vibrational alarm communication in the damp-wood termite *Zootermopsis nevadensis*. *Physiological Entomology*. 1994, vol. 19, s. 187-190

KORB, J. Regulation of sexual development in the basal termite *Cryptotermes secundus*: Mutilation, pheromonal manipulation or honest signal? *Die Naturwissenschaften*. 2005, vol. 92, s. 45-49.

KORB, J.; HARTFELDER, K. Life history and development - a framework for understanding developmental plasticity in lower termites. *Biology Reviews*. 2008, vol. 83, s. 295-313.

KRISHNA, K. A generic revision and phylogenetic study of the family Kalotermitidae (Isoptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1961, vol. 122, s. 303-408.

KRISHNA, K. Taxonomy, phylogeny, and distribution of termites. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F., M. (Eds): *Biology of termites, vol. II*. New York: Academic press, 1970. S. 127-152. ISBN 9780323144582

KRISHNA, K.; ARAUJO, R., L. A revision of the neotropical termite genus *Neocapritermes* (Isoptera, Termitidae, Termitinae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1968, vol. 138, s. 83-130.

KRISHNA, K.; GRIMALDI, D., A.; KRISHNA, V.; ENGEL, M., S. Treatise on the Isoptera of the World. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2013, vol. 377, s. 1-2704.

KRISTON, M., I.; WATSON, J., A., L.; EISNER, T. Non-combative behaviour of large soldiers of *Nasutitermes exitiosus* (Hill): an analytical study. *Insectes Sociaux*. 1977, vol. 24, s. 103-111.

KŘÍSTEK, J.; URBAN, J. *Lesnická entomologie*. Vyd. 2., upr. Praha: Academia, 2013. 445 s. ISBN 978-80-200-2237-0

KŘÍŽKOVÁ, B.; BOURGUIGNON, T.; VYTISKOVÁ, B.; ŠOBOTNÍK, J. The clypeal gland: a new exocrine gland in termite imagoes (Isoptera: Serritermitidae, Rhinotermitidae, Termitidae). *Arthropod Structure & Development*. 2014, vol. 43, s. 537-542.

KUTALOVÁ, K.; BOURGUIGNON, T.; SILLAM-DUSSÈS, D.; HANUS, R.; ROISIN, Y.; & ŠOBOTNÍK, J. Armed reproductives: Evolution of the frontal gland in imagoes of Termitidae. *Arthropod structure & development*. 2013, vol. 42, s. 339-348.

KUTALOVÁ, K.; HANUS, R.; BOURGUIGNON, T.; ROISIN, Y.; ŠOBOTNÍK, J. Armed reproductives: Evolution of the frontal gland in imagoes of Termitidae. *Arthropod Structure & Development*. 2013, vol. 42, s. 339-348.

KYJAKOVÁ, P.; DOLEJŠOVÁ, K.; KRASULOVÁ, J.; BEDNÁROVÁ, L.; HADRAVOVÁ, R.; POHL, R.; HANUS, R. The evolution of symmetrical snapping in termite soldiers need not lead to reduced chemical defence. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2015, vol. 115, s. 818-825.

LACY, R. C. The evolution of eusociality in termites: a haplodiploid analogy? *American Naturalist*. 1980, vol. 116, s. 449-51.

LADUGUIE, N.; ROBERT, A.; BONNARD, O.; VIEAU, F.; LE QUERE, J.-L.; SEMON, E.; BORDEREAU, C. Isolation and identification of (3Z, 6Z, 8E)-3, 6, 8-dodecatrien-1-ol in *Reticulitermes santonensis* Feytaud (Isoptera, Rhinotermitidae): Roles in worker trail-following and alate sex-attraction behavior. *Journal of Insect Physiology*. 1994, vol. 40, s. 781-787.

LAMBINET, F. La glande mandibulaire du Termite a cou jaune (*Calotermes flavicollis*). *Insectes Sociaux*. 1959, vol. 6, s. 165-177.

LEDFORD, H. Global plant extinctions mapped. *Nature*. 2019, vol. 570, s. 148-149.

LEFEUVE, P.; BORDEREAU, C. Soldier formation regulated by a primer pheromone from the soldier frontal gland in a higher termite *Nasutitermes lujae*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA, Biological Sciences*. 1984, vol. 81, s. 7665-8.

LEGENDRE, F.; WHITING, M., F.; BORDEREAU, C.; CANCELLO, E., M.; EVANS, T., A.; GRANDCOLAS, P. The phylogeny of termites (Dictyoptera: Isoptera) based on mitochondrial and nuclear markers: Implications for the evolution of the worker and pseudergate castes, and foraging behaviors. *Molecular Phylogenetics & Evolution*. 2008, vol. 48, s. 615-627.

LEIS, M.; SBRENNNA, G. Epidermal glands and integument of different castes of *Kalotermes flavicollis* (Isoptera, Calotermitidae). A comparative study. *Redia*. 1983, vol. 66, s. 215-225.

LO, N.; ENGEL, M., S.; CAMERON, S.; NALEPA, C. A.; TOKUDA, G.; GRIMALDI, D.; KITADE, O.; KRISHNA, K.; KLASS, K., D.; MAEKAWA, K.; MIURA, T.; THOMPSON, G., J. Save Isoptera: A comment on Inward et al. *Biology Letters*. 2007, vol. 3, s. 562-563.

