



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Analyse der Futterkörperchen (Müller'sche Körperchen)
in der *Cecropia-Azteca* Assoziation

verfasst von

Klaus Kaltenbrunner

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 190 445 333

Studienrichtung lt. Studienblatt: Lehramtsstudium UF Biologie & Umweltkunde und UF Deutsch

Betreut von: Dipl. Biol. Dr. Veronika Mayer

Eidesstattliche Erklärung:

„Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.“

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung..... | 9 |
| 2 | Methoden..... | 12 |
| 2.1 | Morphologisch-Anatomische Untersuchung | 12 |
| 2.1.1 | Binokular-Untersuchungen | 12 |
| 2.1.2 | CT-Untersuchungen..... | 12 |
| 2.1.3 | LM-Untersuchungen..... | 13 |
| 2.2 | Ethologische Untersuchung | 13 |
| 2.3 | Analyse der Metabolite | 14 |
| 2.3.1 | Sammeln der Proben..... | 14 |
| 2.3.1.1 | Sammelorte | 14 |
| 2.3.1.2 | Sammeln der MKs | 15 |
| 2.3.1.3 | Bestimmung von <i>Cecropia</i> | 16 |
| 2.3.1.4 | Ernte restlicher Gewebe..... | 16 |
| 2.3.2 | Laboruntersuchungen der Proben | 17 |
| 2.3.2.1 | Methodenfindung zur Analyse aller Gewebe..... | 17 |
| 2.3.2.2 | Extraktion | 18 |
| 2.3.2.3 | Derivatisation | 18 |
| 2.3.2.4 | GC-MS-Messung..... | 19 |
| 2.3.3 | Analyse der Proben | 20 |
| 2.3.3.1 | Analyse mit ChromaTof® | 20 |
| 2.3.3.2 | Nachbearbeitung in Excel..... | 21 |
| 2.3.3.3 | Statistik..... | 22 |
| | I Qualitative Analyse..... | 22 |
| | II Quantitative Analyse | 23 |
| 3 | Resultate | 25 |
| 3.1 | Morphologisch-Anatomische Untersuchung | 25 |
| 3.1.1 | Anatomie, Morphologie und Entwicklung der Müller'schen Körperchen | 25 |
| 3.1.2 | Anatomie und Morphologie der Trichome | 27 |
| 3.1.3 | Anatomie und Morphologie des Trichiliums..... | 29 |
| 3.2 | Ethologische Untersuchung | 37 |
| 3.3 | Analyse der Metabolite | 39 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.1 | Qualitative Analyse (S5)..... | 39 |
| 3.3.1.1 | Vergleich Insekten | 39 |
| 3.3.1.2 | Vergleich Reiche | 40 |
| 3.3.1.3 | Vergleich Gewebe (MKs - Pilz)..... | 42 |
| 3.3.1.4 | Vergleich Gewebe (MKs/Pilz - Insektenstadien)..... | 43 |
| 3.3.2 | Quantitative Analyse | 45 |
| 3.3.2.1 | S5-Untersuchung | 45 |
| I | Vergleich der Gewebe | 45 |
| a | Anzahl der signifikanten Unterschiede..... | 45 |
| b | PCA-Analyse..... | 48 |
| II | Substanzkategorien in den Geweben..... | 53 |
| a | Aminosäuren | 53 |
| b | Kohlenhydrate | 55 |
| c | Fettsäuren..... | 56 |
| d | Sterole..... | 58 |
| 3.3.3 | SL-Untersuchung..... | 62 |
| 3.3.3.1 | Vergleich: MKs verschiedener <i>Cecropia</i> -Arten..... | 62 |
| I | Anzahl der signifikanten Unterschiede..... | 62 |
| II | PCA-Analyse..... | 63 |
| 3.3.3.2 | Vergleich MKs -Pilzpatch | 65 |
| I | Anzahl der signifikanten Unterschiede..... | 65 |
| II | PCA..... | 65 |
| 4 | Diskussion | 68 |
| 4.1 | Morphologisch-Anatomische Untersuchungen | 68 |
| 4.1.1 | Morphologie und Anatomie der MKs..... | 68 |
| 4.1.2 | Umfang der MK-Produktion | 69 |
| 4.1.3 | Versorgung des Trichiliums | 70 |
| 4.1.4 | Anatomie und Funktion Trichome..... | 70 |
| 4.1.4.1 | Einfache Trichome | 70 |
| 4.1.4.2 | Komplexe Trichome..... | 73 |
| 4.2 | Ethologische Untersuchungen..... | 74 |
| 4.3 | Analyse der Metabolite | 76 |
| 4.3.1 | Substanzkategorien in den Geweben..... | 78 |
| 4.3.1.1 | Freie Aminosäuren in den Geweben | 78 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.3.1.2 | Kohlenhydrate in den Geweben..... | 81 |
| 4.3.1.3 | Fettsäuren in den Geweben..... | 85 |
| 4.3.1.4 | Sterole in den Gewebe..... | 85 |
| 4.3.2 | Vergleich der Gewebe..... | 89 |
| 4.3.2.1 | MKs im Vergleich mit dem restlichen Pflanzengewebe..... | 89 |
| 4.3.2.2 | Vergleich von MKs und Pilzpatch..... | 90 |
| 4.3.2.3 | Artspezifische Unterschiede in den MKs..... | 93 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 95 |
| 5.1 | Zusammenfassung..... | 95 |
| 5.2 | Abstract..... | 97 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 99 |
| 7 | Anhang..... | 104 |
| 8 | Danksagung..... | 131 |
| 9 | Lebenslauf..... | 133 |

1 Einleitung

Interaktionen zwischen Pflanzen und Ameisen sind mannigfaltig und bieten zahlreiche Beispiele für Symbiosen (Bronstein et al. 2006, Rico-Gray & Oliveira 2007, Mayer et al. 2014). Die Bandbreite reicht von opportunistischen und fakultativen Interaktionen bis hin zu obligaten Ameisen-Pflanzen-Assoziationen. Ameisen verbreiten für Pflanzen Samen und erhalten als Gegenleistung die lipidreichen Anhängsel der Samen, sogenannte Elaiosomen (Fischer et al. 2008), oder schützen Pflanzen vor Herbivorie (Heil & McKey 2003, Heil 2008, Mayer et al. 2014). Während fakultative Assoziationen auch in gemäßigten Breiten möglich sind, beschränken sich obligate Ameisen-Pflanzen-Assoziationen auf den tropischen und subtropischen Raum (Davidson & McKey 1993). Die Vorteile einer obligaten Assoziation für Pflanze und Ameisen sind divers. Ameisen schützen die Pflanzen etwa vor Herbivoren, säubern diese von Pilzpathogenen oder entfernen rankende Pflanzen (Janzen 1966, Schupp 1986, Vasconcelos 1991, Gaume et al. 1997, Fischer et al. 2002). Stellenweise versorgen die Ameisen die Symbiosepartner sogar mit Nährstoffen (Sagers et al. 2000; Fischer et al. 2003; Gegenbauer et al. 2012). Im Gegenzug wird den Ameisen von der Pflanze oft Wohnraum, der als Domatium bezeichnet wird, zur Verfügung gestellt. Die Domatien der myrmekophytischen Pflanzen werden von den unterschiedlichsten Pflanzenorganen, seien es der Petiolus und ausgehölte Stämme wie bei *Piper* (Fischer et al. 2002), hohle Nebenblattdornen wie bei *Acacia* (Heil et al. 2004) oder die hohlen Stämme und Äste bei *Cecropia* (Davidson & Fisher 1991) gebildet. Zudem bieten die Pflanzen den Symbiosepartnern oft auch Nahrung in Form von extrafloralem Nektar (EFN) oder Futterkörperchen (Mayer et al. 2014).

Die Interaktion zwischen *Cecropia* (Urticaceae) und *Azteca* (Formicidae, Dolichoderinae), die im Fokus dieser Untersuchung steht, ist eine der bekanntesten und am intensivsten untersuchten in den Neotropen (Bronstein et al. 2006, Valverde & Hanson 2011). *Cecropia* ist eine sehr häufige Pionierpflanze, die nicht nur in Lichtungen im primären Regenwald sondern auch in Plantagen, Weiden, Gärten und entlang von Straßen verbreitet ist. Ein großer Teil der *Cecropia*-Arten wird von Ameisen der Gattung *Azteca* besiedelt. Die Assoziation mit den *Azteca*-Ameisen ist schon seit über 100 Jahren bekannt, wobei allerdings in ersten Beschreibungen die symbiontische Natur der Interaktion noch stark in Frage gestellt wurde („Die *Cecropia* bedarf zu ihrem Gedeihen der *Azteca*-Ameisen so wenig, wie der Hund der Flöhe.“ von Ihering 1907). Tatsächlich sind aber die Anpassungen der Pflanze an ihren Symbiosepartner vielfältig. Die *Azteca*-Ameisen leben in den hohlen Internodien des Stammes und später auch in den Ästen von *Cecropia*. Die Pflanze weist in jedem Internodium eine Stelle, das Prostoma, auf, in der Leitbündel fehlen und das Gewebe schwächer ausgeprägt ist. Diese Stelle wird von den Ameisen durchbrochen und als Zugang zum

Domatium benutzt (Longino 1991). Zudem produziert *Cecropia* Futterkörperchen. Neben kleinen Pearl bodies auf den Blättern werden vor allem die sogenannten Müller'schen Körperchen (MKs) gebildet. Die MKs werden an der Basis des Petiolus von einer kielförmigen Struktur, dem Trichilium, das mit Trichomen bedeckt ist, produziert (Rickson 1976).

Die Genese und Zusammensetzung dieser MKs bilden einen zentralen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Obwohl die Anatomie der Trichilien bereits untersucht wurde (Rickson 1976, Bischof et al. 2013), bestehen noch ungeklärte Fragen; besonders die Funktion des, das gesamte Trichilium überziehenden, Trichompolsters wurde bisher kaum thematisiert. Zudem lag der Schwerpunkt der bisherigen Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung bisher auf den Kohlenhydraten. Weiters wurde nicht untersucht, inwieweit sich die MKs unterschiedlicher *Cecropia*-Arten unterscheiden.

Vor kurzem wurde außerdem ein zusätzlicher Partner in der *Cecropia/Azteca* Assoziation gefunden: Pilze der Ordnung Chaetothyriales (Ascomyceten), auch als >schwarze Hefe< bezeichnet. Auch in anderen Ameisen-Pflanzen wurden solche Pilze gefunden. Die Ameisen kultivieren sie in >Pilzpatches< (Defosse et al. 2009, Voglmayr et al. 2011, Blatrix et al. 2013). Da zudem kürzlich nachgewiesen werden konnte, dass der Pilz bei anderen Ameisen-Pflanzen-Assoziationen an die Larven verfüttert wird (Blatrix et al. 2013), stellt sich die Frage, ob der Pilzpatch für *Azteca* ebenfalls Nahrung sein könnte. Überraschenderweise wurden unlängst MKs dokumentiert, die auf dem Pilzpatch lagen und von Hyphen durchdrungen waren (Mayer, persönliche Mitteilung). Die Inhaltsstoffe des Pilzpatches und welche Rolle er in der *Azteca-Cecropia*-Assoziation einnimmt, sind jedoch bisher noch nicht bekannt.

Verschiedene Entwicklungsstadien der Ameisen haben oft unterschiedliche Nährstoffansprüche. Während Arbeiterinnen etwa vor allem Kohlenhydrate benötigen, sind für heranwachsende Larven etwa Proteine von größerer Bedeutung (Howard & Tschinkel 1981, Echols 1966, Heil et al. 1998, Fischer et al. 2002). Das Metabolitspektrum (also etwa lösliche Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fettsäuren und Sterole) von *Azteca* wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

Das Anliegen dieser Untersuchung bestand somit darin, anatomisch die Entwicklung der Müller'schen Körperchen zu dokumentieren und mit einem metabolischen Ansatz zu klären (1) welche Inhaltsstoffe die MKs verschiedener *Cecropia*-Arten aufweisen, (2) für welches Insektenentwicklungsstadium die MKs ein geeignetes Nährstoffangebot bieten, (3) ob auch der Pilzpatch als Nahrung dienen und bei MK Knappheit als MK Substitution verwendet werden könnte, und (4) welche Funktion die Trichome der MKs haben.

Um die Fragestellungen zu überprüfen wurden in der vorliegenden Arbeit umfassende anatomische Untersuchungen (Binokular, Lichtmikroskopie, Computertomographie) durchgeführt. Um die Anlage und Pflege des Pilzpatches zu untersuchen, wurden mittels Endoskop Videoaufnahmen im Inneren frisch besiedelter Domatien gemacht. Um Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Gewebe und mögliche Nährstoffflüsse ziehen zu können wurde schließlich eine umfangreiche Metabolomics-Analyse von vier unterschiedlichen Pflanzen Gewebetypen (MKs, Pilzpatch, Trichome, Trichilium) und von MKs dreier *Cecropia*-Arten (*C. insignis*, *C. obtusifolia*, *C. peltata*) durchgeführt. Außerdem wurde das Metabolitspektrum von Arbeiterinnen, Larven, Puppen, Geschlechtstiere der symbiontischen *Azteca* sp.- Arten untersucht.

2 Methoden

2.1 Morphologisch-Anatomische Untersuchung

Es wurden Trichilienproben von *Cecropia insignis* im Unterwuchs einer Ölpalmenplantage in der Nachbarschaft der Tropenstation La Gamba (N 8°42'61", W 83°12'97"; Seehöhe: 70m, jährliche Niederschlagsmenge: 6000mm) genommen, die verschiedenes Alter aufwiesen. Beide befanden sich allerdings in einem Stadium in dem MKs produziert werden. Zudem wurde in derselben Plantage eine Trichilienproben von einer ca. 1,70m hohen *C. cf. peltata* genommen. Die Proben wurden in FAA (Formaldehyd, Essigsäure und Alkohol) fixiert, in Wien in 70% Alkohol überführt und in dieser Lösung bis für weitere Untersuchungen gelagert. Die Analysen der Proben von *C. cf. Peltata* erfolgte mittels Binokular und Computertomographie (Binokular-Untersuchungen, CT-Untersuchungen). Von den Proben von *C. insignis* wurden Schnitte angefertigt (LM-Untersuchungen).

2.1.1 Binokular-Untersuchungen

Zwei Trichilien-Proben wurden Kritisch-Punkt getrocknet (CP Autosamdri-815) und anschließend mit dem Binokular [Olympus SZH10 research stereo] untersucht und fotografiert (Nikon DS-F11). Die Aufnahmen (Binokular-Untersuchungen/ LM-Untersuchungen/ CT-Untersuchungen) wurden teilweise mit dem Programm Gimp 2.8.10 (Gimp Delevopment Team) nachbearbeitet.

2.1.2 CT-Untersuchungen

Eine Probe von *C. cf. peltata* wurde in einer aufsteigenden Alkoholserie entwässert (80%, 90%, 96%), mit einer Wasserstrahlvakuumpumpe entlüftet und schließlich in FAA + 1% PTA (Wolframphosphorsäure) überführt und für 14 Tage infiltriert. Die Infiltration mit Wismut kontrastierte die MKs nicht, weshalb die damit behandelte Probe nicht computertomographisch erfasst wurde. Die Probe wurde anschließend Kritisch-Punkt getrocknet (CPAutosamdri-815)

Gescannt wurde mit dem XRadia MicroXCT-200-System, wobei der Scan mit einem 1x und einem 10x-Objektiv durchgeführt wurde. Für die Rekonstruktion des Bildstapels wurde die Software XMReconstructor 8.1.6599 (XRadia Inc.) verwendet. Für das 3D-Rendering wurde Amira (Build 006-Se11b; Konrad-Zuse Zentrum Berlin (ZIB) & Visage Imaging Inc.) verwendet, wobei durch die verschiedenen Graustufenwerte Gewebe identifiziert und unterschiedlich eingefärbt werden konnten. Bei der Bearbeitung wurde besonders auf die Verteilung der MKs, den Aufbau der Leitbündel und die Trichomtypen geachtet. Der Scan und die Bearbeitung der Bilder wurden von Susanne Pamperl durchgeführt.

2.1.3 LM-Untersuchungen

Nach mehrfacher Entlüftung und Entwässerung wurden die Proben in Technovit 7100 Härter I (HeraeusKulzert) überführt und mehrere Wochen im Kühlschrank infiltriert und anschließend in Technovit7100 Härter II (HeraeusKulzert) eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden 7µm dicke Längsschnitte angefertigt.

Die Schnitte wurden anschließend mit 0,5% Toluidinblau (bzw. Rutheniumrot) gefärbt und mit Entellan eingedeckelt. Die Querschnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Olympus BX 50) untersucht und fotografiert (Nikon DS-FI1).

Um die Genese der MKs besser zu dokumentieren, wurde die Entwicklung in verschiedene Stadien untergliedert. Basierend auf Rickson's (1976) lichtmikroskopischen Untersuchungen zur Entwicklung der MKs wurden Kategorien zur Dokumentation der Entwicklungsschritte festgelegt. Da das Loslösen der MKs vom Trichilium genauer untersucht werden sollte, wurde ein zusätzlicher Entwicklungsschritt definiert (Tab. 1).

Tabelle 1. Die Einteilung der Entwicklung eines Trichiliums in Stadien in Anlehnung an Rickson (1976). Stadium 5 wurde neu hinzugefügt. Die Größenangaben beziehen sich auf Länge und Breite der MKs

| Stadium 1 | Stadium 2 | Stadium 3 | Stadium 4 | Stadium 5 |
|--|---|--|--|---|
| sehr klein, um die 10µm, wenige Zellen (ca. 4) noch keine Wölbung, lediglich Zellkollektiv | klein, deutlich unter 100µm, wenige Zellen (ca. 10) leichte Wölbung der Epidermis | deutlich kleiner als Stadium 4 bzw. 5; vielzellig, noch deutlich in Gewebe eingebettet | relativ groß, verschmälerte Basis, jedoch noch verbunden mit Gewebe, | volle Größe erreicht, losgelöst, Glykogen-Einlagerungen (Bischof et al. 2013) |
| 10-20µmLänge/ 10-20µmBreite | 20µmLänge/ 20µmBreite | 100µmLänge/ 100µmBreite | 500µmLänge/ 400µmBreite | 700µmLänge/ 500µm Breite |

2.2 Ethologische Untersuchung

Es wurde versucht, durch Beobachtung zu überprüfen, ob von den Ameisen bzw. Königinnen MKs oder anderes Pflanzenmaterial auf die Pilzpatches aufgetragen werden.