Lo, N.; Tokuda, G.; Watanabe, H.; Rose, H.; Slaytor, M.; Maekawa, K.; Bandi, C.; Noda, H.; Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. *Current Biology*. 2000, vol. 10, s. 801-804.

LÜSCHER, M. Social control of polymorphism in termites. In: KENNEDY, J., S. (Ed.), *Insect polymorphism*. London: Royal Entomological Society of London, 1961. S. 57-67. ISBN 9780900848926



MAEKAWA, K.; NAKAMURA, S.; WATANABE, D. Termite Soldier Differentiation in Incipient Colonies Is Related to Parental Proctodeal Trophallactic Behavior. *Zoological Science*. 2012, vol. 29, s. 213-217.

MAISTRELLO, L.; SBRENNNA, G. Behavioural differences between male and female replacement reproductives in *Kaloterme flavicollis* (Isoptera, Kalotermitidae). *Insectes Sociaux*. 1999, vol. 46, s. 186-191.

MAITI, P., K. A taxonomic monograph on the world species of termites of the family Rhinotermitidae (Isoptera: Insecta). *Memoirs of the Zoological Survey of India*. 2006, vol. 20, s. 1-272.

MARTIUS, C. Diversity and ecology of termites in Amazonian forests. *Pedobiologia*. 1994, vol. 38, s. 407-428.

MATSUURA, K. Evolution of the asexual queen succession system and its underlying mechanisms in termites. *The Journal of Experimental Biology*. 2017, vol. 220, s.63-72.

MATSUURA, K.; HIMURO, C.; YOKOI, T.; YAMAMOTO, Y.; VARGO, E., L.; KELLER, L. Identification of a pheromone regulating caste differentiation in termites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2010, vol. 107, s. 12963-12968.

MCDOWELL, P., G.; OLOO, G., W. Isolation, identification, and biological activity of trail-following pheromone of termite *Trinervitermes bettonianus* (Sjöstedt) (Termitidae: Nasutitermitinae). *Journal of Chemical Ecology*. 1984, vol. 10, s. 835-851.

MCMAHAN, E. A. Feeding relationships and radioactive techniques. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F., M. (Eds.): *Biology of Termites, vol. I*. New York: Academic Press, 1969, s. 387-406. ISBN 9780323144582

MILL, A., E. Exploding termites - an unusual defensive behaviour. *Entomologist's Monthly Magazine*. 1984, vol. 120, s. 179-183.

MITAKA, Y.; MORI, N.; MATSUURA, K. Multi-functional roles of a soldier-specific volatile as a worker arrestant, primer pheromone and an antimicrobial agent in a termite. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2017, vol. 284, s. 20171134.

MITCHELL, J., D. Termites as pests of crops, forestry, rangeland and structures in southern Africa and their control. *Sociobiology*. 2002, vol. 40, s. 47-69

MIURA, T.; MAEKAWA, K.; KITADE, O.; ABE, T.; MATSUMOTO T. Phylogenetic relationships among subfamilies in higher termites (Isoptera: Termitidae) based on mitochondrial COII gene sequences. *Annals of the Entomological Society of America*. 1998, vol. 91, s. 515-523.

MOORE, B., P. Isolation of the scent-trail pheromone of an Australian termite. *Nature*. 1966, vol. 211, s. 746-747.

MYLES T. G. Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution. *Sociobiology*. 1999, vol. 33, s. 1-91.

NAKAJIMA, T. Cytochrome P450 isoforms and the metabolism of volatile hydrocarbons of low relative molecular mass. *Journal of Occupational Health*. 1997, vol. 39, s. 83-91.

NALEPA, C., A. Nourishment and the origin of termite eusociality. In: HUNT, J., H.; NALEPA, C., A. (Eds): *Nourishment and Evolution in Insect Societies*. Boulder: Westview press, 1994. s. 57-104. ISBN 0813384397

NALEPA, C., A.; BANDI, C. Characterizing the ancestors: paedomorphosis and termite evolution. In: ABE, T.; BIGNELL, D., E.; HIGASHI, M.; (Eds): *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2000. S. 53-75. ISBN 978-90-481-5476-0

NOIROT C, QUENNEDEY, A. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. *Annales de la Société entomologique de France*. 1991, vol. 27, s. 123-128.

NOIROT C.: The nests of termites. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F., M. (Eds): *Biology of termites, vol. II*. New York: Academic press, 1970. S. 73-125. ISBN 9780323144582

NOIROT, C. Formation of castes in the higher termites. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F., M. (Eds.): *Biology of Termites, vol. I*. New York: Academic Press, 1969. S. 311-350. ISBN 9780323144582

NOIROT, C. The gut of termites (Isoptera). Comparative anatomy, systematics, phylogeny. I. Lower termites. *Annales de la Société Entomologique de France*. 1995, vol. 31, s. 197-226.

NOIROT, C. The gut of termites (Isoptera). Comparative anatomy, systematics, phylogeny. II. higher termites (Termitidae). *Annales de la Societe Entomologique de France*. 2001, vol. 37, s. 431-471.

NOIROT, C.; NOIROT-TIMOTHÉE, C. The digestive system. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F., M. (Eds.): *Biology of Termites, vol. I*. New York: Academic Press, 1969, s. 49-88. ISBN 9780323144582

NOIROT, C.; PASTEELS, J., M. Ontogenetic development and evolution of the worker caste in termites. *Experientia*. 1987, vol. 43, s. 851-860.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. *Annual Review of Entomology*. 1974, vol. 19, s. 61-80.

NOVOTNÝ, V.; BASSET, Y.; MILLER, S., E.; WEIBLEN, G., D.; BREMER, B.; ČÍŽEK, L.; DROZD, P. Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. *Nature*. 2002, vol. 416, s. 841-844.

OHKUMA, M.; BRUNE, A. Diversity, Structure, and Evolution of the Termite Gut Microbial Community. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds): *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Dordrecht: Springer, 2011. S. 413-438. ISBN 978-9048139767

OHKUMA, M.; KUDO, T. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, vol. 62, s. 461-468.

OTANI, S.; MIKAELIAN, A.; NOBRE, T.; HANSEN, L., H.; KONE, N. A.; SORENSEN, S., J.; AANEN, D., K.; BOOMSMA J., J.; BRUNE, A.; POULSEN, M. Identifying the core microbial community in the gut of fungus-growing termites. *Molecular Ecology*. 2014, vol. 23, s. 4631-4644.

PALMA-ONETTO, V.; HOŠKOVÁ, K.; KRÍŽKOVÁ, B.; KREJČÍŘOVÁ, R.; PFLEGEROVÁ, J.; BUBENÍČKOVÁ, F.; PLARRE, R.; DAHLSJÖ, C., A., L.; SYNEK, J.; BOURGUIGNON, T.; SILLAM-DUSSÈS, D.; ŠOBOTNÍK, J. The labral gland in termite soldiers. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2018, vol. 123, s. 1-10.

PALMA-ONETTO, V.; PFLEGEROVÁ, J.; PLARRE, R.; SYNEK, J.; CVAČKA, J.; SILLAM-DUSSÈS, D.; ŠOBOTNÍK, J. The labral gland in termites: evolution and function. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2019, vol. 126, s. 587-597.

PARTON, A., H.; HOWSE, P., E.; BAKER, R.; CLÉMENT, J., L. (1981) Variation in the chemistry of the frontal gland secretion of European *Reticulitermes* species. In: HOWSE, P., E.; CLÉMENT, J., L. (eds) *Biosystematics of social insects*. London: Academic Press, 1981. S. 193-209. ISBN 9780123571809

PASTEELS, J., M.; BORDEREAU, C. Releaser pheromones in termites. In: VANDER MEER, R., K.; BREED, M., D.; ESPELIE, K., E.; WINSTON, M., L. (eds) *Pheromone communication in social insects*. Boulder: Westview Press, 1998. s. 193-215. ISBN 978-0813389769

PEARCE, M., J.; WAITE, B., S. A list of termite genera (Isoptera) with comments on taxonomic changes and regional distribution. *Sociobiology*. 1994, vol. 23, s. 247-263.

PERCY-CUNNINGHAM, J., E.; MACDONALD, J., A. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands. In PRESTCHICH, G., D.; BLOMQUIST, G., J., (eds). *Pheromone biochemistry*. London: Academic Press, 1987. s. 27-75.

PERDEREAU, E.; DEDEINE, F.; CHRISTIDÈS, J-P.; DUPONT, S.; BAGNÈRES, A-G. Competition between invasive and indigenous species: An insular case study of subterranean termites. *Biological Invasions*. 2011, vol. 13, s. 1457-1470.

PISKORSKI, R.; HANUS, R.; KALINOVA, B.; VALTEROVÁ, I.; KRECEK, J.; BOURGUIGNON, T.; ROISIN, Y.; ŠOBOTNÍK, J. Chemical composition of the frontal gland secretion in imagoes of the termite genus *Prorhinotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae): geographic and temporal variations. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2009, vol. 98, s. 384-392.

PISKORSKI, R.; HANUS, R.; VASÍCKOVÁ, S.; CVAČKA, J.; ŠOBOTNÍK, J.; SVATOS, A.; VALTEROVÁ, I. Nitroalkenes and Sesquiterpene Hydrocarbons from the Frontal Gland of Three *Prorhinotermes* Termite Species. *Journal of chemical ecology*. 2007, vol. 33, s. 1787-1794.

POIANI, S., B.; COSTA-LEONARDO, A., M. Dehiscent organs used for defensive behavior of kamikaze termites of the genus *Ruptitermes* (Termitidae, Apicotermitinae) are not glands. *Micron*. 2016, vol. 82, s. 63-73.

POLLOCK, D.; NORMARK, B. The life cycle of *Micromalthus debilis* LeConte (1878) (Coleoptera: Archostemata: Micromalthidae): Historical review and evolutionary perspective. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2002, vol. 40, s. 105 - 112.

PRESTWICH, G., D. Defense mechanisms of termites. *Annual Review of Entomology*. 1984, vol. 29, s. 201-232.

PRESTWICH, G., D.; COLLINS, M., S. Chemical defense secretions of the termite soldiers of *Acorhinotermes* and *Rhinotermes* (Isoptera, Rhinotermitinae): ketones, vinyl ketones, and b-ketoaldehydes derived from fatty acids. *Journal of Chemical Ecology*. 1982, vol. 8, s. 147-161.

QUENNEDEY A. Innervation de type neurosécréteur dans la glande sternale de *Kalotermes flavicollis* (Isoptera). Etude ultrastructurale. *Journal of Insect Physiology* . 1969, vol. 15, s. 1807-1814.