Mit einer sehr lichtempfindlichen Kamera (Canon Eos 5D Mark II) und einem Endoskop (Fa. Karl Storz GmbH) wurde die Aktivität in gerade besiedelten Domatien aufgezeichnet. Als Lichtquelle wurde eine eigens konzipierte Apparatur verwendet. Da deren Leuchtkraft nicht ausreichte, wurde die Beleuchtung mittels starker Taschenlampen verstärkt (Fig. 8A). Durch die Beleuchtungsapparatur wurde das Domatium indirekt beleuchtet und es konnte auf direkte, für die Ameisen störende Beleuchtung, die über das Endoskop geleitet wird, verzichtet werden.

Mit dieser Methode wurden Versuchspflanzen an drei unterschiedlichen Standorten (Schotterstraße, Garten, Regenwaldlichtung) untersucht, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Pflanzen in einem sehr frühen Stadium der Besiedlung befanden. Wie sich gezeigt hat, ist ein angebohrtes und dann wieder verschlossenes Prostoma ein gutes Indiz für eine vor kurzem erfolgte Neubesiedlung. Stellenweise wurden auch größere Kolonien untersucht.

Die Pflanze wurde anschließend an einer nicht-verholzten Stelle (im untersuchten juvenilen Stadium ist meist die gesamte Pflanze noch nicht verholzt) mit einem manuellen Handbohrer vorsichtig angebohrt. In das entstandene Loch wurde vorsichtig im passenden Winkel das Endoskop eingeführt und anschließend die Beleuchtungsapparaturen platziert (Fig. 8B). Da dieser Eingriff eine Störung darstellt, wurde meist ca. 15min gewartet, bis sich die Ameisen wieder beruhigt hatten, bevor gefilmt wurde. Beim Filmen wurde das Endoskop (meist) nicht mehr bewegt. Gefilmt wurde zwischen 30 und 60 Minuten mit der lichtempfindlichsten Einstelloption (ISO 6.400).

2.3 Analyse der Metabolite

2.3.1 Sammeln der Proben

2.3.1.1 Sammelorte

Untersucht wurden Pflanzen (*C. obtusifolia*, *C. peltata*, *C. insignis*) und Ameisen (*Azteca* sp.) in der Umgebung der Tropenstation La Gamba. Um eine große Menge an MKs zu lukrieren, wurde an vielen unterschiedlichen Standorten zu verschiedenen Tageszeiten gesammelt. Proben wurden im Zeitraum Anfang September bis Anfang Oktober 2013 genommen.

Ein großer Teil der MKs wurde auf dem Gebiet der Finca Amable geerntet. Dabei handelt es sich um die Fläche eines Wiederaufforstungsprojekts. Die von Ameisen nicht besiedelten *Cecropia* Erntepflanzen (n=6) waren allesamt entlang eines Bewässerungsgrabens angeordnet, meist zwischen zwei und drei Metern hoch und zudem, mit einer Ausnahme, sehr sonnenexponiert.

Zudem wurden MKs auf unbesiedelten *Cecropien* in einer Ölbaumplantage in der Nachbarschaft der Tropenstation abgesammelt (n=3).

Des Weiteren wurden im Garten der Forschungsanlage Trichilien bewohnter *Cecropia*-Pflanzen (n=3) mit Tangle-Trap geschützt und wiederholt abgesammelt. Bei Tangle Trap (CONTECH) handelt es sich um eine sehr klebrige Masse, die die Exklusion der Ameisen gewährleistet. Beim großzügigen Auftragen der Masse rund um die Trichilien wurde versucht die Trichilien von Tangle-Trap freizuhalten. Da mitunter beobachtet wurde, wie die Ameisen mit Partikeln und toten Arbeiterinnen

Brücken zu den Trichilien errichteten, wurde die Barriere mit Tangle-Trap mehrfach erneuert. Generell wurde der Großteil der (auch unbewohnten) *Cecropia*-Pflanzen in irgendeiner Weise mit Tangle-Trap geschützt, um das Abbernten der Trichilien durch flugunfähige Insekten zu verhindern.

Eine Probe stammt aus einer Aufsammlung im Juni 2013 aus Monteverde. Zudem wurden auch Proben eines Individuums in Wien im Glashaus (Rennweg 14, Institute of Botany and Botanical Garden) genommen. Da die MKs der Pflanze von niemandem geerntet wurden, konnte eine große Menge an MKs gleichzeitig gesammelt werden. Anstatt wie üblich mit der Präpariernadel wurden die MKs allerdings mit Hilfe von Trichtern aus Filterpapier von den Trichomen heruntergeschüttelt. Vertrocknete MKs und Verunreinigungen wurden anschließend mit einer Pinzette entfernt.

2.3.1.2 Sammeln der MKs

Die frischen MKs wurden einzeln mit einer Präpariernadel abgesammelt, wobei darauf geachtet wurde, dass nur frische, also weiß gefärbte MKs entfernt wurden, während bereits längere am Trichilium präsentierte, ausgetrocknete MKs (bräunliche Färbung) nicht geerntet wurden. Zudem wurden mitunter auch MKs, die sich deutlich unter dem Trichompolster abzeichneten, mit der Präpariernadel herausgelöst, wobei darauf geachtet wurde, keine Trichome mit einzusammeln.

Um die nötige Menge für die chemische Analyse zu sammeln, wurden stets alle erreichbaren Trichilien abgeerntet. Der Plan, die unterschiedlich alten Trichilien einzeln einzusammeln, wurde aufgrund des geringen Trockengewichts der MKs verworfen. Die einzige Ausnahme bildet die Pflanze im Glashaus des Botanischen Gartens der Universität Wien, deren Trichilien in verschiedene Altersstufen unterteilt und abgesammelt wurden.

Gesammelt wurde in Eppendorfgefäße (=Epis), die mit Watte verschlossen und spätestens nach 20 Minuten Sammeln in Silikagel aufbewahrt wurden, um Verfälschung durch enzymatische Abbauprozesse zu vermindern.

Die MKs wurden nach dem Rücktransport (meist nach etwa 5 Stunden) in die Tropenstation La Gamba in der Mikrowelle bei höchster Temperaturstufe für 30 Sekunden erhitzt. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um weitere Enzymaktivität zu unterbinden. Anschließend wurden die geöffneten, lediglich mit Watte verschlossenen Epis im Trockenschrank der Station bei ca. 35°C bis zum Heimtransport gelagert und in Wien bis zur Extraktion verschlossen aufbewahrt. Die im Glashaus gesammelten MKs wurden nicht mit der Mikrowelle behandelt, sondern sofort in den Trockenschrank überführt.

Auch die abgeschnittenen Äste, die zum Sammeln von Insekten und Pilzpatches herangezogen wurden, (Vgl.: Kapitel 2.3.1.4: Ernte restlicher Gewebe), wurden mit Tangle-Trap behandelt, aufgehängt und die MKs nach einer Nacht abgeerntet. Durch das einmalige Absammeln lediglich eines Astes konnte allerdings nur ein Bruchteil des Frischgewichts der anderen MK-Proben erreicht werden. Um eine Vergleichbarkeit mit den Insektenproben derselben Pflanze zu gewähren, wurden aber auch diese Proben für die Untersuchung ausgewählt.

Als problematisch stellte sich heraus, dass viele Pflanzen zwar MKs aufwiesen, aber nur ein Bruchteil der angestrebten 10mg Trockengewicht gesammelt werden konnte. Ein Großteil der Proben wurde daher gepoolt und für Labortestläufe (Extraktion/Derivation/Analyse) verwendet. Bei der Auswahl der Proben für die Analyse wurde darauf geachtet, dass alle drei in La Gamba vorkommenden *Cecropia*-Arten repräsentiert waren (Longino 2010). Untersucht wurden die MKs von drei Individuen von *C. insignis*, fünf Individuen von *C. obtusifolia* und sechs Individuen von *C. peltata*.

2.3.1.3 Bestimmung von *Cecropia*

Zur Bestimmung der *Cecropia*-Pflanzen wurden jeweils Fotos der Ober- und Unterseite, der Blätter, des Mittelsegments, des Zentrums der Blattnervatur, des Habitus, des Petiolus, der Krone, des Stipulus, eines jungen und eines alten Trichiliums, des Stammes und gegebenenfalls der Infloreszenzen gemacht. In La Gamba gibt es drei *Cecropia*-Arten (*C. peltata*, *C. insignis* und *C. obtusifolia*) (Longino 2010). Basierend auf dem Bestimmungsschlüssel von Berg et al. (2005) wurde die Bestimmung auf Artniveau durchgeführt. Bei den infloreszenztragenden, ausgewachsenen Bäumen konnte die Bestimmung einfach und definitiv durchgeführt werden. Da junge *Cecropia*-Pflanzen einer Art in vielen Bereichen sehr variantenreich ausgebildet sind (etwa sehr unterschiedliche Lappenanzahl der Blätter einer Art), erwies sich die Bestimmung der juvenilen Pflanzen, die für die Untersuchung der MKs herangezogen wurden, als schwierig. Die Bestimmung auf Art-Niveau konnte dennoch mit relativer Sicherheit bei allen Pflanzen vorgenommen werden.

2.3.1.4 Ernte restlicher Gewebe

Für die Untersuchung der Insekten- und Pilzpatchgewebe wurden ausgewachsene *Cecropia*-Bäume, die eine voll entwickelte Infloreszenz aufwiesen, was die Bestimmung erleichtern sollte, gesucht. Die Untersuchungsbäume befanden sich im Garten der Station bzw. an Straßenrändern in der Umgebung. Mit einer Baumschere mit Teleskopstange wurden je zwei Äste der Bäume abgeschnitten. Geschnitten wurden Äste, die Infloreszenzen aufwiesen und relativ gut zu erreichen waren (in 3 bis 6 Metern Höhe). Es wurde versucht die Äste möglichst nahe beim Baumstamm zu schneiden, um so den Ast in seiner vollen Länge untersuchen zu können.

Im Laufe der Untersuchung kristallisierte sich eine Methode heraus, die am besten garantierte, dass die Ameisen nicht mit dem Abtransport der Brut oder gar mit dem Abwandern der Kolonie auf den starken Eingriff reagierten: Die Äste wurden möglichst bald nach der Rückkehr ins Labor in unterarm lange Stücke gehackt, sofort in luftdichte Plastikbehälter verpackt und für einige Stunden in die Tiefkühltruhe (ca. -18 °C) gelegt. So wurden die Ameisen betäubt und konnten auch später viel leichter abgesammelt werden.

Anschließend wurden die Äste mit einer Machete oder einem Messer geöffnet und rasch die betäubten Ameisen mit einer Pinzette gesammelt. Bedauerlicherweise mussten die Ameisen für die Untersuchung getötet werden. Pro Ast wurde versucht um die 30 Ameisen zu sammeln. Zusätzlich wurden ca. 10 Arbeiterinnen zur Artbestimmung in 96% Alkohol konserviert. Neben den Arbeiterinnen wurden, falls vorhanden, noch eingesammelt: geflügelte Geschlechtstiere, Puppen, Larven, von den Ameisen gehaltene *Coccoidea*, wobei letztere leider nur in sehr geringen Mengen gesammelt werden konnten und deshalb in der Analyse nicht berücksichtigt wurden. Des Weiteren wurden Proben des Pilzpatches vorsichtig aus den Domatien gekratzt. Trichiliumproben wurden generell von jeder Pflanze, von der MKs abgesammelt wurden, entnommen und zwar jeweils Proben eines jungen und eines alten Trichiliums. Die aufgenommenen Latex- und Stielproben konnten in der Analyse ebenso nicht berücksichtigt werden.

Auch diese Proben wurden mit Watte verschlossen und im Trockenschrank bei 35°C getrocknet. In Wien wurden die getrockneten Gewebe gegebenenfalls von Wattedpartikeln gereinigt. Zudem wurden die Trichilienproben bearbeitet: Mit einer Pinzette wurden die Trichome von den Trichilien gerupft, um sie separat zu untersuchen. Dabei wurde versucht möglichst wenige MKs mit in die Probe zu nehmen. Aufgrund der teilweise sehr geringen Größe junger MKs (Vgl. Kapitel 3.1.1: Anatomie, Morphologie und Entwicklung der Müller'schen Körperchen) gelang das mitunter sicherlich nicht zur Gänze. Dennoch wurde die Trennung vorgenommen, um so unterschiedliche Tendenzen in der Zusammensetzung des Trichiliums (mit Trichiliumgewebe, Trichomen, MKs) und der Trichome auszumachen.

2.3.2 Laboruntersuchungen der Proben

2.3.2.1 Methodenfindung zur Analyse aller Gewebe

Am Department for Molecular Systems Biology (University of Vienna) wurden unterschiedliche Methoden erprobt, um die beste Analysetechnik zu eruieren. Um Ergebnisse zu erzielen, die einen Vergleich mit den Inhaltsstoffen der Futterkörperchen anderer myrmekophytischer Pflanzen zulassen würden, wurden Voruntersuchungen mit dem Protokoll von Fischer et al. (2002) gemacht.

Mehrere Probeversuchsgänge zeigten jedoch, dass diese Methode bei geringer Probenmenge (10mg) schwer umsetzbar ist. Daher wurde ein Standard-Protokoll des Departments for Molecular Systems Biology ausgewählt. Die Analyse war damit einfacher durchzuführen, weniger fehleranfällig und führte zudem zu umfangreicheren Resultaten. Die Analyse (Extraktion, Derivatisation, GC-MS-Messung, Analyse mit Chromatoff) erfolgte leicht modifiziert nach Weckwerth et al. (2004).

2.3.2.2 Extraktion

10mg der Proben (MKs, etc.) wurden mit je fünf in Methanol gewaschenen Stainless-Metallkugeln homogenisiert. Anschließend wurden sie in einer Retsch-Mühle (Retsch MM400, RetschGmbH & Co KG, Haan, Germany) bei 30p für 30 Sekunden gemahlen, um die Zellen aufzuschließen. Je nach Gewebeart wurden sie so oft gemahlen, bis die Probe eine pulverige, nicht klumpende Masse darstellte. Bei schwer aufzubrechenden Geweben (etwa: Trichilium, tw. Insekten) wurde teilweise mehrere Minuten homogenisiert. Da der Homogenisierungsprozess auf Dauer zu viel Hitze erzeugt, wurden die Proben nach jedem Homogenisierungsschritt für mindestens eine Minute auf Eis gekühlt.

Für die Extraktion wurde 1ml MCW (=Methanol, Chloroform, MiliQ-Wasser im Verhältnis 2,5:1:0,5) zu jeder Probe pipettiert. Das MCW wurde stets lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt. Zudem wurde der gesamte Extraktionsprozess auf Eis durchgeführt.

Die Proben wurden für 8min auf Eis inkubiert und schließlich bei -4°C bei 14.000G für 4min zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abpipettiert und auf Eis gelagert, während das Pellet abermals mit 300µl MCW aufgeschlossen wurde. Nach dem Beifügen von MCW wurden die Epis beide Male für einige Sekunden auf einem Vortex geschüttelt, um die pulverisierten Proben mit dem Lösungsmittel zu mischen. Danach wurden die Proben erneut für 8min auf Eis inkubiert, bei 14.000 G und 4°C zentrifugiert und die Überstände abermals vorsichtig abpipettiert. Das überbleibende Pellet wurde bei -80°C für weitere Untersuchungen zwischengelagert. Die Überstände wurden in der Speedvac (Speed-vacconcentrator; Scan, Vac, DK) bei einem minimalen Vakuum von 0.001mbar für durchschnittlich etwa zweieinhalb Stunden verdampft und bis zur Derivatisation bei -20°C zwischengelagert.

2.3.2.3 Derivatisation

Für die Derivatisation wurde zunächst eine Methoxyamine-Hydrochloride-Pyridin-Lösung angefertigt. Dazu wurden 20mg MeOX (Sigma-Aldrich) mit 500µl Pyridin (Sigma-Aldrich) vermischt. Durch mehrmaliges Vortexen unter warmem Wasser wurde sichergestellt, dass sich beide Substanzen zur Gänze vermischen. Anschließend wurden je 20µl der Lösung auf die bei Zimmertemperatur aufgetauten Proben pipettiert, gevortext und für etwa zwanzig Sekunden zentrifugiert. Anschließend

wurden sie auf einem Thermoshaker bei 550-650rpm bei 30°C für 90min inkubiert. Währenddessen wurde MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) (Machery Nagel) mit Alkanen von C10-C40 (alle geraden Alkane, also C10, C12, C14 usw.), die in Hexan gelöst waren (50mg Alkane in einem Liter Hexan), (Sigma-Aldrich) versetzt, um für die Analyse die Berechnung eines Retentionsindex zu ermöglichen. Dazu wurden die bei -20°C gekühlten Alkane vorsichtig mit der Hand erwärmt und mit einer Spritze 30µl davon zu 1ml MSTFA-Lösung gespritzt.

Nach der Inkubation wurden 80µl des MSTFA-Alkan-Gemischs zu jeder Probe pipettiert. Bei Proben mit sehr geringem Trockengewicht (<5mg), wurden lediglich 40µl pipettiert. Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben im Thermoshaker bei 650rpm und 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur (~23°C) mit 14.000G für zwei Minuten zentrifugiert, 80µl bzw. 40µl in GC-Vials abpipettiert und diese mit Bördeverschluss (crimpcap) verschlossen und innerhalb maximal 48h gemessen.

2.3.2.4 GC-MS-Messung

Die Proben wurden mit GC-TOF-MS (LECO Pegasus® 4D GCxGC-TOF-MS, Mönchengladbach, Germany) gemessen. Die Injektion wurde mit einem split/splitless-Injektor unter einer konstanten Temperatur von 230°C durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 1µL. Aufgrund der unterschiedlichen Trockengewichte und der sehr verschiedenen Beschaffenheit der untersuchten Gewebe konnten nicht alle Proben in der gleichen Splitrate gemessen werden. Gemessen wurde splitless (ohne Verdünnung) und S5 (Verdünnung 1:5). Um die sensible Säule zu schonen, wurden nicht alle Gewebe splitless gemessen, da Voruntersuchungen gezeigt hatten, dass bestimmte Metabolite in bestimmten Geweben (etwa Trichome) besonders stark ausgeprägt waren. Da der Vergleich von MKs und Pilzpatch im Fokus der Untersuchung steht, wurden die Proben beider Gewebe splitless gemessen. Die Standard-Splitrate für die Untersuchung aller Gewebe betrug S5 (also eine 5fache Verdünnung). Um eine Vergleichbarkeit aller Gewebe zu gewähren, wurden auch drei MK-Proben und die vier Pilzpatchproben zusätzlich S5 gemessen. Zusätzlich wurde ein Mix mit internen Standards (QC-Mix) sowohl splitless als auch split5 mitgemessen (Tab. 2).