QUENNEDEY, A. Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis. In: HARRISON, F., W.; LOCKE, M., (eds) *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Insects*. Wiley-Liss; 1998. S. 177-107. ISBN 0471180092

QUENNEDEY, A. Morphology and ultrastructure of termite defence glands. In: HERMANN, H., R. (Ed.): *Defensive Mechanisms in Social Insects*. New York: Praeger, 1984, pp. 151-200. ISBN 9780030570025

QUENNEDEY, A. Morphology of exocrine glands producing pheromones and defensive substances in subsocial and social insects. In: Noirot, C.; Howse, P., E.; Le Masne, G. (Eds): *Pheromones and Defensive Secretions in Social Insects*. University of Dijon, 1975. S. 1-21. ISBN 9782901062011

QUENNEDEY, A.; PEPPUY, A.; COURRENT, A.; ROBERT, A.; EVERAERTS, C.; BORDEREAU, C. Ultrastructure of posterior sternal glands of *Macrotermes annandalei* (Silvestri); new members of the sexual glandular set found in termites (Insecta). *Journal of Morphology*. 2004, vol. 262, s. 683-691.

QUENNEDEY, A.; SILLAM-DUSÈSS, D.; ROBERT, A.; BORDEREAU, C. The fine structural organization of sternal glands of pseudergates and workers in termites (Isoptera): a comparative survey. *Arthropod Structure & Development*. 2008, vol. 37, s. 168-185.

RADEK, R.; NITSCH, G. Ectobiotic spirochetes of flagellates from the termite *Mastotermes darwiniensis*: attachment and cyst formation. *European Journal of Protistology*. 2007, vol. 43, s. 281-294.

RAINA, A.; MURPHY, C.; FLORANE, C.; WILLIAMS, K.; PARK, Y., I.; INGBER, B. Structure of spermatheca, sperm dynamics, and associated bacteria in Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 2007, vol. 100, s. 418-424.

REDFORD, K.; DOREA, J. G. The nutritional value of invertebrates with emphasis on ants and termites as food for mammals. *Journal of Zoology*. 1984, vol. 203, s. 385-395.

REINHARD, J.; CLÉMENT, J., L. Alarm reaction of European *Reticulitermes* termites to soldier head capsule volatiles (Isoptera, Rhinotermitidae). *Journal of Insect Behavior*. 2002, vol. 15, s. 95-107.

REINHARD, J.; HERTEL, H.; KAIB, M. Systematic search for food in the subterranean termite *Reticulitermes sanionensis* Feytaud (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux*. 1997, vol. 44, s. 147-158.

REINHARD, J.; KAIB, M. Interaction of pheromones during food exploitation by the termite *Schedorhinotermes lamanianus*. *Physiological Entomology*. 1995, vol. 20, s. 266-272.

REINHARD, J.; LACEY, M., J.; IBARRA, F.; SCHROEDER, F., C.; KAIB, M.; LENZ, M. Hydroquinone: a general phagostimulating pheromone in termites. *Journal of Chemical Ecology*. 2002, vol. 28, s. 1-14.

REINHARD, J.; QUINTANA, A.; SRENG, L.; CLÉMENT, J., L., A. Chemical signals inducing attraction and alarm in European *Reticulitermes* termites (Isoptera, Rhinotermitidae). *Sociobiology*. 2003, vol. 42, s. 675-691.

RÖHRIG, A.; KIRCHNER, W., H.; LEUTHOLD, R., H. Vibrational alarm communication in the African fungus-growing termite genus *Macrotermes* (Isoptera, Termitidae). *Insectes Sociaux*. 1999, vol. 46, s. 71-77.

ROISIN, Y. Diversity and evolution of caste patterns. In: ABE, T.; BIGNELL, D., E.; HIGASHI, M. (Eds.): *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. S. 95-119. ISBN 978-90-481-5476-0

ROISIN, Y. Intragroup conflicts and the evolution of sterile castes in termites. *American Naturalist*. 1994, vol. 143, s. 751-65.

ROISIN, Y. The caste system of *Parrhinotermes browni* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology*. 1988, vol. 14, s. 21-28.

ROISIN, Y.; EVERAERTS, C.; PASTEELS, J., M.; BONNARD, O. Caste-dependent reactions to soldier defensive secretion and chiral alarm/recruitment pheromone in *Nasutitermes princeps*. *Journal of Chemical Ecology*. 1990, vol. 16, s. 2865-2875.

ROISIN, Y.; KORB, J. Social Organisation and the Status of Workers in Termites. In: BIGNELL, D., E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds): *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Dordrecht : Springer, 2011. S. 133-164. ISBN 978-90-481-3976-7

ROONWAL, M., L. Field ecology and soldier polymorphism in the Indian sand termite, *Psammotermes rajasthanicus* (Rhinotermitidae, Psammotermestinae). *Indian Journal of Entomology*. 1988, vol. 47, s. 455-460.

ROONWAL, M., L.; BOSE, G.; VERMA, C., S. The Himalayan termite, *Archotermopsis wroughtoni* (synonyms *radcliffei* and *deodarae*). Identity, distribution and biology. *Records of Zoological Survey of India*. 1984, vol. 81, s. 315-338.

ROSENGAUS, R., B.; TRANIELLO, J., F.; BULMER, M., S. Ecology, Behavior and Evolution of Disease Resistance in Termites. In: BIGNELL, D., E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds): *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Dordrecht : Springer, 2011. S. 165-191. ISBN 978-90-481-3976-7

RUST, M., K.; SU, N., Y. Managing social insects of urban importance. *Annual Review of Entomology*. 2012, vol. 57, s. 355-375.

SANDS, W., A. Agonistic behavior of African soldierless Apicotermestinae (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology*. 1982, vol. 7, s. 61-72.

SANDS, W., A. *The identification of worker castes of termite genera from soils of Africa and the Middle East*. Wallingford: CAB International, 1998. 500 s. ISBN 0 85199 225 0

SANDS, W., A. The soldierless termites of Africa (Isoptera: Termitidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology (supplement)*. 1972, vol. 18, s. 1-244.

SANNASI, A. Morphology, histology and histochemistry of the frontal gland of soldier termite *Rhinotermes magnificus* Silvestri (Isoptera, Rhinotermitidae). *La Cellule*. 1969, vol. 67, s. 369-375.

SEID, M., A.; SCHEFFRAHN, R., H.; NIVEN, J., E.: The rapid mandible strike of a termite soldier. *Current Biology* 2008, vol. 18, s. 1049-1050.

SHELLMAN-REEVE, J., S. The spectrum of eusociality in termites. In: CHOE, J., C.; CRESPI, B., J. (Eds): *The Evolution of Social Behaviour in Insects and Arachnids*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. S. 52-93. ISBN 9780511721953

SCHEFFRAHN, R.; BOURGUIGNON, T.; AKAMA, D.; SILLAM-DUSSÈS, D.; ŠOBOTNÍK, J. *Roisinitermes ebogoensis* gen. & sp. n., an outstanding drywood termite with snapping soldiers from Cameroon (Isoptera, Kalotermitidae). *ZooKeys*. 2018, vol. 787, s. 91-105.

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

SJOSTROM, E. *Wood Chemistry—Fundamentals and Applications*. San Diego: Academic Press, 1993. 293 s. 2nd Edition - ISBN: 9781493301942

SOARES, H., X.; COSTA-LEONARDO, A., M. Survey of the leg exocrine glands in termites (Isoptera). *Revista Brasileira de Entomologia*. 2002, vol. 46, s. 1-6.

SPANTON, S., G.; PRESTWICH, G., D. Chemical self-defence by termite workers: prevention of autotoxication in two rhinotermitids. *Science*. 1981, vol. 214, s. 1363-1365.

SPRINGHETTI, A. I reali nella differenziazione delle caste di *Kalotermes flavicollis* (Fabr.) (Isoptera). *Bolletino di zoologia*. 1972, vol. 39, s. 83-87.

STERN, D., L.; FOSTER, W., A. The evolution of sociality in aphids: A clone's-eye view. CHOE, J., C.; CRESPI, B., J. (Eds): *The evolution of social behavior in insects and arachnids*. New York : Cambridge University Press, 1997. S. 150-165. ISBN 0-521-58977-0.

STERN, D., L.; FOSTER, W., A. The evolution of sociality in aphids: a clone's-eye view. In: CHOE, J., C.; CRESPI, B., J. (Eds). *The Evolution of Social Behavior in Insects and Arachnids*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. S. 150-165. ISBN 0-521-58977-0.

STUART, A., M. Preliminary studies on the significance of head-banging movements in termites with special reference to *Zootermopsis angusticollis* (Hagen) (Isoptera: Hodotermitidae). *Sociobiology*. 1988, vol. 14, s. 49-60.

STUART, A., M. The structure and function of the sternal gland in *Zootermopsis nevadensis* (Isoptera). *Proceedings of the Zoological Society of London*. 1963, vol. 143, s. 43-52.

STUART, A., M.; SATIR, P. Morphological and functional aspects of an insect epidermal gland. *Journal of Cell Biology*. 1968, vol. 36, s. 527-549.

SU, N., Y. Field evaluation of hexaflumuron bait for population suppression of subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*. 1994, vol. 87, s. 389-397.

SUGIMOTO, A.; BIGNELL, D. E.; MACDONALD J. A. Global impact of termites on the carbon cycle and atmospheric trace gases. In: ABE T.; BIGNELL D. E.; HIGASHI M. (Eds): *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht, Kluwer academic publishers, 2000. s 409-435. ISBN 978-90-481-5476-0

SUGIMOTO, A.; BIGNELL, D., E.; MACDONALD, J., A. Global impact of termites on the carbon cycle and atmospheric trace gases. In: ABE, T.; BIGNELL, D., E.; HIGASHI, M. (Eds.): *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. S. pp. 409-435. ISBN 978-90-481-5476-0

SUZUKI, Y., KOPP, R., E.; KOGURE, T.; SUGA, A., TAKAI, K.; TSUCHIDA, S.; OZAKI, N.; ENDO, K.; HASHIMOTO, J.; KATO, Y.; MIZOTA, CH.; HIRATA, T.; CHIBA, H.; NEALSON, H., N.; HORIKOSHI, K.; KIRSCHVINK, J. L. Sclerite formation in the hydrothermal-vent 'scaly-foot gastropod': possible control of iron sulfide biomineralization by the animal. *Earth and Planetary Science Letters*. 2006, vol. 242, s. 39-50.