Tabelle 2: Anzahl der Proben in unterschiedlichen Verdünnungsraten (S5 = Splitrate 1:5, SL = splitless)

| S5 | Arbeiterinnen | Geschlechtst. | Larven | Puppen | MKs | Pilzpatch | Trichilium | Trichome |
|----|---------------|---------------|--------|--------|-----|-----------|------------|----------|
| n= | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 4 | 2 | 2 |
| SL | MKs | Pilzpatch | | | | | | |
| n= | 14 | 4 | | | | | | |

Die gaschromatographische Trennung wurde mit einer HP-5MS Säule (30m, ID 0.25mm, 0.25µm, Agilent Technologies) durchgeführt, wobei Helium als Trägergas mit einem Volumenstrom von 1ml min⁻¹ verwendet wurde. Die Temperatur betrug zunächst für eine Minute 70°C. Darauf folgte ein kontinuierlicher Temperaturanstieg von 9°C min⁻¹ bis zu 330°C, die für 7 Minuten beibehalten wurden. Die Massenspektren wurden mittels einer Detektor-Spannung (1550 V, electron impact ionization 70eV) mit einer Frequenz von 20 Spektren/Sekunde in einem Massen-Bereich von 40-600 Thomson erfasst (Weckwerth 2004).

2.3.3 Analyse der Proben

2.3.3.1 Analyse mit ChromaTof®

Die Analyse der Metabolite wurde mit dem Programm ChromaTof® (Leco) durchgeführt. Da auch Samples, die nur Alkane enthielten, gemessen wurden, konnte mit dem Mittelwert der Retentionszeiten ein Retentionsindex festgelegt werden, der einen geräteunabhängigen Vergleich mit Bibliotheksspektren vereinfacht. Die Massenspektren wurden mit einer department-internen Metaboliten-Bibliothek und der >Golm Metabolite Database< (Kopka et al., 2005) verglichen. Anschließend wurde mithilfe der Standards im QC-Mix eine Referenzliste erstellt, um so die gängigsten Metabolite, die im QC-Mix vertreten waren, zu eruieren.

Nachdem die Daten prozessiert worden waren, also alle Proben mit dem Referenzspektrum verglichen wurden, wurden die einzelnen Gewebe nach weiteren, nicht im QC-Mix enthaltenen Substanzen durchsucht, die, falls mit großer Sicherheit identifiziert, in die Referenzliste aufgenommen wurden. Für die Identifikation neuer Substanzen, die nicht über die Standards definiert werden konnten, wurden mehrere Kriterien herangezogen. Zum einen wurde darauf geachtet, ob das Spektrum der neu aufzunehmenden Substanz optisch mit dem Vergleichsspektrum der Bibliothek übereinstimmt. Zum anderen wurde überprüft, ob die berechnete >Similarity< einen gewissen Grenzwert überschreitet (über 850 bei sicherer Identifikation/und zumindest über 750 bei mit >_?< markierten Metaboliten). Zudem mussten die Retentionsindizes der Substanzen jenen der Bibliothek ungefähr entsprechen.

Substanzen, die nicht diesen Kriterien entsprachen, aber starke Peaks zeigten und noch immer mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden konnten (Großteil der Kriterien erfüllt und Similarity zumindest über 750), wurden mit einem Fragezeichen (>_?<) gekennzeichnet in die Referenzliste aufgenommen. Einige Substanzen, die in hoher Konzentration vorkamen oder nur gewebespezifisch auftraten, konnten keinem Bibliotheks-Spektrum zugeordnet werden, wurden aber aufgrund ihrer Relevanz dennoch als >Unknown< mitaufgenommen.

Schlussendlich konnte eine Referenzliste mit über 200 Substanzen erstellt werden, nach denen in jeder Probe gesucht wurde. Für jede Substanz wurde vom Programm automatisch eine Masse (Quant-mass) gewählt, die für das Spektrum typisch war und nicht von Massen in unmittelbarer Umgebung überlagert wurde. Die Area bzw. Areawerte (=Fläche des Peaks) dieser Masse wurden zur Analyse verwendet.

Anschließend wurde die Peakintegration jedes einzelnen Peaks nachkontrolliert. Falls die Peakfläche nicht zur Gänze automatisch erfasst wurde, wurde sie manuell nachgebessert. Diese äußerst langwierige Kontrollarbeit wurde deshalb durchgeführt, um die Liste an die unterschiedlichen Gewebstypen und Splitraten, die alle zu leichten Veränderungen im Spektrum führen konnten, anzupassen und ein einheitlich vergleichbares Ergebnis zu erreichen.

2.3.3.2 Nachbearbeitung in Excel

Die Area der identifizierten Substanzen wurden schließlich in das Programm Excel (Excel 2010 (Microsoft Corporation; Version: 14.0.71445.5000), in dem auch die statistische Auswertung durchgeführt wurde, übertragen. Zunächst wurden die Areawerte vereinheitlicht. Da bei der Derivatisierung alle aktiven Wasserstoffe durch Trimethylsilyl-Gruppen (TMS) ausgetauscht werden und durch Austauschaffinitäten mehrere Derivate entstehen können (Urbach 2012, Fagner 2012), sind viele Substanzen in unterschiedliche TMS-Derivate geteilt. Für die Analyse wurde die Area der unterschiedlichen TMS-Gruppen zusammengerechnet. Die Aminosäure Alanine etwa ist somit die Summe von Alanine (2TMS) und Alanine (3TMS). Zudem wurde die Substanzliste weiter vereinheitlicht, indem bei jenen Substanzen, die sowohl als BP (Byproduct) als auch als MP (Mainproduct) in die Referenzliste aufgenommen wurden, die BP-Area gestrichen wurde. Da das Verhältnis der einzelnen Proben bei BP und MP gleich bleibt, ist es ausreichend, lediglich vom MP auszugehen.

Abschließend wurde die Nomenklatur der Liste vereinfacht und es wurden Substanzkategorien etabliert. Um eine Literaturdiskussion zu erleichtern und das Weiterverwenden der Daten zu vereinfachen, wurde die englischsprachige Bezeichnung der Begriffe beibehalten (etwa >Alanine< statt >Alanin<). Die Metabolite wurden unterschiedlichen Substanzklassen zugeordnet, wobei versucht wurde lediglich einfache Überbegriffe zu verwenden. Die Kategorien beschränken sich daher auf Aminosäuren, Fettsäuren, Sterole und Kohlenhydrate, wobei Zuckersäuren und Zuckeralkohole allerdings nicht zu den Kohlenhydraten gerechnet wurden. Zur Klassifikation der Substanzen wurde das Verzeichnis pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, National Center for Biotechnology Information) benützt, wobei die ChEBI-Ontology zur Einteilung verwendet wurde. Die große Zahl an Substanzen, die den simplen Überkategorien nicht definitiv zugewiesen werden

konnten, wurde als >nicht_zuordenbar< definiert. Einige Substanzen mit zusätzlichen Gruppen konnten ebenso nicht mit Sicherheit klassifiziert werden und wurden ebenfalls als >nicht zuordenbar< bezeichnet. Jene Metabolite, die aufgrund der ähnlichen Spektren in den Bibliotheken nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden entweder der Kategorie >Not_annotated< oder einer der Substanzkategorien (etwa Kohlenhydrate bei Not_annotated_Polysaccharid) zugeordnet. Der Einfachheit halber wurden alle Kohlenhydrate, die aus mehreren Einfachzuckern bestanden, als Polysaccharide definiert und keine Einteilung in Oligo- und Polysaccharide vorgenommen)

Schließlich wurden mithilfe der Blanks mögliche Kontaminationen identifiziert. Um auszuschließen, dass es sich bei einer Substanz um eine Kontamination handelt, musste die Substanz in zumindest einem Gewebe die zehnmal so hohen Areawerte wie der Blank aufweisen. Es wurden also jeweils die Mittelwerte aller acht Gewebe in S5 und der beiden Gewebe in SL mit den 10fachen durchschnittlichen Areawerten der Blanks verglichen, und wenn dieser Wert größer als jedes Gewebe waren, die Substanz als Kontamination definiert und aus der Liste gelöscht.

2.3.3.3 Statistik

I Qualitative Analyse

Die qualitative Analyse wurde nur für die S5-Untersuchung durchgeführt, weil ein Vergleich zwischen den Geweben angestrebt wurde. Die qualitative Analyse berücksichtigt nicht die Menge der detektierten Substanzen, sondern gibt lediglich Aufschluss über deren Vorhandensein.

Dazu wurde das Vorkommen jeder Substanz in den unterschiedlichen Geweben (n=2-4) untersucht. Kam das entsprechende Metabolit, unabhängig von der gemessenen Area, in dem Gewebe in $\geq 75\%$ der Einzelproben vor, wurde es als vorhanden aufgenommen.

Zudem wurden die Gewebe Großgruppen/Reiche (Insekten: Arbeiterinnen, Larve, Puppen, Geschlechtstiere; Pflanze: MKs, Trichome, Trichilien; Pilzpatch: Pilzpatch) zugeordnet und erneut aufgenommen, wenn die Substanz in $\geq 75\%$ der Proben festgestellt werden konnte. Die Bezeichnung Reich für den Pilzpatch ist allerdings nur bedingt zulässig, weil sich in diesem Mikrohabitat sowohl die von Ameisen kultivierten Pilze (Chaetothyriales) als auch Bakterien finden und nicht nur Pilze allein. Dem Vergleich zwischen Pilzpatch und MKs wurde aufgrund der Arbeitshypothese besondere Aufmerksamkeit entgegengebracht.

Für die graphische Gestaltung der aussagekräftigsten Ergebnisse wurde das Programm Venny2.0 (Juan Carlos OLIVERO, bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny;) verwendet.

II Quantitative Analyse

Für die quantitative Analyse wurden die Area der untersuchten Substanzen auf das Gewicht normalisiert (=Area/Gewicht), um eine Vergleichbarkeit pro Milligramm Trockenmasse zu gewährleisten. Die quantitative Analyse wurde für die S5 und SL extra durchgeführt.

Bei der S5-Messung wurden von den acht unterschiedlichen Gewebetypen die Mittelwerte ($n=2-4$) der normalisierten Area genommen und je die $STABW/\sqrt{\text{Anzahl}}$ berechnet. Da bei der geringen Probenanzahl pro Gewebe sehr große Abweichungen entstehen, fiel die Entscheidung auf diese Angabe. Die im Text angegebenen Abweichungen (gekennzeichnet durch \pm) geben ebenso wie die Fehlerbalken in den Graphen die $STABW/\sqrt{\text{Anzahl}}$ wieder. Neben den acht Gewebetypen wurden auch die Mittelwerte der drei Großgruppen verglichen. Zusätzlich wurden die *Azteca*-Ameisen in juvenile Stadien (Larven und Puppen) und adulte Stadien (Arbeiterinnen und Geschlechtstiere) gegliedert. Zum Vergleich der Substanzen in einzelnen Geweben wurden T-Tests zwischen allen Geweben bzw. Gruppen durchgeführt. Als signifikante Unterschiede werden, falls nicht anders angeführt, Unterschiede zu 0.95% Signifikanz ($p\text{-Wert}=0.05$) verstanden.

Die untersuchte Area der Substanzen bezieht sich immer auf eine einzige Masse dieses Metabolits und es ist nicht zulässig, die Area zweier Substanzen mit unterschiedlichen Massenzahlen direkt zu vergleichen. Da aber eine absolute Quantifizierung über den mit-gemessenen QC-Mix zu zeitintensiv gewesen wäre und zudem lediglich die Hälfte der identifizierten Substanzen über den QC-Mix absolut quantifiziert werden könnten, wurde eine andere Methode zum Vergleich von Substanzen mit unterschiedlichen Massenzahlen herangezogen. Durch die Berechnung einer Ratio konnten die unterschiedlichen Dimensionen (=Massenzahlen) gekürzt werden. Da so lediglich ein Verhältnis angegeben wird (etwa MKs/Larven), konnten auch die Mittelwerte der Ratios angegeben werden. So konnte das durchschnittliche Verhältnis aller Gewebetypen für alle Substanzkategorien berechnet werden. Bei Ratio wurde meist das Gewebe mit den höheren Areawerten durch jenes mit den niedrigeren gerechnet. Wenn in einer der beiden verglichenen Gruppen die Substanz nicht nachgewiesen werden konnte, sich die Area also bei einer Gruppe auf 0 belief, wurde diese Substanz nicht zur Berechnung des Mittelwerts der Ratio herangezogen. Ratios entsprechen, wenn nicht anders angegeben, stets dem Mittelwert des Gewebetyps. Z.B. Ratio Arbeiterinnen/Larven drückt somit das Verhältnis des Mittelwerts der Arbeiterinnenproben zu dem Mittelwert der Larvenproben aus.

Zusätzlich wurde bei der S5-Untersuchung auch das Verhältnis einer Einzelsubstanz zum Mittelwert aller Gewebe herangezogen, um Vergleiche zwischen allen acht Geweben anstellen zu können.

Untersucht wurden bei der S5 und SL-Analyse zunächst sämtliche Metabolite aller Gewebe hinsichtlich der Ähnlichkeiten zwischen den Geweben. Die Unterschiede wurden mit einem T-Test auf Signifikanz getestet. Um Korrelationen bei den Gewebetypen zu finden, wurde eine Hauptkomponenten-Analyse (im Kommenden stets PCA-Analyse) mit COVAIN (Sun & Weckwerth 2012) durchgeführt. Nullstellen in den Proben wurden dabei durch die Hälfte des kleinsten Werts in der gesamten Tabelle ersetzt (Sun & Weckwerth 2012). Bei dem Vergleich zwischen Pilzpatch und MKs in der SL-Probe wurden die Daten logarithmiert (\log_{10}), um Unterschiede deutlicher zu machen, ansonsten wurde lediglich mit der normalisierten Area gerechnet. Die Substanzen, die für die größte Streuung entlang der Hauptkomponenten verantwortlich sind, wurden in Graphiken oder im Text hervorgehoben, wobei eine Auswahl der relevant erscheinenden Substanzen vorgenommen wurde und kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben wird.

Zusätzlich wurden auch die Substanzkategorien untersucht. Dazu wurde vor allem mit den erwähnten Ratios gearbeitet, um allgemeine Trends der Substanzkategorien feststellen zu können. Relevant wirkende Substanzen wurden hervorgehoben, wobei auch diese Auswahl keineswegs als vollständig betrachtet werden darf.

Bei den SL-Untersuchungen wurden die gleichen Methoden wie bei der S5-Untersuchung angewendet. Allerdings wurden bei der SL-Untersuchung auch MK-Proben, die technische Replikate darstellen, also Proben des gleichen Individuums, gemessen. Für die Vereinheitlichung der technischen Replikate wurde bei den zwei Proben mit je drei Replikaten der Median errechnet, während für eine Probe mit zwei technischen Replikaten ein Replikat aus der Analyse gestrichen wurde.

3 Resultate

3.1 Morphologisch-Anatomische Untersuchung

3.1.1 Anatomie, Morphologie und Entwicklung der Müller'schen Körperchen

Die MKs sind unmittelbar von Trichomen umgeben und werden in jüngeren Stadien vollständig von diesen überragt und bedeckt. Sie weisen in der Längsansicht eine ovale Form auf und sind an der Basis mit dem Trichiliumgewebe verbunden. Die Trichome umhüllen dabei die MKs dergestalt, dass sie von allen Seiten bedeckt sind, d.h., dass sich die Trichome auch über den MKs wieder wie ein Dach schließen (Fig. 1B-C). In der Aufsicht sind die jungen, im Trichompolster eingebetteten MKs nicht zu erkennen, sondern lediglich jene ausgewachsenen MKs, die teilweise auf der Oberfläche liegen.

Im ausgewachsenen Stadium scheinen sich nämlich die MKs von der Trichiliumbasis zu lösen und nach oben zu wandern. Teile der MKs ragen klar sichtbar aus den Trichomen heraus, mitunter ist der Großteil des MKs an der Oberfläche präsentiert. Ist letzteres der Fall, scheint keine Verbindung mit dem Basisgewebe mehr vorhanden zu sein (Fig. 1D).

Da unterschiedliche Gewebestrukturen unterschiedliche Grauwerte besitzen, lassen sich bei der CT-Analyse mit dem Programm Amira Gewebeebenen definieren. Entfernt man die Ebene der Trichome, wird eine große Anzahl MKs unterschiedlicher Entwicklungsstadien sichtbar (Fig. 2B). So wurden alleine in dieser Aufsicht, die nicht das gesamte Trichilium zeigt, 150 mittelgroße bis große MKs gezählt. Dabei handelt es sich um jene MKs, die entweder voll ausgewachsen (alle relativ gleich groß) oder zumindest halb so groß sind. Doch finden sich noch zahlreiche bedeutend kleinere MKs (etwa 470), die oft nur als weiße Punkte erkennbar sind. Insgesamt sind in Fig. 2B über 600 MKs zu erkennen.

Das 3D-Modell der MKs lässt auch Rückschlüsse über die Verteilung zu (Fig. 3A). Es zeigt sich, dass die MKs relativ gleichmäßig verteilt sind. Die Abstände zwischen voll entwickelten MKs sind deutlich größer als zwischen den kleinen MKs. Große MKs liegen somit meist weiter auseinander als solche kleinerer Entwicklungsstadien.

Im Detailausschnitt wirken die Entfernungen zwischen den MKs reduzierter und es wird deutlich, wie dicht die MKs nebeneinander liegen. Auch hier zeigt sich ein gewisser Trend, dass größere MKs weiter voneinander entfernt sind (Fig. 3C).

Auch bei den Lichtmikroskopischen Untersuchungen lagen nie zwei große MKs (Stadium 4 und 5) direkt nebeneinander (Fig. 6A-D). Kleine Stadien hingegen weisen mitunter sehr knappe Abstände auf und liegen sehr wohl oft direkt nebeneinander (Fig. 4C).

Die CT-Analyse zeigt zudem, dass die MKs direkt am Trichiliumgewebe sitzen und kaum aus dem Trichompolster, die sich wie ein Film über sie gelegt hat, ragen (Fig. 2C). Die äußersten Zellreihen sind deutlich heller gefärbt als das restliche Trichiliumgewebe. Da auch die MKs im Längsschnitt leuchtend hell gefärbt sind, lässt sich daraus ableiten, dass in den äußeren Zellreihen eine große Zahl von MKs gebildet wird.

Auch die Lichtmikroskopischen Untersuchungen geben Aufschluss über die **Entwicklung der MKs** (Fig. 4A-F). In der Initialphase der MK-Entwicklung beginnt zwei bis drei Zellschichten unter der Epidermis die Zellteilung, wie auch bereits in früheren Untersuchungen dokumentiert (Rickson 1976). Bei Stadium 1 handelt es sich somit um einige wenige Zellen (≤ 6 Zellen), die durch Zellteilung entstanden sind. Sie bilden allerdings bereits eine kugelige Struktur und sind dadurch bereits als ursprüngliches MK zu erkennen (Fig. 4A).

Die Zellen des MKs teilen sich weiter und beginnen relativ bald die Epidermis aufzuwölben. In dieser frühen Phase (Stadium 2) sind die beiden Wächterzellen, die sich aus Epidermiszellen differenzieren, sehr gut zu erkennen (Fig. 4B). Diese spezialisierten Zellen entstehen epidermal über den MKs. Wenn die Epidermis nach oben gedrückt wird, kommt es zu Teilungen in der Epidermis. Die neu entstandenen Zellen differenzieren sich rasch zu Wächterzellen, die strukturell an Stomata-Zellen erinnern und Stärke beinhalten (Rickson 1976). Diese Wächterzellen sind mitunter noch bei den ausgewachsenen MKs zu erkennen.

Im Stadium 3 ist die Zellteilung vorangeschritten und die MKs sind schon relativ deutlich zu erkennen. Sie wölben sich bereits aus der Epidermis heraus, sind allerdings noch deutlich im Trichiliumgewebe eingebettet. Das MK verfünff- bis versiebenfacht sich allerdings noch in der Größe (Fig. 4C).

Die Zellen des MKs teilen sich noch mehrfach und das MK nimmt weiter an Größe zu, bleibt aber noch mit dem Trichilium verbunden (Stadium 4) (Fig. 4D). Wenn das MK etwa zwei Drittel seiner Größe erreicht hat, beginnt laut Rickson (1976) die Produktion von Glykogenplastiden. Diese Plastiden scheinen sich während der MK-Entwicklung aus Chloroplasten zu differenzieren. Das gesamte MK reichert sich mit Glykogen an. Lediglich an der Basis des MKs ist wenig Glykogen nachzuweisen (Rickson 1976, Bischof et al. 2013).

Voll ausgewachsen, besteht ein MK im Längsschnitt etwa aus 500 Zellen und ist durchschnittlich etwa 700 μ m lang (Stadium 5) (Fig. 4E). Da wenig voll entwickelte MKs untersucht wurden und die Größe

natürlich von der Schnittebene abhängt, handelt es sich bei diesem Längenmaß lediglich um einen Näherungswert. An der Basis des MKs werden die Zellen allerdings länglicher und richten sich im rechten Winkel zum Trichilium aus.

Nachdem die volle Reife erreicht ist, schnürt sich das MK ab. Die Zellen an der Basis bilden einen schmalen Sockel, bis das MK nur mehr über wenige Zellen mit dem Trichiliumgewebe verbunden ist (Fig. 5A). Entlang dieser Verbindungslinie reißen die Zellwände auf und das MK löst sich vom Versorgungsgewebe, wobei oft eine konkave Bruchstelle am MK zu erkennen ist (Fig. 5B). Sowohl in Schnitten des alten als auch des neuen Trichiliums finden sich einige MKs, die sich eindeutig vom Gewebe gelöst haben und nur mehr von Trichomen umgeben sind. Es ist zwar nicht auszuschließen, dass dies auf die mechanische Beeinträchtigung bei der Präparation zurückzuführen ist, doch zeigen Feldbeobachtungen, dass sich die MKs auch selbstständig auf der Oberfläche des Trichopolsters präsentieren.

3.1.2 Anatomie und Morphologie der Trichome

Die Trichome bilden einen dichten Polster auf der Oberfläche des Trichiliums (Fig. 1A). Dieser Trichopolster besteht aus braunen Trichomen (im Kommenden: >einfache Trichome<) und längeren weiß gefärbten Trichomen (im Kommenden: >komplexe Trichome<). Die Bezeichnung der Trichomtypen folgt Rickson (1976).

Die untere Hälfte der **einfachen Trichome** ist gerade ausgebildet und hell gefärbt. . Ab der Hälfte der Länge beginnen sich die Trichome zu kräuseln und weisen eine braune Farbe auf. Dieser Farbverlauf lässt sich vermutlich durch unterschiedliche Pigmentierung erklären. Die Trichome sind im unteren Bereich sehr dicht angeordnet und grenzen unmittelbar aneinander. Im oberen Bereich sind sie zwar noch immer sehr dicht, doch die Trichome sind gekräuselt, ihre Anordnung diffuser (Fig. 1C). Im Bereich der Spitze sind sie oft brüchig.

Die Trichome konnten im CT nur beschränkt wiedergeben werden. Die einfachen Trichome sind auch bei 10facher Vergrößerung nur schwer voneinander abzugrenzen. Sie sind nur als gefärbte Schicht zu erkennen, die aber eine klar abgegrenzte Linie aufweist, die stark darauf hindeutet, dass alle einfachen Trichome dieselbe Länge aufweisen. Auch in der CT ist allerdings zu erkennen, dass Trichome das gesamte Trichilium dicht überziehen (Fig. 2C, Fig. 3C-D). Im Längsschnitt zeigt sich, dass die Trichome die MKs überragen. Sowohl die einfachen als auch die komplexen Trichome haben dabei stets die gleiche Länge, wobei die komplexen die einfachen Trichome um etwa ein Drittel deren Länge überragen.

Die Schnitte zeigen, dass die Trichome aus mehreren, relativ großen, linear angeordneten, uniseraten Zellen aufgebaut sind, die sich aus Epidermiszellen entwickelt haben (Fig. 5C). Jene Bereiche der Epidermisschicht des Trichiliums, die nicht von MKs durchbrochen werden, bestehen fast zur Gänze aus Trichomen, das heißt, dass fast jede Epidermiszelle in ein Trichom umgewandelt wurde (Rickson 1976).

Aufgrund der Dicke der Schnitte (ca. 7µm) konnten die Trichome in ihrer gesamten Dimension allerdings nicht erfasst werden. Zumeist lässt sich die gesamte Anordnung des Trichoms lediglich erahnen, weil sie räumlich aus dem Objektbereich hinausragen. Allerdings wird auch in den LM-Untersuchungen deutlich, dass die Trichome so lang sind, dass sie die MKs einhüllen.

Der zweite Typ von Trichomen, die **komplexen Trichome**, sind bereits mit dem Binokular klar von den einfachen Trichomen zu unterscheiden. Deutlich längere, gänzlich weiße Trichome ragen aus dem Trichompolster (Fig. 1E). Weiße Zellen weisen oft auf tote Zellen ohne Inhalt hin (Mayer, persönliche Mitteilung).

Die komplexen Trichome scheinen teilweise dicker zu sein als die einfachen Trichome. Dieser Eindruck bestätigt sich auch in der CT-Untersuchung. Während die einfachen Trichome kaum zu erkennen sind, konnten die dickeren komplexen Trichome deutlich erfasst werden (Fig. 3C-D).

Die Haare kräuseln sich nicht, sondern ragen gerade aus der Trichomoberfläche heraus und weisen stellenweise lediglich eine sanfte Krümmung auf. Am Ende laufen die Trichome spitz zu (Fig. 1E). Die komplexen Trichome sind nicht so häufig wie die filigranen, einfachen Trichome, scheinen aber gleichmäßig über das gesamte Trichilium verteilt zu sein (Fig. 1E, Fig. 6C-D). Die dünn zulaufenden Spitzen der langen Trichome sind oft im oberen Bereich geknickt oder leicht gebogen, was aber auch auf die Präparation des Objekts zurückgeführt werden könnte (Fig. 3C-D). An den Rändern des Trichiliums scheinen die weißen Trichome besonders stark ausgeprägt. Zudem wirken sie in diesem Bereich noch länger (Fig. 1F).

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass es sich bei den komplexen Trichomen um dickwandige, relativ große Zellen, die an der Basis stark verbreitert sind, handelt. Dieser zweite Trichomtyp fand sich in den untersuchten Schnitten jedoch relativ selten (Fig. 5D).

Rickson (1976) verweist darauf, dass dieser komplexere Trichomtyp aus einem multizellularen, basalen Absatz unter einem einzelligen, dickwandigen Trichom besteht. Zudem sind diese komplexen Trichome von mehrzelligen Trichomen umgeben (Rickson 1976). Bei den untersuchten Präparaten konnten sie jedoch lediglich alleinstehend nachgewiesen werden (Fig. 5D).

3.1.3 Anatomie und Morphologie des Trichiliums

Beim Vergleich der beiden Proben (altes bzw. neues Trichilium) fällt auf, dass sich die frühen Entwicklungsstadien der MKs unterscheiden (Fig.6 A-D). Bei dem älteren Trichilium bewirken die frühen MK-Stadien um einiges später eine Aufwölbung der Epidermis. Während es bei dem jungen Trichilium in sehr frühen Stadien bereits zur Aufwölbung kommt (5-10 Zellen), finden sich bei dem älteren Trichilium deutlich größere Stadien (etwa mit 30 Zellen), die noch zur Gänze in der Schicht positioniert sind und keinerlei epidermale Wölbung verursachen (Fig. 7A-B). Zudem ist auch das gesamte Trichilium im jüngeren Stadium stärker gebogen, während das ältere Organ sehr flach ist (Fig. 6/A-D). Diese Beobachtungen beziehen sich allerdings auf lediglich zwei Proben. Zusätzlich ist die Position des Längsschnitts nicht uneingeschränkt vergleichbar.

Die unterschiedliche Schichtung des Trichiliumgewebes lässt sich im Überblick bereits erkennen. Direkt unterhalb der Epidermis findet sich eine Schicht von etwa 5 Zellreihen, die relativ kompakt angeordnet sind und gleichmäßig verdickte Zellwände aufweisen. Die Zellen beinhalten Chloroplasten mit Stärkekörnern (Rickson 1976). Darunter lässt sich eine weitere Zellschicht erkennen, die aus deutlich größeren Zellen (etwa 10 Zellreihen) aufgebaut ist, deren Ecken deutlich verdickt sind. Die Zellen werden mit der Entfernung zur Epidermis immer größer (Rickson 1976).

Darunter befinden sich die vasikulären Bündel. Das Versorgungsgewebe ist sehr dicht ausgeprägt und durchzieht den gesamten Gewebebereich unter dem Trichilium (Fig. 2D). Die Leitbündel sind zudem sehr mächtig ausgeprägt (Fig. 2B).

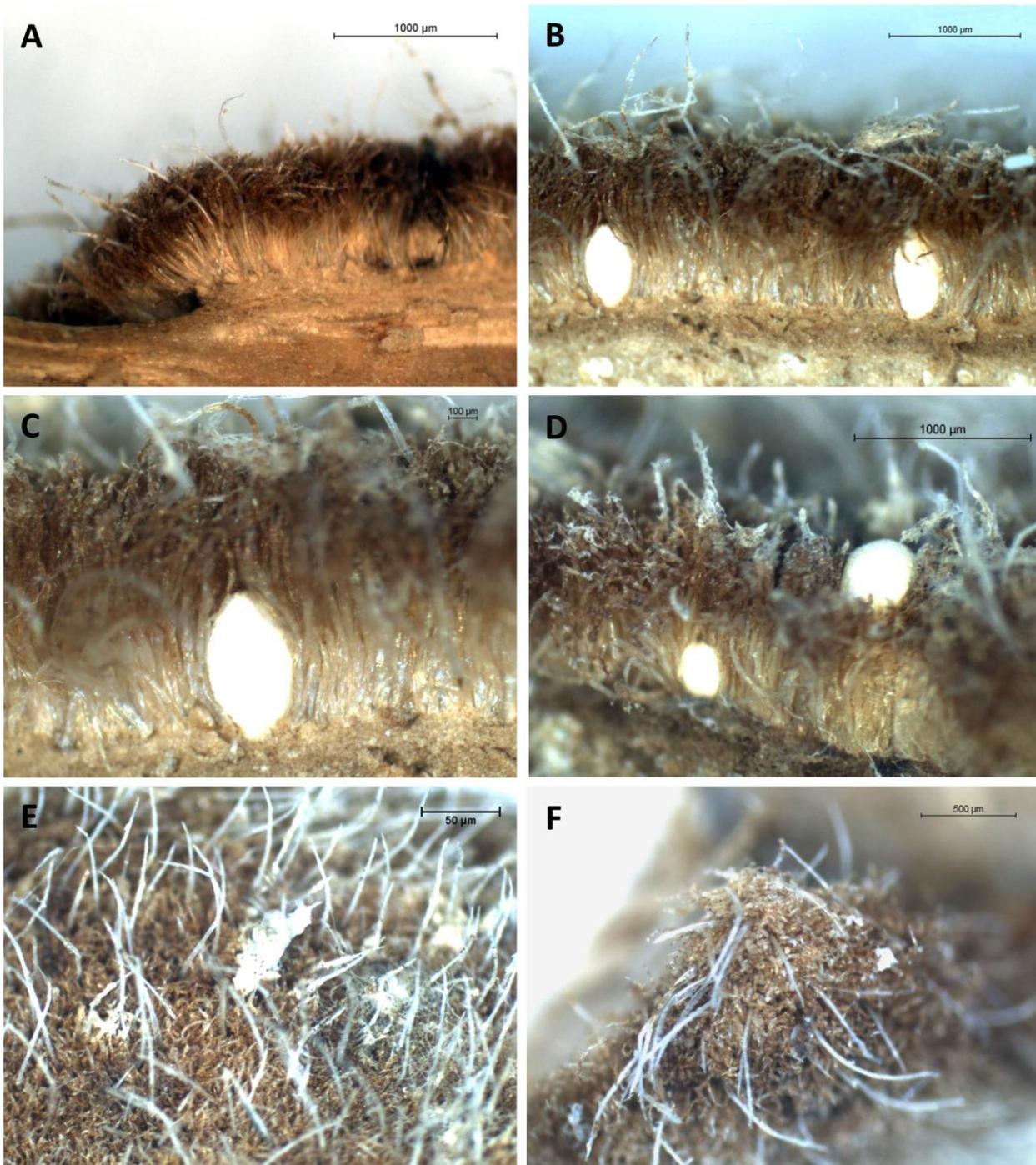


Fig. 1: Binokular-Untersuchungen eines Trichiliums

A. Teilansicht Trichilium; Trichome bilden eine dichte Masse. **B.** Wachsende MKs von Trichomen schützend umhüllt. **C.** Trichome (an der Basis weiß, im oberen Bereich braun) ummanteln MK. **D.** Ausgewachsene (deutlich größere) MKs werden an der Oberfläche präsentiert. **E.** Braune Trichome bilden dichte Matte, durchdrungen von längeren weißen Trichomen. **F.** Lange, weiße Trichome finden sich besonders häufig an den Rändern bzw. Ecken des Trichiliums.

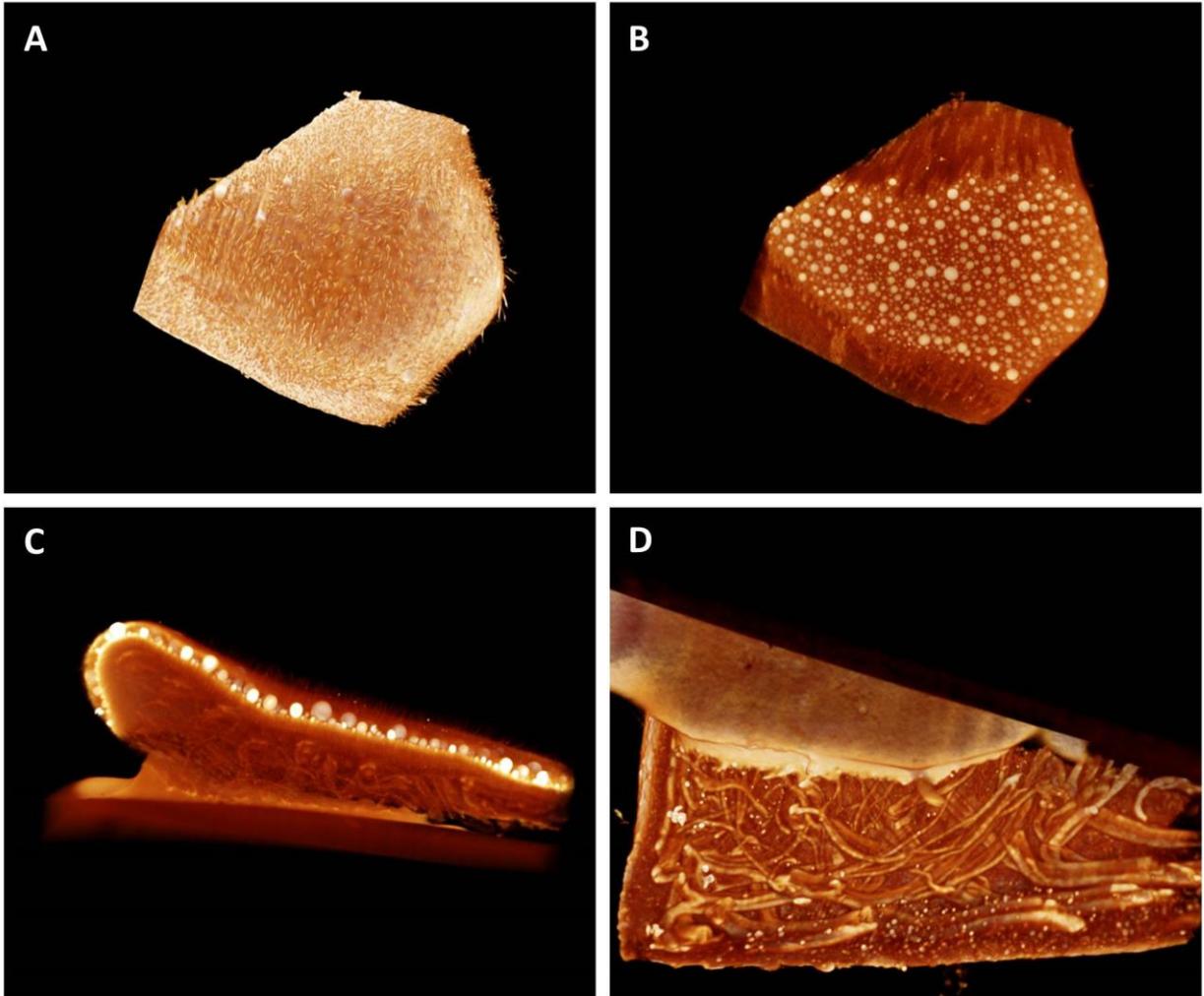


Fig. 2: Computertomographische Untersuchung des Trichiliums **A.** Aufsicht auf Trichilium (jung). **B.** Aufsicht auf das selbe Trichilium, allerdings Trichome transparent, Anzahl der MKs erkennbar. **C.** Schnitt durch Trichilium. **D.** Gefäßbündel unter der Trichilienschicht.