SYNEK, J.; BERÁNKOVÁ T.; STIBLIK, P.; PFLEGEROVA, J.; AKAMA, P., D.; BOURGUIGNON, T.; SILLAM-DUSSÈS, D.; ŠOBOTNÍK, J. The oral gland, new exocrine organ of termites. *Arthropod structure & development*. 2019, vol. 51, s. 32-36.

ŠOBOTNÍK, J. How does termites relate to their environments? Habilitační práce. Praha, 2015. 153 s.

ŠOBOTNÍK, J.; BOURGUIGNON, T.; CARRIJO, T.; BORDEREAU, C.; ROBERT, A.; KRIZKOVA, B.; CONSTANTINI, J.; CANCELLO, E. The nasus gland: A new gland in soldiers of *Angularitermes* (Termitidae, Nasutitermitinae). *Arthropod structure & development*. 2015, vol. 44. DOI 10.1016/j.asd.2015.08.006.



ŠOBOTNÍK, J.; BOURGUIGNON, T.; HANUS, R.; DEMIANOVÁ, Z.; PYTELKOVÁ, J.; MAREŠ, M.; FOLTÝNOVÁ, P.; PREISLER, J.; CVAČKA, J.; KRASULOVÁ, J.; ROISIN, Y. Explosive backpacks in old termite workers. *Science*. 2012, vol. 337, s. 436.

ŠOBOTNÍK, J.; BOURGUIGNON, T.; HANUS, R.; SILLAM-DUSSÈS, D.; PFLEGEROVÁ, J.; WEYDA, F.; KUTALOVÁ, K.; VYTISKOVÁ, B.; ROISIN, Y. Not Only Soldiers Have Weapons: Evolution of the Frontal Gland in Imagoes of the Termite Families Rhinotermitidae and Serritermitidae. *PloS one*. 2010c, vol. 5, s. e15761. DOI 10.1371/journal.pone.0015761.

ŠOBOTNÍK, J.; BOURGUIGNON, T.; HANUS, R.; WEYDA, F.; ROISIN, Y. Structure and function of defensive glands in soldiers of *Glossotermes oculatus* (Isoptera: Serritermitidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 2010d, vol. 99, s. 839-848.

ŠOBOTNÍK, J.; DAHLSÖ, C. Isoptera. In: ROITBERG, B., D. (ed.): *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier: 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.02256-1

ŠOBOTNÍK, J.; HANUS, R.; KALINOVÁ, B.; PISKORSKI, R.; CVAČKA, J.; BOURGUIGNON, T.; ROISIN, Y. (E,E)- $\alpha$ -farnesene, the alarm pheromone of *Prorhinotermes canalifrons* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Chemical Ecology*. 2008, vol. 34, s. 478-486.

ŠOBOTNÍK, J.; HUBERT, J. The morphology of the exocrine glands of *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae) and their ontogenetical aspects. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. 2003, vol. 67, s. 83-98.

ŠOBOTNÍK, J.; JIROŠOVÁ, A.; HANUS, R. Chemical warfare in termites. *Journal of insect physiology*. 2010b, vol. 56, s. 12-21.

ŠOBOTNÍK, J.; KINDL, J.; BUČEK, A.; BOURGUIGNON, T.; BARDUNIAS, P. Evolution of snapping defence in termite soldiers. BRYJA, J.; HORSÁK, M.; HORSÁKOVÁ, V.; ZUKAL, J. (eds.) *Zoologické dny*. Brno: Sborník abstraktů, 2019. S. 186.

ŠOBOTNÍK, J.; KUTALOVÁ, K.; VYTISKOVÁ, B.; ROISIN, Y.; BOURGUIGNON, T. Age-dependent changes in ultrastructure of the defensive glands of *Neocapritermes taracua* workers (Isoptera, Termitidae). *Arthropod Structure & Development*. 2014, vol. 43, s. 205-210.

ŠOBOTNÍK, J.; SILLAM-DUSSÈS, D.; WEYDA, F.; DEJEAN, A.; ROISIN, Y.; HANUS, R.; BOURGUIGNON, T. The frontal gland in workers of Neotropical soldierless termites. *Die Naturwissenschaften*. 2010a, vol. 97, s. 495-503.

ŠOBOTNÍK, J.; WEYDA, F. Ultrastructural ontogeny of the labial gland apparatus in *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Arthropod Structure & Development*. 2003, vol. 31, s. 255-270.

ŠOBOTNÍK, J.; WEYDA, F.; HANUS, R. Ultrastructural study of tergal and posterior sternal glands in *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae). *European Journal of Entomology*. 2005, vol. 102, s. 81-88.

ŠOBOTNÍK, J.; WEYDA, F.; HANUS, R.; KYJAKOVA, P.; DOUBSKY, J. Ultrastructure of the frontal gland in *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae) and quantity of the defensive substance. *European Journal of Entomology*. 2004, vol. 101, s. 153-163.

ŠOBOTNÍK, J.; WEYDA, F.; HANUŠ, R. Ultrastructure of epidermal glands in neotenic reproductives of the termite *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Arthropod Structure & Development*. 2003, vol. 32, s. 201-208.

ŠTYS, P.; ŠOBOTNÍK, J. Comments on classifications of insect ontogenies, and occurrence of proneometabolous wing development in termite genus *Prorhinotermes* (Hexapoda: Isoptera). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*. 1999, vol. 63, s. 483-492.

THORNE B. L. Evolution of Eusociality in Termites. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1997, vol. 28, s. 27-54.