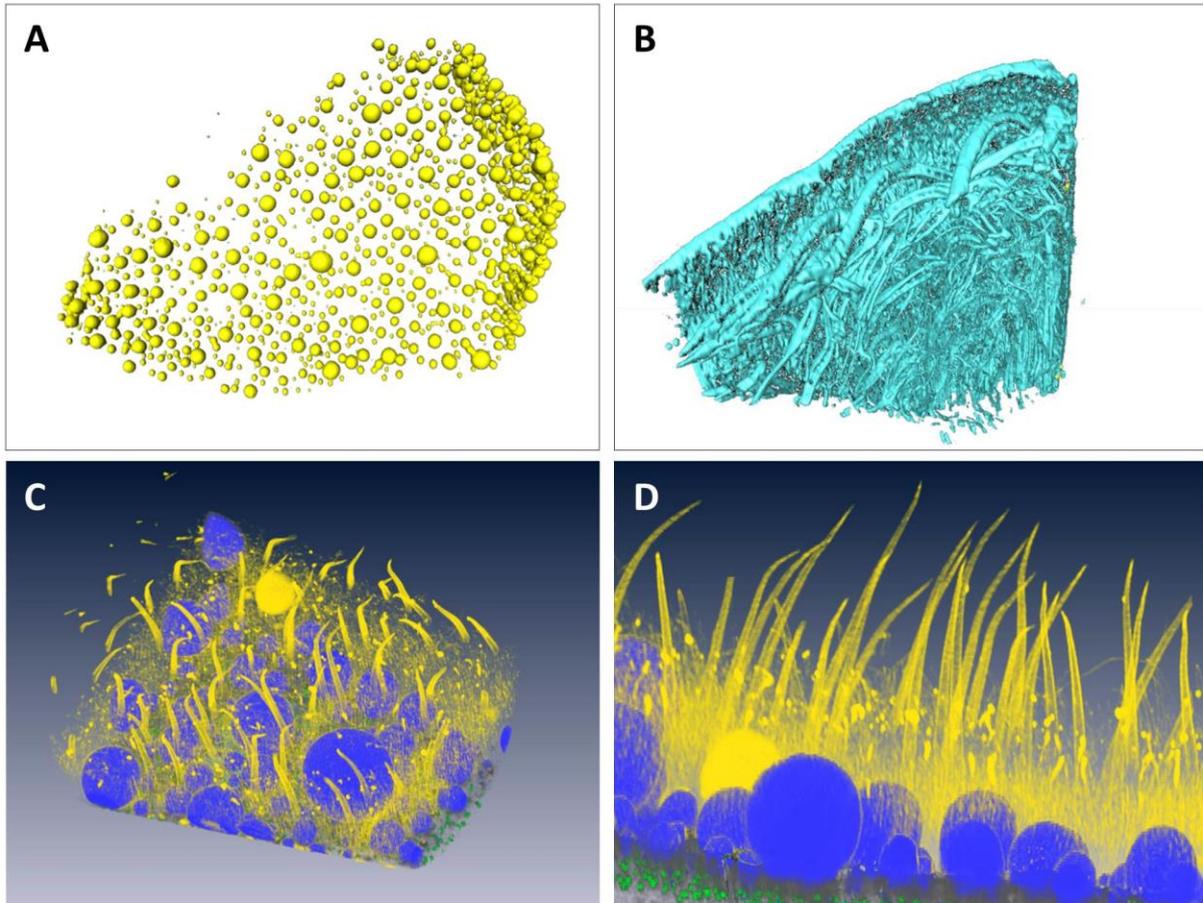


Fig.3: Computertomographische Untersuchung; Details **A.** Hervorgehobene MKs, große Anzahl an MKs; regelmäßige Verteilung. **B.** Hervorgehobene Leitbündel, sehr intensive Versorgung mittels großer Anzahl von Leitbündeln. **C.** Detailansicht der Trichommatte, zwei unterschiedliche Trichomtypen, dicht nebeneinander liegende MKs. **D.** Detailansicht Trichommatte, beide Trichomtypen überragen MKs unterschiedlicher Entwicklungsphasen.

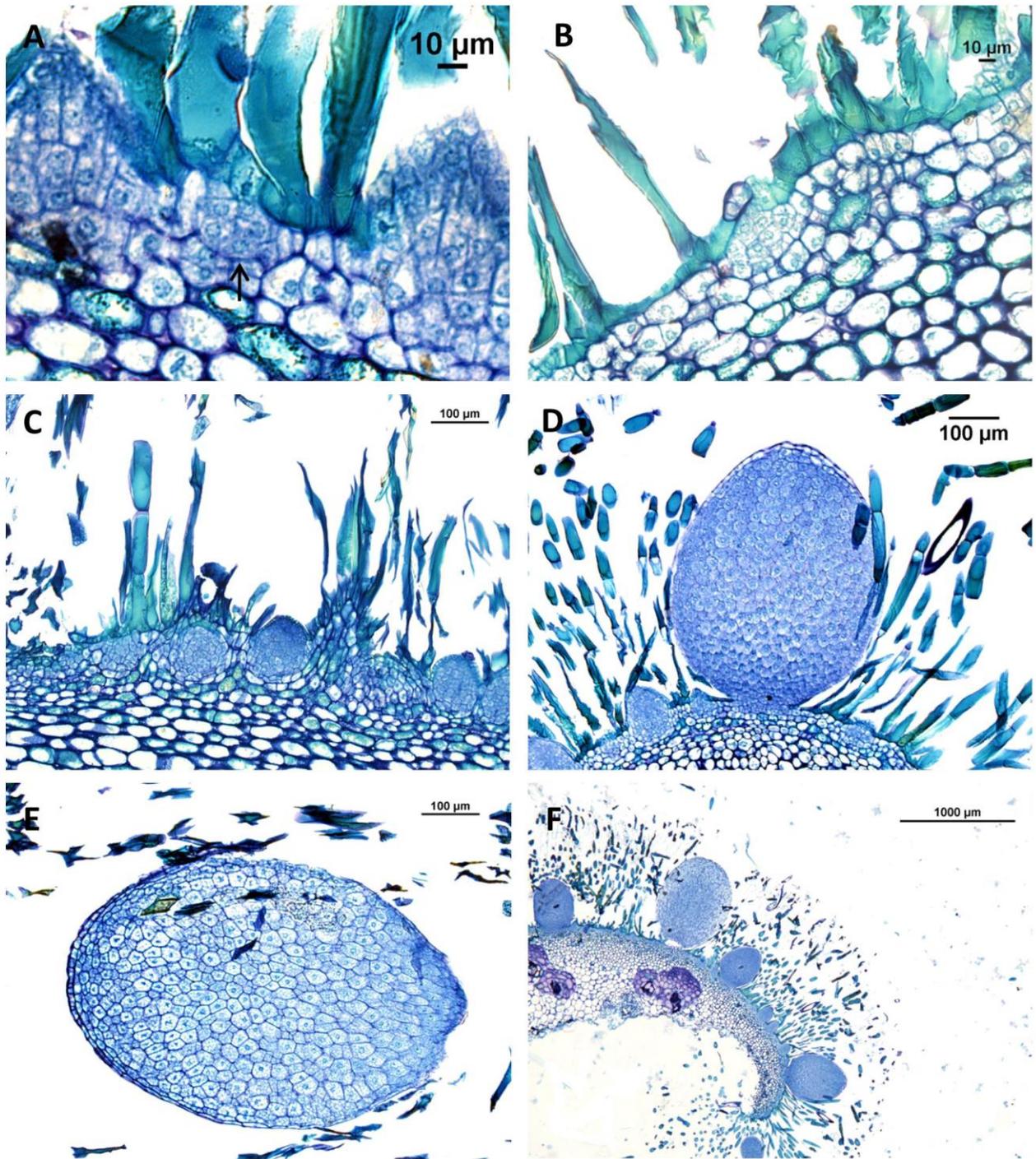


Fig. 4: Entwicklung der MKs **A.** Stadium 1 (5/6-zellig); durch Pfeil markiert, daneben bereits leichte Aufwölbung. **B.** Stadium 2 bereits mit leichter Aufwölbung, mit beiden Wächterzellen auf der Spitze der Wölbung. **C.** Stadium 3, bereits größere MKs (ca. 100µm). **D.** Stadium 4; etwa zu 2/3 ausgewachsen; noch mit Trichilium verbunden. **E.** Stadium 5; endgültige Größe (ca. 700µm lang), etwa 500 Zellen, Loslösung von Trichilium. **F.** Überblick über das Trichilium, unterschiedliche Stadien zu erkennen.

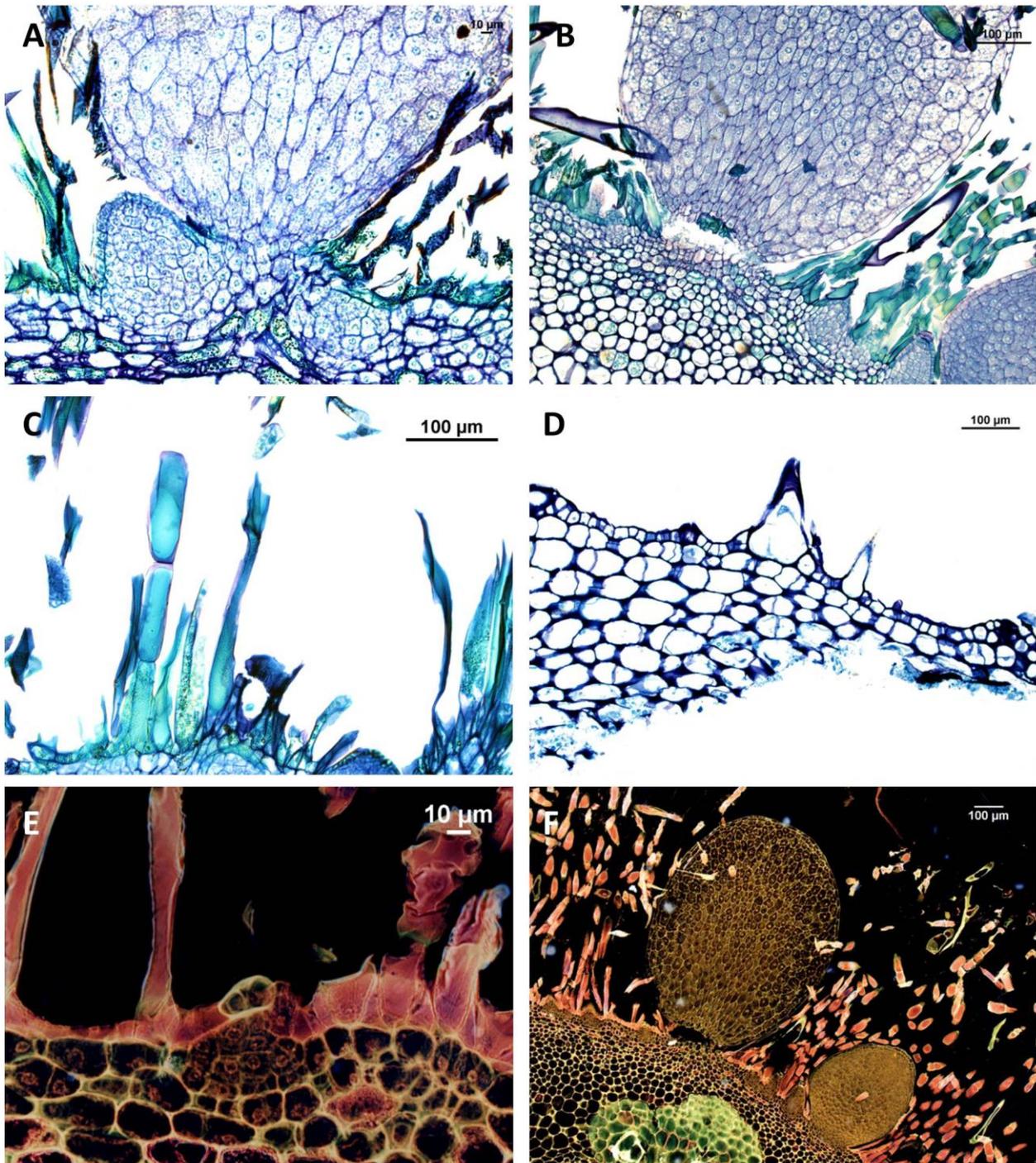


Fig. 5: Anatomische Details des Trichiliums A. MK über schmalen Bereich noch mit Trichiliumgewebe verbunden. B. losgelöstes MK. C. einfache Trichome, mehrzellig und einzellig. D. komplexe Trichome tulpenförmig. E. Die beiden Wächterzellen mit MK in sehr frühem Entwicklungsstadium, (Foto invertiert). F. Vasikuläre Bündel (grün), Trichome (rot); alle Trichome Bestandteil der einzelligen Schicht der Epidermis.

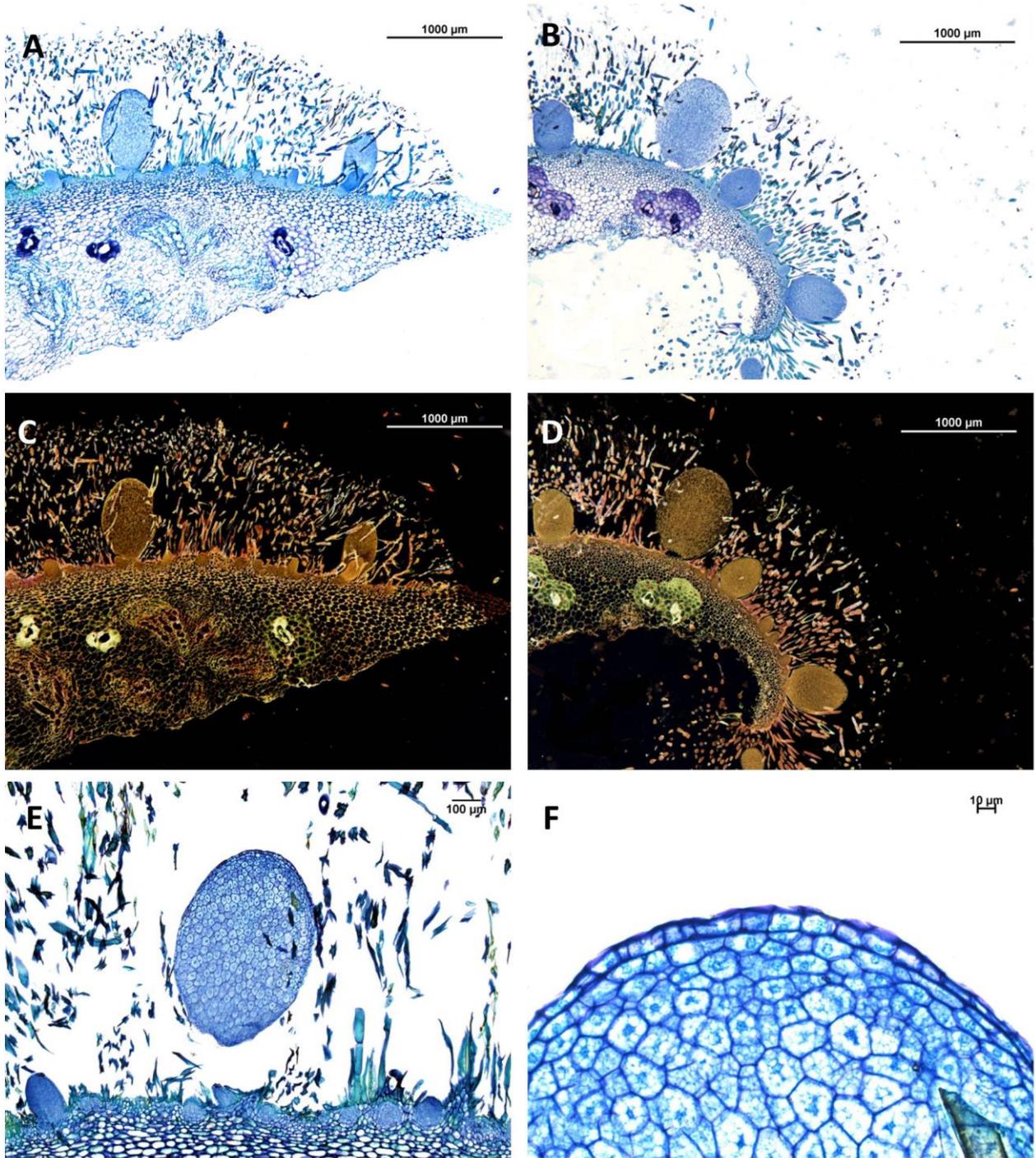


Fig. 6: Vergleich eines alten und jungen Trichiliums A. altes Trichilium. B. junges Trichilium. C. altes Trichilium, (Foto invertiert). D. junges Trichilium, (Foto invertiert). E. MK, umgeben von angeschnittenen Trichomen, verschiedene jüngere Stadien zu erkennen. F. Detailaufnahme MK.