THORNE, B., L.; GRIMALDI, D., A.; KRISHNA, K. Early fossil history of termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D., E.; HIGASHI, M. (Eds.): *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. S. 77-94. ISBN 978-90-481-5476-0

TILLMAN, J., A.; SEYBOLD, S., J.; JURENKA, R., A.; BLOMQUIST, G., J. Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1999, vol. 29, s. 481-514.

TOKORO, M.; TAKAHASHI, M.; YAMAOKA, R. (Z, E, E)-dodecatrien-1-ol: A minor component of trail pheromone of termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Journal of Chemical Ecology*. 1994, vol. 20, s. 199-215.

TOKURA, M.; OHKUMA, M.; KUDO, T. Molecular phylogeny of methanogens associated with flagellated protists in the gut and with the gut epithelium of termites. *FEMS Microbiology Ecology*. 2000, vol. 33, s. 233-240.

VEIVERS, P., C.; MÜHLEMANN, R.; SLAYTOR, M.; LEUTHOLD, R., H.; BIGNELL, D., E. Digestion, diet and polyethism in two fungus-growing termites: *Macrotermes subhyalinus* Rambur and *M. michaelsoni* Sjödtedt. *Journal of Insect Physiology*. 1991, vol. 37, s. 675-682.

VRKOČ, J.; KŘEČEK, J.; HRDÝ, I. Monoterpenic alarm pheromones in two *Nasutitermes* species. *Acta entomologica Bohemoslovaca*. 1978, vol. 75, s. 1-8.

VRKOČ, J.; UBIK, K. 1-Nitro-trans-1-pentadecene as the defensive compound of termites. *Tetrahedron Letters*. 1974, vol. 15, s. 1463-1464

WALLER, D., A.; LA FAGE, J., P. Unpalatability as a defense of *Coptotermes formosanus* Shiraki soldiers against ant predation. *Journal of Applied Entomology*. 1987, vol. 103, s. 148-153.

WATSON, J., A., L. The worker caste of the hodotermitid harvester Termites. *Insectes Sociaux*. 1973, vol. 20, s. 1-20.

WATSON, J., A., L.; GAY, F., J. Isoptera. In: CSIRO (Ed.): *The insects of Australia. Volume I*. Carlton: Melbourne University Press, 1991. S. 330-347. ISBN 9780643101111

WATSON, J., A., L.; SEWELL, J., J. The origin and evolution of caste systems in termites. *Sociobiology*. 1981, vol. 6, s. 106-118.

WEESNER, F., M. External anatomy. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F., M. (Eds.): *Biology of Termites, vol. I*. New York: Academic Press, 1969. S. 19-47. ISBN 9780323144582

WEIBLEN, G., D. How to be a fig wasp. *Annual Review of Entomology*. 2002, vol. 47, s. 299-330.

WHITEHEAD, A., T. The innervation of the salivary gland in the American cockroach: light and electron microscopic observations. *Journal of Morphology*. 1971, vol. 135, s. 483-506.

WILSON, E., O. *The Insect Societies*. Belknap Press, Cambridge, 1971. 548 s. ISBN 0674454952

WU, L.; BOURGUIGNON, T.; ŠOBOTNÍK, J.; WEN, P.; LIANG, W.; LI, H. Phylogenetic position of the enigmatic termite family *Stylotermitidae* (Insecta: Blattodea). *Invertebrate Systematics*. 2018, vol. 32. s. 1111-1117.

## 7) Přílohy

### 7.1. Přehled použitého názvosloví termitů

Názvosloví je řazeno abecedně a jako zdroj byl použit zdroj: Treatise on the Isoptera of the world (Krishna et al., 2013).

*Acanthotermes* Sjöstedt, 1900  
*Acorhinotermes* Emerson, 1949  
*Amitermes* Silvestri, 1901  
Amitermitinae Kemner, 1934  
*Anacanthotermes* Jacobson, 1905  
*Angularitermes* Emerson, 1925  
*Anoplotermes* Mueller, 1873  
*Anoplotermes janus* Bourguignon & Roisin, 2010  
*Aparatermes* Fontes, 1987  
*Apicotermes* Holmgren, 1912  
Apicotermitinae Grassé & Noirot, 1955  
Archotermopsidae Engel, Grimaldi and Krishna, 2009  
*Archotermopsis* Desneux, 1904  
*Archotermopsis wroughtoni* (Desneux, 1904)  
*Calcaritermes* Snyder, 1925  
*Constrictotermes* Holmgren, 1910  
*Constrictotermes cyphergaster* (Silvestri, 1901)  
*Coptotermes* Wasmann, 1896  
*Coptotermes acinaciformis* (Froggatt, 1898)  
*Coptotermes formosanus* Shiraki, 1909  
*Coptotermes gestroi* Wasmann, 1896  
*Coptotermes lacteus* (Froggatt, 1898)  
*Coptotermes testaceus* (Linnaeus, 1758)  
*Cornitermes* Wasmann, 1897  
*Cornitermes bequaerti* Emerson, 1952  
*Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832)  
*Coxotermes* Grassé & Noirot, 1955  
*Cryptotermes* Banks, 1906  
*Cryptotermes brevis* (Walker, 1853)  
*Cubitermes* Wasmann, 1906