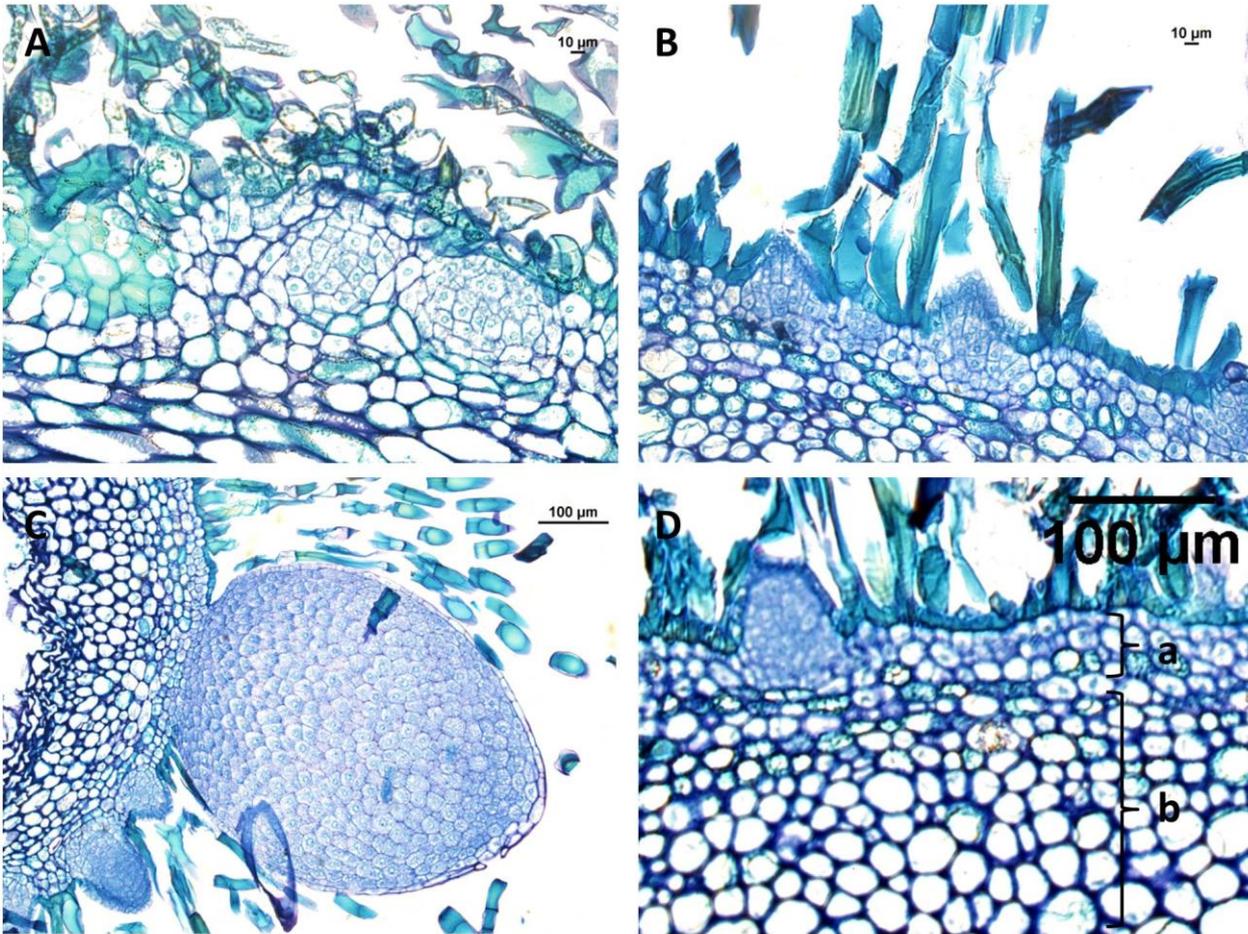


Fig. 7: Vergleich altes und junges Trichilium; Details

A. altes Trichilium, Stadium 2 noch keine epidermale Aufwölbung. **B.** junges Trichilium, Stadium 2, deutliche epidermale Aufwölbung, obwohl aus weniger Zellen bestehend; auch Stadium 1 zu erkennen. **C.** Wächterzellen auf Stadium 4. **D.** Trichiliumschichten; **a.** gleichmäßig verdickte Zellen, kompakt angeordnet **b.** größere Zellen, mit verdickten Ecken, mit Entfernung zur Epidermis größer werdend.

3.2 Ethologische Untersuchung

Es gelangen zwar wiederholt Aufnahmen der Königin, das Filmen von relevantem Verhalten ist jedoch eher selten. Die Königinnen reagierten auf das Einführen des Endoskops zunächst meist mit dem Abtasten der Linse bzw. des Störungsbereichs und zogen sich danach aus dem Blickfeld zurück, kehrten aber oft später wieder in den Fokus zurück. Meist tasteten die gefilmten Königinnen die Internodienwand ab oder verharrten reglos. Auch das intensive Putzen des Kopfes wurde beobachtet.

Der Transport von MKs oder das Düngen von Pilzgewebe konnten nicht beobachtet werden. Es konnte jedoch eine Königin (*A. cf. alfari*) dabei gefilmt werden, wie sie etwas auf den Boden des Internodiums platzierte. Die Königin öffnete dabei ihre Mandibeln und schien eine geleeartige, elastische Substanz hervor zu würgen (Fig. 8D).

Bei einer Pflanze konnten zwei Königinnen im gleichen Domatium festgestellt werden. Die Königinnen unterschieden sich farblich stark, es handelt sich um eine große gelbe Königin der Art *A. xanthochroa* und eine kleinere, dunklere, wahrscheinlich eine *A. alfari* (Fig. 8C). Ein Kampf zwischen den beiden Königinnen konnte zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet werden.

Zudem wurde eine relativ kleine Kolonie mit einigen Arbeiterinnen gefilmt. Es konnte zwar auch die Königin dieser Kolonie gefilmt werden, doch wurden keine auffälligen Interaktionen aufgezeichnet.

Bei größeren Kolonien (mit Arbeiterinnen) wurde nur alarmiertes und aggressives Verhalten gegenüber dem Endoskop beobachtet. Die Ameisen reagierten auf die Einführung des Endoskops oft mit dem Abtransport von Puppen und Larven. Des Weiteren wurde eine kartonartige Struktur gefilmt (Fig. 8E).

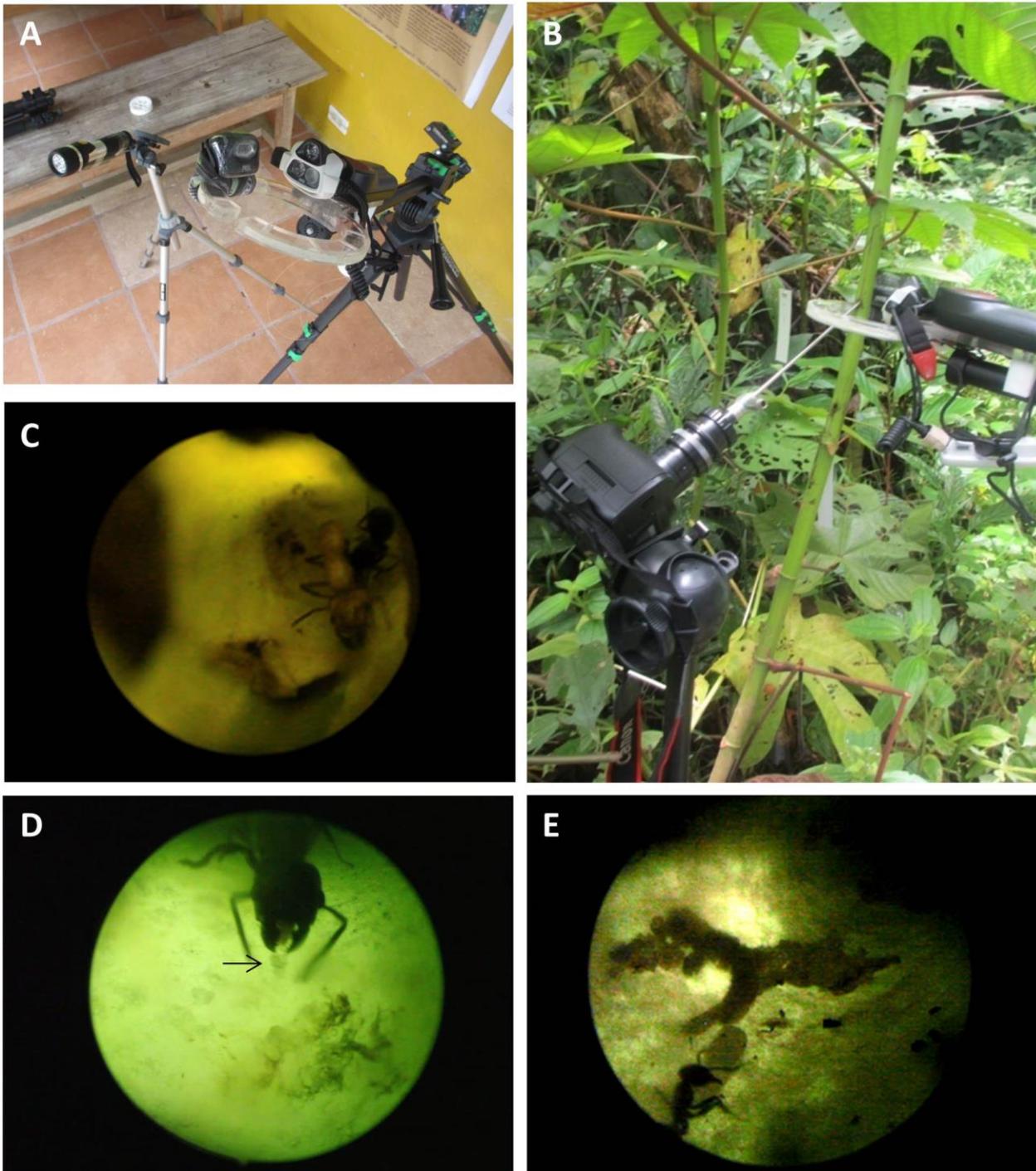


Fig. 8: Ethologische Untersuchungen **A.** Beleuchtungsapparatur, verbessert mit Stirnlampen mit sehr starker Leuchtkraft. **B.** Filmaufnahmen bei junger *Cecropia* sp. **C.** Zwei Ameisenköniginnen (helle Färbung: *A. xanthochroa*; dunkle Färbung: *A. cf. alfari*) in einem Domatium, mittels Endoskop aufgenommen; Stoppbild Videoaufnahme. **D.** Königin beim Hervorwürgen einer Substanz, mittels Endoskop aufgenommen, Stoppbild Videoaufnahme. **E.** Arbeiterinnen mit Puppe vor Karton-Struktur, mittels Endoskop aufgenommen, Stoppbild Videoaufnahme, Weißabgleich vorgenommen.

3.3 Analyse der Metabolite

3.3.1 Qualitative Analyse (S5)

Eine detaillierte Tabelle, die das Vorkommen sämtlicher Substanzen und ihr Vorhandensein in $\geq 75\%$ der Probemenge in allen Geweben bzw. Großreichen zeigt, findet sich im Anhang (Fig. Anhang 2).

Von insgesamt 147 in die Liste aufgenommenen Substanzen konnten in den verschiedenen Geweben durchschnittlich 95 ± 6 Substanzen festgestellt werden. Bei der Untersuchung der Organismenreiche wurde deutlich, dass die meisten Substanzen bei den Insekten nachgewiesen werden konnten (103 bei $n=15$), während bei den Pilzpatches (76 bei $n=4$) und Pflanzen (67 bei $n=7$) in $\geq 75\%$ der Fälle deutlich weniger Substanzen vorhanden waren.

Dass mehr Substanzen in den einzelnen Entwicklungsstadien der Ameisen zu finden sind, zeigt sich auch in den einzelnen Geweben (Tab. 3). Die Insektenstadien unterscheiden sich in ihrer Anzahl lediglich durch höchstens 3 Substanzen. In jedem Insektengewebe finden sich aber stets mindestens 20 Metabolite mehr als in den anderen untersuchten Gewebetypen.

Tabelle 3: Anzahl der festgestellten Substanzen in den Geweben.

| Insekten | | | | Pflanzen | | | Mikroorg |
|------------|------------|--------|--------|----------|-----|------------|-----------|
| Arbeiteri. | Geschltst. | Puppen | Larven | Trichome | MKS | Trichilium | Pilzpatch |
| n=4 | n=3 | n=4 | n=4 | n=2 | n=3 | n=2 | n=4 |
| 111 | 110 | 109 | 108 | 87 | 85 | 76 | 75 |

3.3.1.1 Vergleich Insekten

Obwohl sich die Insektengewebe in der Menge der detektierten Substanzen stark gleichen, zeigte sich bei paarweisem Vergleich der Gewebetypen mittels Venn-Diagrammen, dass durchschnittlich 100 ± 1 Substanzen in jedem Insektengewebe vorkommen, während durchschnittlich 10 ± 1 Substanzen exklusiv in je einem der beiden Gewebe aufscheinen. Bei dieser Gegenüberstellung wurde deutlich, dass sich Puppen und Geschlechtstiere (5 bzw. 6 Substanzen exklusiv) und Larven und Puppen (6 bzw. 7 Substanzen exklusiv) am meisten ähneln.

Beim Vergleich aller vier Insektenstadien zeigt sich, dass 91 Substanzen in allen vier Geweben vorkommen und in Geschlechtstieren und Puppen je nur eine Substanz exklusiv im jeweiligen Gewebe nachgewiesen wurde (Geschlechtstiere: Not_annotated_Polysaccharid_RI_2846; Puppen: Histidine). Zwei Substanzen kommen ausnahmslos in den Larven vor (Larven: Trehalose, Not_annotated_RI_2080.1) während sieben Metabolite ausnahmslos in den Ameisen vorkommen

(Ameisen: Azelaic acid, Itaconic acid_?, Pinitol, Stigmasterol_?, Not_annotated_Polysaccharid_mglw.-_Nigerose_?, Not_annotated_RI_1650.6, Not_annotated_RI_2249.2).

3.3.1.2 Vergleich Reiche

Der Vergleich der Großgruppen (Fig. 10) zeigt, dass 47 Substanzen sowohl in Insekten, Pflanzen als auch dem Pilzpatch vorkommen. Von den 147 Substanzen der Referenzliste beider Splitraten konnten in der S5 Messung in den drei Großreichen 125 Substanzen in $\geq 75\%$ der Proben nachgewiesen werden. Über ein Drittel dieser festgestellten Substanzen (37.6%) ist somit in allen Großgruppen vertreten. Von den 10 identifizierten Fettsäuren kommt ein Großteil (7) in allen Reichen vor. Die sowohl bei Insekten, Pflanzengewebe und Pilzpatch in $\geq 75\%$ der Probemenge nachgewiesene Fettsäuren sind: Hexadecanoic acid, Tetradecanoic acid_?, Hexadecenoic acid, 9-(Z)-Octadecenoic acid, Docosanoic acid, Heptadecanoic acid und Decanoic acid. Zudem wurden in allen Reichen 8 Aminosäuren gefunden (4 nicht-proteinogene: Aspartic acid, Butyric acid-3-amino-, Glutamic acid, Pyroglutamic acid, sowie 4 proteinogene, davon 3 essentielle: Glycine, Isoleucine; Serine und Valine). Weiters wurden 5 Kohlenhydrate [Fructose, Glucose, Hexose_A, Maltose und Sucrose] und zwei Sterole (Campesterol und beta-Sitosterol) nachgewiesen.

Die meisten exklusiv vorkommenden Substanzen finden sich bei den Insekten. 35 Substanzen (28%) wurden ausnahmslos bei den Insekten nachgewiesen. Bei auffallend vielen dieser Substanzen (7) handelt es sich um Aminosäuren. Die exklusiv in den Insekten vorkommenden Aminosäuren sind: Arginine [-NH₃], Cysteine_?, Homocysteine, Homoserine, Lysine, Methionine sowie Ornithine. Zudem konnten noch drei Saccharide (Hexose_D, Tagatose_? und Not_annotated_Polysaccharid_RI_2755.8) exklusiv im Insektengewebe nachgewiesen werden.

Im Pilzpatch wurden 13 exklusive Substanzen (9.6%) nachgewiesen. Drei Saccharide (Hexose_B, Trehalose, Pentose_A) und zwei Sterole (Fucosterol_?, Stigmasterol_?) wurden nur bei dem Pilzpatch in $\geq 75\%$ der Proben nachgewiesen. Die letzte Großgruppe der Pflanzen hat lediglich 3 nicht näher kategorisierbare Substanzen (2.4%) exklusiv.

Die 10 Substanzen (8%), die Insekt und Pilzpatch gemeinsam haben, aber nicht im Pflanzengewebe vorkommen, umfassen zwei Aminosäuren (Leucine - essentiell, Tyrosine – nicht-essentiell) und eine Fettsäure (Dodecanoic acid). Jene 11 Substanzen (8.8%), die exklusiv in Insekten und Pflanzen vorkommen, umfassen wiederum eine ungewöhnlich hohe Anzahl von sechs Aminosäuren. Bei den exklusiv in Insekten und Pflanze, nicht aber im Pilz vorkommenden Aminosäuren handelt es sich um: Alanine, Asparagine, Glutamine, Phenylalanine, Proline und Threonine. Zudem kommen noch ein Sterol (Cholesterol) und zwei Saccharide (Hexose_C, Not-annotated_Polysaccharid_RI_2952.2)

ausschließlich bei Insekten und Pflanze vor. Jene 6 Substanzen (4.8%), die nur sowohl in Pflanze als auch im Pilzpatch in $\geq 75\%$ vorkommen, aber nicht in den Ameisen nachgewiesen werden konnten, beinhalten ein Kohlenhydrat (Galactose) und eine langkettige Fettsäure (Tetracosanoic acid).

Der Vergleich der Reiche deutet bereits darauf hin, dass die verschiedenen Substanzklassen in den jeweiligen Organismen-Reichen unterschiedlich häufig vorkommen (es finden sich beispielsweise viele Aminosäuren in den Insekten, aber nicht im Pilzpatch). Die Unterschiede werden noch deutlicher, wenn man die Verteilung der Substanzklassen in den einzelnen Reichen untersucht (Tab. 4). Angeführt werden nur die zu $\geq 75\%$ der Probenmenge in den Reichen dokumentierten Metabolite.

Insgesamt konnten **23 Aminosäuren** (von 24 bei der Untersuchung definierten) bei der Analyse der Großgruppen in zumindest einem der Reiche in $\geq 75\%$ der Probenmenge nachgewiesen werden. Lediglich Histidine konnte bei der qualitativen Analyse der Reiche nicht festgestellt werden. Aminosäuren sind im Pilzpatch am schwächsten vertreten. Von den 23 in zumindest einem der Reiche vorhandenen Aminosäuren konnten 10 (43%) im Pilzpatch zu $\geq 75\%$ nachgewiesen werden. Im Pflanzengewebe fanden sich 14 (61%) der Aminosäuren, während in den Insekten alle 23 (100%) der in den Reichen nachgewiesenen Aminosäuren in $\geq 75\%$ der Proben vorhanden waren.

Es wurden **14 Kohlenhydrate** (von 18 bei der Untersuchung definierten; exklusive Zuckeralkohole und Zuckersäuren) in zumindest einem der drei Großreiche zu $\geq 75\%$ nachgewiesen. Lediglich Melibiose, Raffinose, Not_annotated_Polysaccharid_mglw_Nigerose? und Not_annotated_Polysaccharid_RI_2846 konnten nicht zu $\geq 75\%$ nachgewiesen werden. Es wurden 8 Kohlenhydrate (57%) im Pflanzengewebe, 9 Kohlenhydrate (64%) im Pilzpatch und 10 Kohlenhydrate (71%) in den Insekten in $\geq 75\%$ der Proben nachgewiesen.

Es kamen **9 Fettsäuren** (von 10 bei der Untersuchung definierten) in zumindest einem Großreich in über $\geq 75\%$ der Proben vor. Lediglich Hexanoic acid konnte in keinem Reich in über $\geq 75\%$ der Fälle festgestellt werden. Zudem kamen 7 (78%) dieser 9 Substanzen in allen Reichen vor. In Insekten- und Pflanzengewebe waren insgesamt 8 Fettsäuren (89%) vorhanden, im Pilzpatch 9 (100%) Fettsäuren.

Es konnten **5 Sterole** (also alle 5 bei der Untersuchung definierten) zumindest in einem Reich in $\geq 75\%$ der Probenmengen nachgewiesen werden. Zwei der Sterole (Campesterol, beta-Sitosterol) traten in allen Reichen auf. In Insekten und Pflanzen konnten je 3 (Campesterol, beta-Sitosterol und Cholesterol_?), im Pilzpatch 4 (Campesterol, beta-Sitosterol, Fucosterol_?, Stigmasterol_?) unterschiedliche Sterole in $\geq 75\%$ der Proben nachgewiesen werden.

Tabelle 4: Anzahl der Vertreter der jeweiligen Substanzklassen in den Großreichen

| | Gesamt | Insekten (<i>Azteca</i>) | Pilzpatch | Pflanze (<i>Cecropia</i>) |
|--|--------|-------------------------------|-----------|--------------------------------|
| Proben | n=26 | n=15 | n=4 | n=7 |
| Anzahl nachgew. Substanzen ($\geq 75\%$) | 125 | 103 | 76 | 67 |
| Aminosäuren | 23 | 23 | 10 | 14 |
| Saccharide | 14 | 10 | 9 | 8 |
| Fettsäuren | 9 | 8 | 9 | 8 |
| Sterole | 5 | 3 | 4 | 3 |
| Nicht klassifiziert | 74 | 59 | 44 | 34 |

3.3.1.3 Vergleich Gewebe (MKs - Pilz)

Beim Vergleich von MKs und Pilzpatch (Fig.9) zeigte sich, dass die beiden Gewebe 60 Substanzen gemeinsam haben, die in $\geq 75\%$ der Proben nachgewiesen werden konnten. In den MKs wurden 25 Substanzen, im Pilzpatch 16 Substanzen exklusiv festgestellt. 71% der in den MKs gefundenen Substanzen kommen auch im Pilzpatch vor, 29% der Metabolite sind exklusiv für die MKs. 79% der gefundenen Substanzen des Pilzpatches kommen auch in den MKs vor, während 21% der Substanzen nur im Pilzpatch nachgewiesen wurden.

Auffallend viele (9) Aminosäuren wurden nur in den MKs nachgewiesen. Bei den exklusiv in den MKs vorkommenden Aminosäuren handelt es sich um die proteinogenen Alanine, Asparagine, Glutamine, Lysine, Phenylalanine, Proline, Threonine, und die nicht-proteinogenen Homoserine und Ornithine. Zudem kommen je ein Saccharid (Not_annotated_Polysaccharid_RI_2952.2) und ein Sterol (Cholesterol_?) exklusiv in den MKs vor. Im Pilzpatch wurden exklusiv drei Kohlenhydrate (Hexose_B, Pentose_A, Trehalose) und ein Phytosterol (Stigmasterol) festgestellt

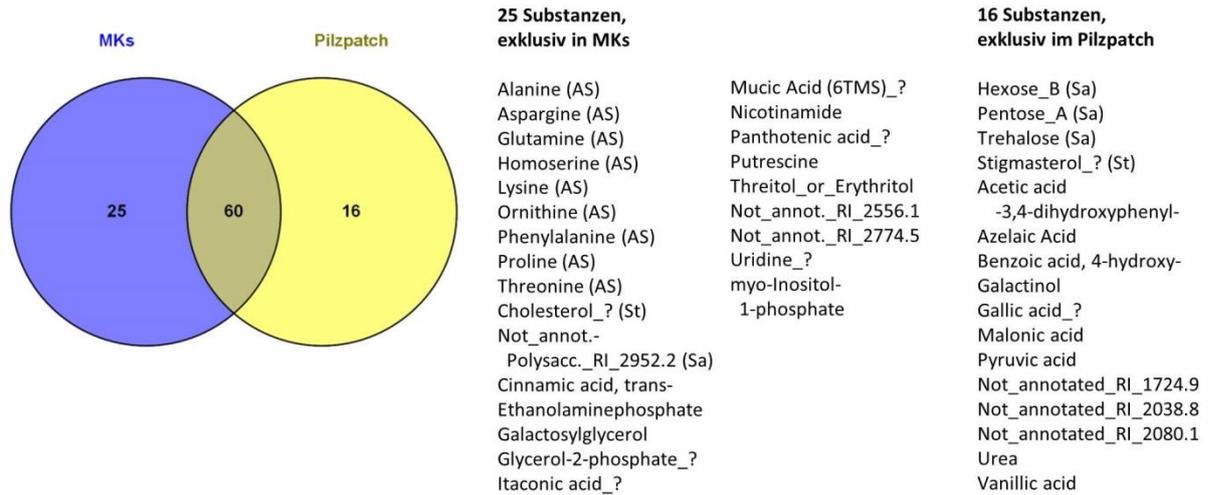


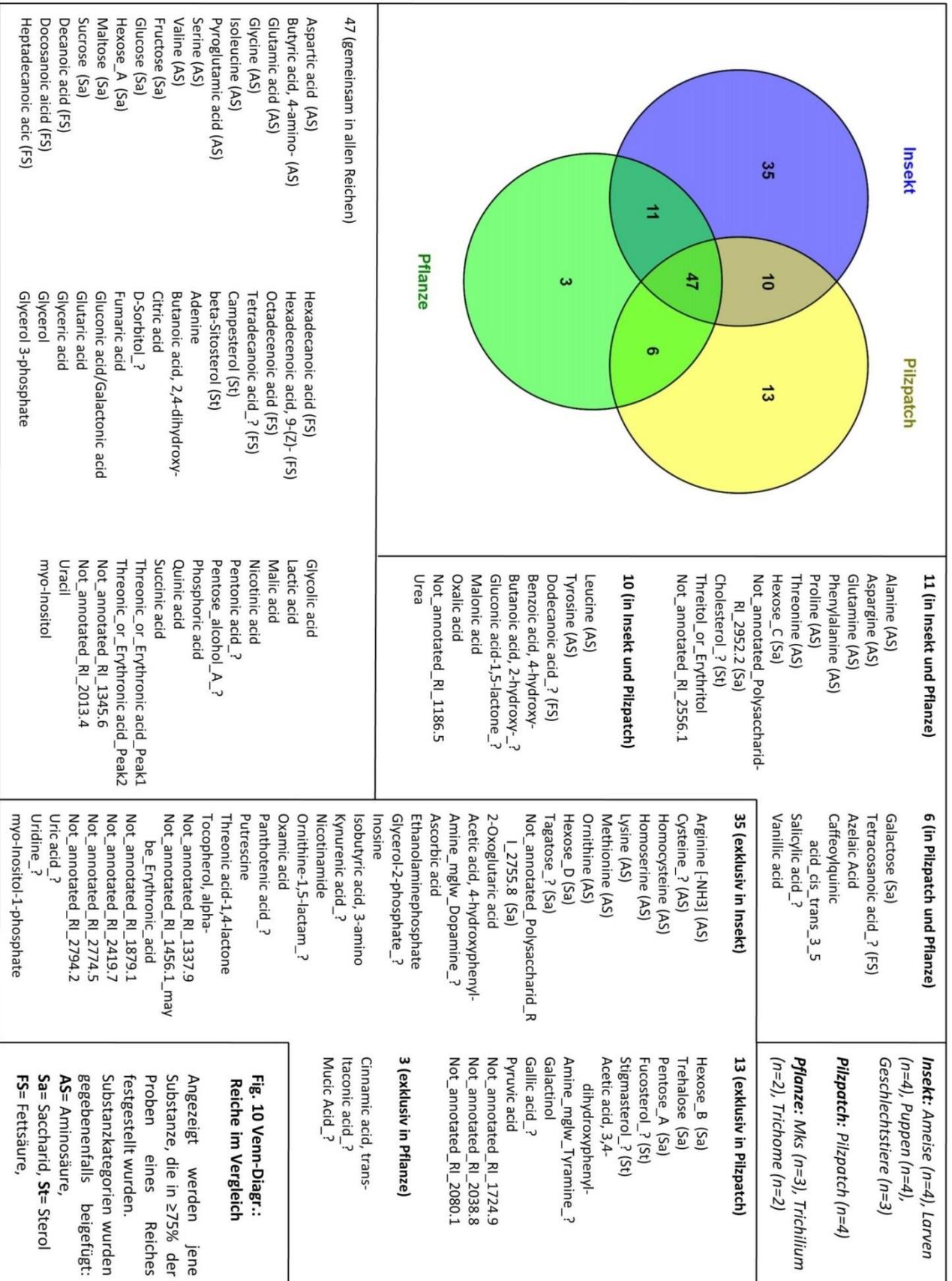
Fig. 9: Venn-Diagr. Vergleich MKs-Pilzpatch

Lediglich die exklusiven Substanzen sind ausgeführt. Substanzkategorien wurden abgekürzt. **AS**=Aminosäure, **Sa**=Saccharid (Kohlenhydrate), **St**=Sterol

3.3.1.4 Vergleich Gewebe (MKs/Pilz - Insektenstadien)

Vergleicht man die MKs mit den verschiedenen *Azteca*-Gewebe (Puppen, Larven, Geschlechtstieren, Arbeiterinnen) wird deutlich, dass nur wenige der in $\geq 75\%$ der Proben vorkommenden Substanzen exklusiv in den MKs zu finden sind. Nur 7 Substanzen (9%) kommen im Vergleich mit Puppen oder Larven jeweils exklusiv in den MKs vor und nur 8 Substanzen (11%) beim Vergleich mit Geschlechtstieren oder Arbeiterinnen. Insgesamt handelt es sich um 14 Substanzen, die sich bei den MKs zumindest von einem der Insektenstadien unterscheiden. Lediglich drei dieser Substanzen kommen in keinem einzigen Insektenstadium vor, sondern nur in den MKs. Bei den Substanzen handelt es sich um Caffeoylquinic acid_cis_trans_3_5, Cinnamic acid, trans- und Tetracosanoic acid_?.

Im Pilzpatch wurden weniger Substanzen als in den MKs festgestellt, zudem unterscheidet sich der Pilzpatch deutlich von den Insektenstadien. Vergleicht man Pilzpatch und Arbeiterinnen kommen 15 Substanzen exklusive im Pilzpatch vor. Beim Vergleich mit Geschlechtstieren, Larven und Puppen sind je 16 Substanzen exklusiv im Pilzpatch vorhanden. Insgesamt gibt es 24 Substanzen, die sich von zumindest einem der Insektenstadien unterscheiden. 8 der Substanzen teilen die Pilze mit keinem einzigen Insektenstadium. Die acht Metabolite sind die zwei nicht näher bestimmbareren Saccharide Hexose_B und Pentose_A, wie bei den MKs Caffeoylquinic acid_cis_trans_3_5, und Tetracosanoic acid_?, und Galactinol, Gallic acid_?, Not annotated_RI_2038.8 und Vanillic acid



47 (gemeinsam in allen Reichern)

- Aspartic acid (AS)
- Butyric acid, 4-amino- (AS)
- Glutamic acid (AS)
- Glycine (AS)
- Isoleucine (AS)
- Pyroglutamic acid (AS)
- Serine (AS)
- Valine (AS)
- Fructose (Sa)
- Glucose (Sa)
- Hexose_A (Sa)
- Maltose (Sa)
- Sucrose (Sa)
- Decanoic acid (FS)
- Docosanoic acid (FS)
- Heptadecanoic acid (FS)
- Hexadecanoic acid (FS)
- Hexadecenoic acid, 9-(Z)- (FS)
- Octadecenoic acid (FS)
- Tetradecanoic acid_? (FS)
- Campesterol (St)
- beta-Sitosterol (St)
- Adenine
- Butanoic acid, 2,4-dihydroxy-
- Citric acid
- D-Sorbitol_?
- Fumaric acid
- Gluconic acid/Galactonic acid
- Glutaric acid
- Glyceric acid
- Glycerol
- Glycerol 3-phosphate

- Glycolic acid
- Lactic acid
- Malic acid
- Nicotinic acid
- Pentonic acid_?
- Phenose_alcohol_A_?
- Phosphoric acid
- Quinic acid
- Succinic acid
- Threonic_or_Erythronic acid_Peak1
- Threonic_or_Erythronic acid_Peak2
- Not_annotated_RI_1345,6
- Not_annotated_RI_2013,4
- Uracil
- myo-Inositol

- Glycolic acid
- Lactic acid
- Malic acid
- Nicotinic acid
- Pentonic acid_?
- Phenose_alcohol_A_?
- Phosphoric acid
- Quinic acid
- Succinic acid
- Threonic_or_Erythronic acid_Peak1
- Threonic_or_Erythronic acid_Peak2
- Not_annotated_RI_1345,6
- Not_annotated_RI_2013,4
- Uracil
- myo-Inositol

Fig. 10 Venn-Diagr.:
Reiche im Vergleich

Angezeigt werden jene Substanze, die in >=75% der Proben eines Reiches festgestellt wurden. Substanzkategorien wurden gegebenenfalls beigefügt:

AS= Aminosäure,
Sa= Saccharid, St= Sterol
FS= Fettsäure,

3.3.2 Quantitative Analyse

3.3.2.1 S5-Untersuchung

I Vergleich der Gewebe

a Anzahl der signifikanten Unterschiede

Um zu beurteilen, welche Gewebe sich stark voneinander unterscheiden und welche nur wenige Unterschiede aufweisen, wurde die Anzahl der signifikanten Unterschiede (0.95%) herangezogen.

Beim Vergleich der Gewebe ergeben sich große Schwankungen in der Anzahl der signifikanten Unterschiede (Tab. 5; Fig. 11). Während bei manchen Gewebetypen lediglich 2 der 147 untersuchten Substanzen signifikant unterschiedlich sind (Larven vs. MKs und Larven vs. Puppen), sind in anderen Geweben bis zu 95 Substanzen (Geschlechtstiere vs. Pilzpatch) verschieden (Fig. 11). Im Durchschnitt unterscheiden sich zwei beliebige Gewebe in 33 ± 4.6 Substanzen signifikant.

Die **MKs** weisen im Vergleich mit den anderen 7 Geweben durchschnittlich 20 ± 6 Substanzen auf, die sich signifikant unterscheiden. Die kleinste Anzahl an signifikanten Unterschieden wurde, wie erwähnt, im Vergleich mit den Larven (2), Puppen (4), dem Trichilium (12) und Trichomen (16) eruiert. Beim Vergleich zwischen Pilzpatch und MKs unterscheiden sich 28 Substanzen signifikant. Die meisten signifikanten Unterschiede treten beim Vergleich zu Geschlechtstieren (33) und Ameisen (45) auf.

Der **Pilzpatch** unterscheiden sich durchschnittlich in 62 ± 9 Substanzen von jedem anderen Gewebe. Die geringste Anzahl an signifikanten Unterschieden besteht beim Vergleich mit den MKs (28), ansonsten ist die Anzahl der Unterschiede des Pilzpatches im Vergleich mit anderen Geweben stets größer als der höchste Wert an Unterschieden bei den MKs. Im Vergleich mit den Puppen (46), dem Trichilium (48) und Trichomen (53) zeigt sich eine hohe Anzahl signifikanter Unterschiede. Die höchste Menge signifikanter Unterschiede besteht aber mit den Larven (73) Arbeiterinnen (90) und Geschlechtstieren (95). Die höchste Anzahl signifikanter Unterschiede ist beim Pilzpatch somit im Vergleich mit den Insektenstadien, mit Ausnahme der Puppen, zu sehen (Fig. 11).

Die **Arbeiterinnen** unterscheiden sich von den anderen 7 Gewebetypen im Durchschnitt in 44 ± 9 Substanzen signifikant, wobei die geringste Anzahl an Unterschieden zu den Puppen (24) besteht, während sie sich am deutlichsten vom Pilzpatch (90) unterscheiden. Bei den **Geschlechtstieren** gibt es im Durchschnitt 40 ± 10 signifikante Unterschiede zu den anderen Geweben, wobei die größte Ähnlichkeit mit den Puppen (10) besteht. Die größte Menge an Unterschieden tritt im Vergleich mit dem Pilzpatch (95) auf. Bei den **Larven** unterscheiden sich durchschnittlich 24 ± 9 Substanzen, wobei die geringsten Unterschiede zu den MKs (2) und Puppen (2) bestehen, während sich die höchste

Anzahl an signifikant unterschiedlichen Substanzen im Vergleich mit dem Pilzpatch (73) zeigt. Die **Puppen** unterscheiden sich nur in 18 ± 6 Substanzen von den restlichen Gewebetypen. Die Puppen sind somit durchschnittlich am wenigsten von allen anderen 7 Gewebetypen differenziert. Die geringste Anzahl signifikant unterschiedlicher Substanzen wurde im Vergleich der Puppen mit den Larven (2) festgestellt, während die meisten Unterschiede im Vergleich mit dem Pilzpatch (46) auftreten. Im Durchschnitt unterscheidet sich das **Trichilium** signifikant mit 30 ± 7 Substanzen, wobei die geringste Anzahl im Vergleich mit den Trichomen (11) besteht. Die größte Anzahl an Unterschieden hingegen zeigt sich im Vergleich mit den Ameisen (51). Bei den **Trichomen** sind durchschnittlich 29 ± 6 Substanzen signifikant verschieden, wobei die geringsten Unterschiede zum Trichilium (11) bestehen, die meisten Substanzen sich hingegen signifikant beim Vergleich mit dem Pilzpatch (53) unterscheiden (Fig. 11).

Tabelle 5: Anzahl der signifikanten Unterschiede zu den anderen Geweben im Durchschnitt

| Arbeiteri. | Geschlt. | Puppen | Larven | MKs | Trichilium | Trichome | Pilzpatch |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 44 ± 9 | 40 ± 10 | 18 ± 6 | 24 ± 9 | 20 ± 6 | 30 ± 7 | 29 ± 6 | 62 ± 9 |

Alle Entwicklungsstadien von *Azteca* sind daher am unterschiedlichsten zum Pilzpatch, ebenso die Trichome, während bei den Trichilien der größte Unterschied zu den Ameisen besteht (51), dicht darauf (48) folgt allerdings der Pilzpatch.

Die vier Entwicklungsstadien der Ameisen unterscheiden sich untereinander im Schnitt um 19 ± 4 Substanzen, wobei die eindeutig geringsten Unterschiede zwischen Larven und Puppen (2) bestehen, gefolgt von Geschlechtstieren vs. Puppen (10). Am meisten unterschiedliche Substanzen wurden bei den Arbeiterinnen vs. Geschlechtstieren (29) bzw. bei den Ameisen vs. Larven (27) festgestellt.

Die pflanzlichen Gewebetypen unterscheiden sich lediglich in 13 ± 2 Substanzen, wobei MKs und Trichome (16) die meisten signifikanten Unterschiede aufweisen. MKs und Trichilium (12) bzw. Trichome und Trichilium (11) weisen etwas weniger signifikante Unterschiede auf.