*Cubitermes fungifaber* (Sjöstedt, 1896)  
Cubitermitinae Weidner, 1956  
*Dentispicotermes* Emerson, 1949  
*Dolichorhinotermes* Snyder & Emerson, 1949  
*Dolichorhinotermes longilabius* (Emerson, 1925)  
*Drepanotermes* Silvestri, 1909  
*Duplidentitermes* Emerson, 1959  
*Embiratermes* Fontes, 1985  
*Embiratermes festivellus* (Silvestri, 1901)  
*Eucryptotermes* Holmgren, 1911  
*Euhamitermes* Holmgren, 1912  
*Foraminitermes* Holmgren, 1912  
*Globitermes* Holmgren, 1912  
*Globitermes sulphureus* (Haviland, 1898)  
*Glossotermes* Emerson, 1950  
*Glossotermes oculatus* Emerson, 1950  
*Glyptotermes* Froggatt, 1897  
*Heimitermes* Grassé & Noirot, 1955  
*Heimitermes laticeps* Grassé & Noirot, 1955  
*Heterotermes tenuis* Grassé & Noirot, 1955  
*Hodotermes* Hagen, 1853  
Hodotermitidae Desneux, 1904  
*Hodotermopsis* Holmgren, 1911  
*Hodotermopsis sjoestedti* Holmgren, 1911  
*Indotermes* Roonwal & Sen-Sarma, 1960  
*Invasitermes* Miller, 1984  
*Kalotermes* Hagen, 1853  
*Kalotermes flavicollis* (Fabricius, 1793)  
Kalotermitidae Froggatt, 1897  
Kalotermitinae Froggatt, 1897  
*Labiotermes* Holmgren, 1912  
*Labiotermes labralis* (Holmgren, 1906)  
*Labritermes* Holmgren, 1914  
*Macrotermes* Holmgren, 1910  
*Macrotermes michaelsoni* (Sjöstedt, 1914)

Macrotermitinae Kemner, 1934  
*Machadotermes* Weidner, 1974  
*Machadotermes inflatus* Weidner, 1974  
*Mastotermes* Froggatt, 1897  
*Mastotermes darwiniensis* Froggatt, 1897  
*Microcerotermes* Silvestri, 1901  
*Microhodotermes* Sjostedt, 1926  
*Nasutitermes* Dudley, 1890  
*Nasutitermes octopilis* Banks, 1918  
*Nasutitermes triodiae* (Froggatt, 1898)  
Nasutitermitinae Hare, 1937  
*Neocapritermes* Holmgren, 1912  
*Neocapritermes taracua* Krishna and Araujo, 1968  
Neoisoptera Engel, Grimaldi, and Krishna 2009  
*Orientotermes* Ahmad, 1976  
*Orthognathotermes* Holmgren, 1910  
*Paraneotermes* Light, 1937  
*Parrhinotermes* Holmgren, 1911  
*Pericapritermes* Silvestri, 1914  
*Planicapritermes* Emerson, 1949  
*Porotermes* Hagen, 1858  
*Porotermes quadricollis* (Rambur, 1842)  
*Promirotermes* Silvestri, 1914  
*Prorhinotermes* Silvestri, 1909  
*Prorhinotermes canalifrons* (Sjöstedt, 1904)  
*Prorhinotermes flavus* (Bugnion and Popoff, 1910)  
*Prorhinotermes inopinatus* Silvestri, 1909  
*Prorhinotermes simplex* (Hagen, 1858)  
*Protohamitermes* Holmgren, 1912  
*Psammotermes* Desneux, 1902  
*Psammotermes allocerus* Silvestri, 1908  
*Psammotermes hybostoma* Desneux, 1902  
*Reticulitermes* Holmgren, 1913  
*Reticulitermes flavipes* (Kollar, 1837)  
*Reticulitermes lucifugus* Clement, 1984

*Rhinotermes* Hagen, 1858  
*Rhinotermes Magnificus* Silvestri, 1914  
Rhinotermitidae Froggatt, 1897  
Rhinotermitinae Froggatt, 1897  
*Roisinitermes* Scheffrahn, 2018  
*Roisinitermes ebogoensis* Scheffrahn, 2018  
*Ruptitermes* Mathews, 1977  
*Serritermes* Wasmann, 1897  
*Serritermes serrifer* (Hagen and Bates, 1858)  
Serritermitidae Emerson & Krishna, 1975  
*Schedorhinotermes* Silvestri, 1909  
*Silvestritermes* Rocha & Canello, 2012  
*Silvestritermes euamignathus* (Silvestri, 1901)  
*Sphaerotermes* Holmgren, 1912  
*Sphaerotermes sphaerotherax* (Sjöstedt, 1911)  
*Spinitermes* Wasmann, 1897  
*Spinitermes trispinosus* (Hagen, 1958)  
*Stolotermes* Hagen, 1858  
Stolotermitidae Holmgren, 1910  
*Stylotermes* Holmgren & Holmgren, 1917  
*Stylotermes halumicus* Liang, Wu, and Li, 2017  
Syntermitinae Engel & Krishna, 2004  
*Termes* Linnaeus, 1758  
*Termes hospes* (Sjöstedt, 1900)  
Termitinae Latreille, 1802  
*Termitogeton* Desneux, 1904  
*Tonsuritermes* Canello & Constantini 2018  
*Verrucositermes* Emerson, 1960  
*Verrucositermes hirtus* Deligne, 1983  
*Zootermopsis* Emerson, 1933