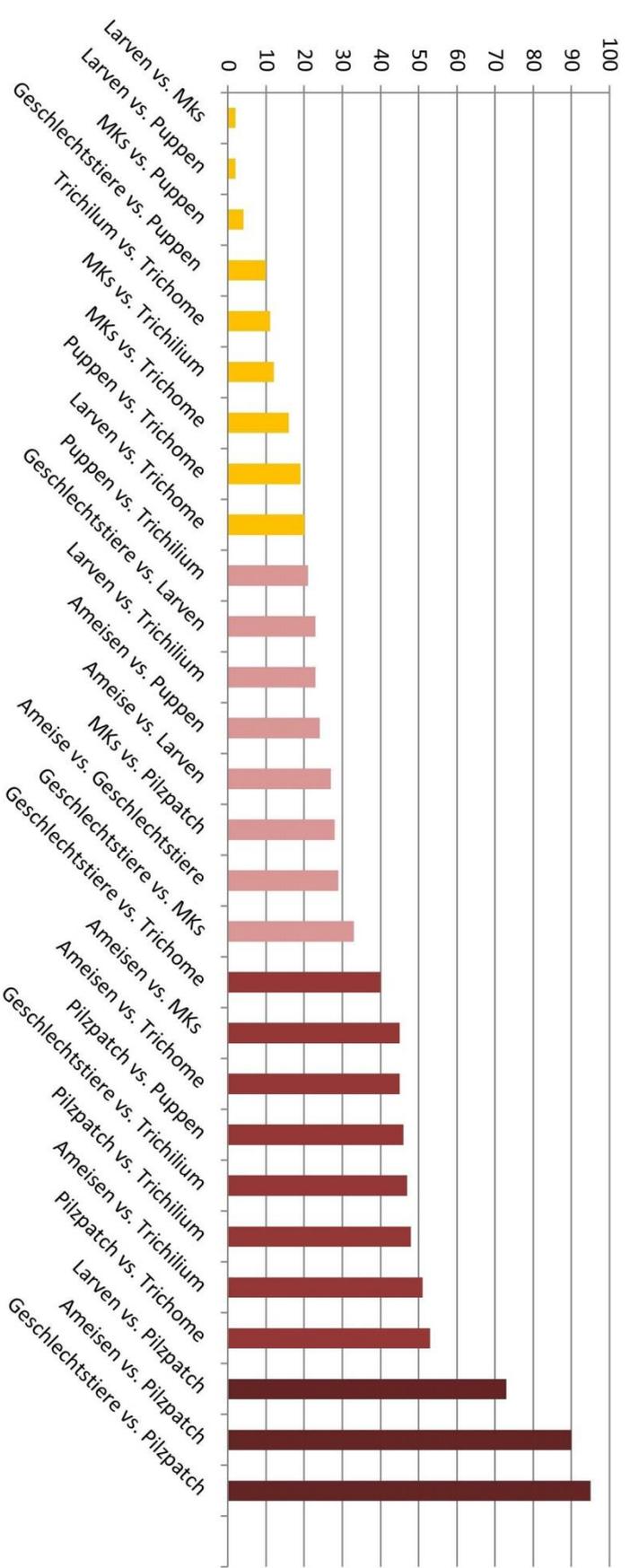
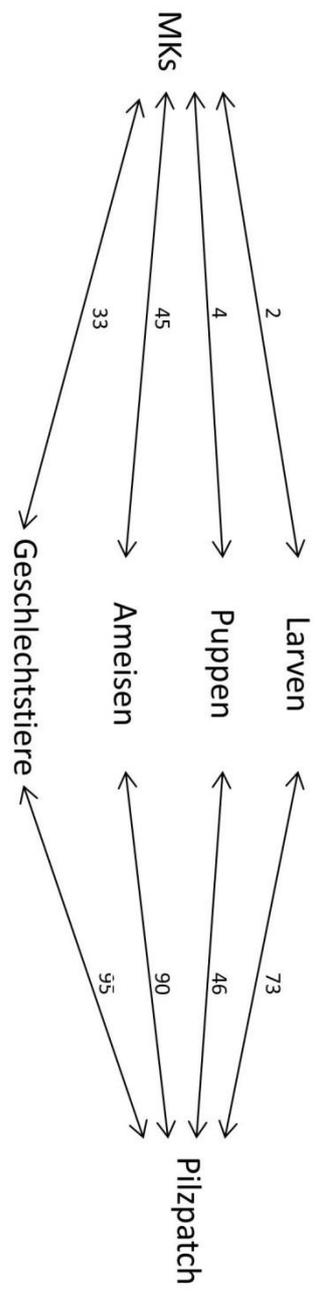


Fig. 11: Anzahl signifikanter Unterschiede

Angegeben wird die Menge der Unterschiede bei einer Signifikanz von 0,95%. Unterschiede variieren stark (2-95).

Die rechte Grafik verdeutlicht die Unterschiede von MKs und Pilzpatch zu den Insektengeweben. Angegeben wurde die Anzahl signifikanter Unterschiede.



b PCA-Analyse

Die PCA-Analyse zeigt eine deutliche Gruppierung der Gewebe (Fig. 12a). Der Pilzpatch formt die räumlich dichteste Gruppe. Alle 4 Proben konzentrieren sich auf einer sehr kleinen Fläche. Sowohl MKs (n=3) als auch Trichome (n=2) bilden sehr nahe beieinander liegende Gruppen. Ameisen (n=4), Geschlechtstiere (n=3) und Trichilium (n=2) weisen leichte Streuungen auf, wobei die ersten beiden eher entlang der PC 1-Achse (66.32%) verteilt sind, während letztere entlang der PC 2- Achse (12.87%) streuen. Letztlich sind die Larven und Puppen am weitesten gefächert. Die Larven differenzieren sowohl entlang der PC1 als auch der PC2-Achsen, sind aber dennoch als homogene Gruppe erkennbar. Bei den Puppen grenzt sich eine Probe deutlich von allen anderen Gewebeproben ab.

Pilzpatch und MKs clustern am deutlichsten. Sie unterscheiden sich minimal in ihrer Anordnung entlang der PC 1-Achse. Eine Larven- und eine Puppenprobe befinden sich ebenso in unmittelbarer Nähe der Pilzpatch-MK-Gruppe. Ansonsten bilden aber alle Insektengewebe, mit Ausnahme der erwähnten Puppenprobe, eine klar erkennbare Gruppierung, die lediglich entlang der PC 2-Achse stark streut. Entlang dieser Achse zeigen sich auch deutliche Unterschiede zwischen adulten und juvenilen Insektenstadien. Arbeiterinnen und Geschlechtstiere bilden zwar je eine eigene homogene Gruppe, formen aber gemeinsam eine klar erkennbare Gruppierung. Die juvenilen Entwicklungsstadien sind zwar weitflächiger verteilt, ein Großteil der Proben lässt sich aber ebenso als einheitliche Gruppe erkennen. Trichilium und Trichome bilden eine Gruppe, die am deutlichsten von den anderen Gewebeverbänden abgegrenzt ist. Sowohl auf der PC 1- Achse als auch besonders auf der PC 2-Achse sind beide weit entfernt von den restlichen Gewebsverbänden. Auch die MKs sind sehr deutlich von dem Trichilium und den Trichomen entfernt (Fig. 12a).

Streuungsrelevante Substanzen

Die starke Differenzierung der Trichilium und Trichomen von den anderen Geweben wird besonders von Fructose, die in den beiden Geweben im Vergleich in viel höheren Mengen vorhanden ist, beeinflusst (Fig. 12b). Für die Gruppierung der Insekten im entgegengesetzten Bereich der PC 1 und PC 2-Achse sind vor allem die beiden Aminosäuren Alanine und Proline und die Fettsäure Hexadecanoic acid ausschlaggebend. Die Grafiken aller Substanzen, die einer Substanzkategorie zugeordnet wurden, finden sich, wie erwähnt, im Anhang (Fig. Anhang 6).

Fructose kommt in den Pflanzengeweben (exklusive MKs) im Vergleich zu den anderen Geweben in sehr hohen Mengen vor. Die Areawerte von Fructose in Trichilium und Trichome unterscheiden sich je signifikant von allen anderen Geweben. Lediglich zwischen Trichilium und Trichomen besteht kein

signifikanter Unterschied. Im Trichilium ist im Schnitt 34 ± 11 mal mehr Fructose enthalten als in den anderen Geweben außer den Trichomen. Ganz ähnlich fällt der Vergleich der Trichome mit den Geweben (exklusive Trichilium) aus: Fructose ist im Schnitt über 26 ± 8 mal häufiger in diesem Gewebe vertreten. Der geringste Unterschied der durchschnittlichen Areamenge besteht im Vergleich zu den Ameisen (Ratio: Trichilium/Arbeiterinnen=6.70; Ratio: Trichome/Arbeiterinnen=5.27). Am stärksten unterscheiden sich die Area von Trichilium und Trichomen von jenen der Larven (Ratio: Trichilium/Larven=74.42; Ratio: Trichome/Larven=58.61). Die Menge gemessener Fructose spiegelt sich somit auf der PC 2-Achse wieder, auf der das Gewebe der Ameisen jenem der Pflanze (exklusive MKs) am nächsten ist, während die Larven auf der PC 2-Achse am weitesten von den Pflanzengeweben (exklusive MKs) entfernt sind (Fig. 12b).

Alanine kommt in den Insektengeweben in weitaus größeren Mengen vor als in den Pflanzengeweben und dem Pilzpatch. Der durchschnittliche Areawert der Großgruppe Insekten ist 11mal höher als der durchschnittliche Wert der Großgruppe Pflanze (Ratio: Insekt/Pflanze= 11.30) und über 100 000mal höher als der durchschnittliche Wert im Pilzpatch (Ratio: Insekt/Pilz= 111 332.87). Die adulten Insektenstadien, also Ameisen und Geschlechtstiere, unterscheiden sich dabei signifikant von allen Geweben nicht tierischen Ursprungs. Signifikante Unterschiede innerhalb der Insekten gibt es nicht (Fig. 12b).

Die Aminosäure Proline ist wiederum bei den Insekten sehr prominent vertreten. Im Insektengewebe wurden durchschnittlich über 17mal mehr Proline als im Pflanzengewebe dokumentiert (Ratio: Insekt/Pflanze=17.77), während die Aminosäure im Pilzpatch sowohl bei den S5 als auch bei den SL-Messungen nicht nachgewiesen werden konnte. In Larven und Puppen sind im Durchschnitt über 3.5mal so viel Proline wie in den Ameisen und über 2.7mal mehr Proline als in den Geschlechtstieren nachgewiesen worden. Auch wenn keine signifikanten Unterschiede zwischen den Insektengeweben bestehen, lässt sich damit wohl die Differenzierung der juvenilen und adulten Entwicklungsstadien entlang der PC2 (12.87%)- Achse teilweise erklären (Fig. 12b).

Die Fettsäure Hexadecanoic acid tritt ebenso in sehr hohen Mengen in den Insektengeweben auf. Durchschnittlich sind die gemessenen Areawerte der Fettsäure im Insektengewebe über 7mal so hoch wie in den Pflanzengeweben (Ratio: Insekt/Pflanze=7.43) und über 50mal so hoch wie im Pilzpatch (Ratio: Insekt/Pilzpatch=53.65). Die höchste durchschnittliche Area wurde bei Larven und Puppen festgestellt. Die juvenilen Insektenstadien enthalten im Schnitt über 3mal so viel Hexadecanoic acid wie die adulten Stadien (Ratio: juvenile Entwicklungsstadien/adulte Entwicklungsstadien=3.24). Obwohl die Arbeiterinnen nicht die höchste durchschnittliche Area von Hexadecanoic acid aufweisen, unterscheiden sie sich als einziges Insektengewebe stets signifikant

von den Pflanzengeweben und dem Pilzpatch, was wohl mit den hohen Schwankungen der Area der anderen Insektenproben erklärt werden kann (Fig. 12b).

Neben den Metaboliten Fructose, Alanine, Proline und Hexadecanoic acid, die die stärkste Auswirkung auf die Streuung der Proben haben, gibt es noch andere Substanzen, die ebenso einen deutlichen Einfluss auf die Verteilung in der PCA ausüben: drei Saccharide (Glucose, Trehalose und Maltose), fünf Aminosäuren (Isoleucine, Valine, Tyrosine, Glycine und Glutamic acid) sowie fünf nicht näher definierte Substanzklassen (Quinic acid, Myo-Inositol, Phosphoric acid, Glycerol und Lactic acid). Da auf Trends in den Substanzklassen im folgenden Kapitel näher eingegangen wird (Vgl. Kapitel 3.3.2.1: S5-Untersuchung II. Substanzkategorien in den Geweben), werden sie hier weniger ausführlich behandelt.

Glucose ist wie Fructose in den Trichomen und im Trichilium in besonders hoher Menge vertreten. Wiederum unterscheiden sich die Areawerte von Trichomen und Trichilium je signifikant von den restlichen 6 Geweben. Im Trichilium ist im Schnitt 19 ± 10 mal mehr Glucose enthalten als in den anderen Geweben, in den Trichomen durchschnittlich 13 ± 7 mal so viel.

Trehalose ist in großer Menge in den Insekten ausgeprägt, während es in den Pflanzenbestandteilen (inklusive MKs) und dem Pilzpatch in geringeren Mengen vorgefunden wurde (Ratio: Insekten/Pflanzen=63.89; Ratio: Insekten/Pilzpatch=15.32). Im Pilzpatch, der bei den meisten Substanzen sehr geringe Areawerte aufweist, wurde hier aber mehr als im Pflanzengewebe dokumentiert. Bereits die qualitative Analyse zeigte, dass Trehalose in den Insektengeweben in $\geq 75\%$ lediglich in den Larven nachgewiesen wurde. In den anderen Geweben wurde zwar in einzelnen Proben Trehalose dokumentiert, doch nicht in $\geq 75\%$ der Gewebe. Dieser Trend zeigt sich auch in den Areawerten, wo Trehalose besonders deutlich in den Larven ausgeprägt ist (Ratio: Larven/Ameisen=9.88; Ratio: Larven/Geschlechtstiere=4.19; Ratio: Larven/Puppen=14.95).

Maltose ist vor allem in den Insekten ausgeprägt (Ratio: Insekt/Pflanze=34.79; Ratio: Insekt/Pilzpatch=71.90), wobei die Puppen die durchschnittlich höchste Area aufweisen, während in den Ameisen durchschnittlich die deutlich geringsten Werte dokumentiert wurden.

Vier der fünf Aminosäuren (Isoleucine, Valine, Tyrosine, Glycine) sind im Durchschnitt in größerer Menge in den Insektengeweben zu finden als in den anderen Geweben. Zudem findet sich die größte Menge dieser vier Aminosäuren durchschnittlich je in den Puppen. Glutamic acid hingegen hat die durchschnittlich höchste Area in den MKs, die Substanz findet sich allerdings auch in hohen Mengen in den Insektengeweben.

Quinic acid, eine Hydroxycarbonsäure, die keiner der Überkategorien zugeordnet wurde, kommt wie Fructose und Glucose vergleichsweise in sehr hohen Mengen in Trichomen und Trichilium vor. Im Vergleich ist sie in etwa 260 ± 52 mal so oft im Trichilium ausgeprägt wie in den anderen Geweben (exklusive Trichome) bzw. in den Trichomen 125 ± 24 mal so häufig (exklusive Trichilium). Quinic acid konnte in den sechs anderen Geweben in verhältnismäßig eher geringen Areawerten nachgewiesen werden.

Myo-Inositol, ein Zuckeralkohol, der ebenso keiner der Überkategorien zugeordnet wurde, konnte in den Puppen am häufigsten nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede bestehen allerdings lediglich zwischen Pilzpatch und diversen Geweben, da im Pilzpatch nur eine geringe Menge nachgewiesen werden konnte.

Phosphoric acid, eine Säure, der ebenso keiner Überkategorie zugeordnet wurde, konnte in den sechs Geweben Geschlechtstiere, Larven, Puppen, MKs, Trichilium und Trichome in relativ hohen Mengen nachgewiesen werden, während das Metabolit in den Ameisen- und Pilzpatchproben äußerst geringe Areawerte aufwies. Im Gesamtdurchschnitt war die Substanz in den erwähnten sechs Geweben 30mal häufiger anzutreffen als im Mittelwert der Ameisen-Pilzpatch-Gruppe.

Glycerol, ein Zuckeralkohol, kommt in vergleichsweise hoher Zahl in Larven und Puppen vor.

Lactic acid, eine Hydroxycarbonsäure, wurde auch im Durchschnitt am häufigsten in Larven und Puppen dokumentiert, wobei in beiden Fällen die Puppen die höchste Area beinhalten.

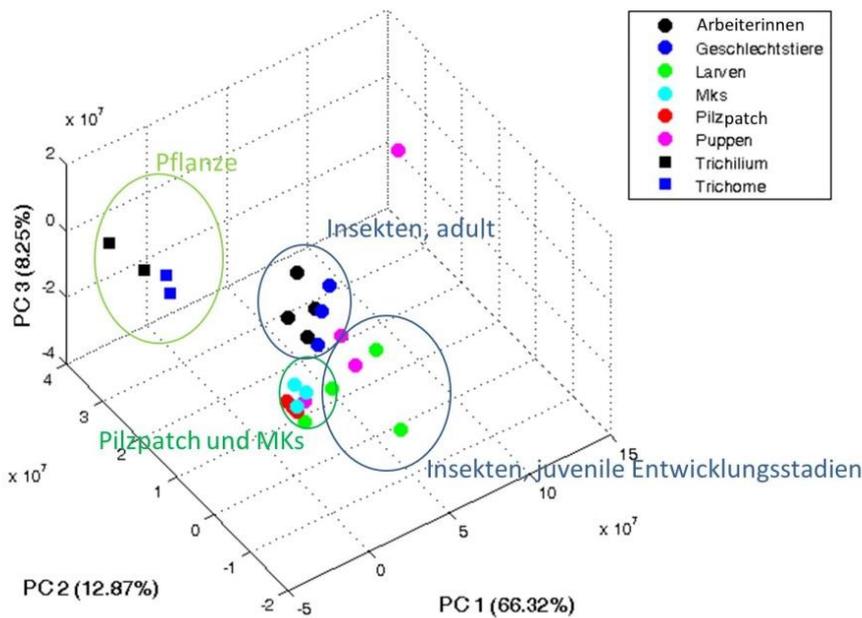


Fig. 12a: PCA-S5; Vergleich der Gewebe

Alle Proben des jeweiligen Gewebes nahe beieinander. Starkes Clustern bei Pilzpatch sowie MKs. Lediglich die Larven und Puppen weiter verteilt, bei Puppen vermutl. Ausreißer.

Am deutlichsten gruppieren sich MKs und Pilzpatch. Auch Insektengewebe clustert stark, größere Differenzen nur entlang der PC2 (12.87%), die auch eine Gruppierung in adulte und juvenile Entwicklungsstadien erkennen lässt.

Die Pflanzenbestandteile (exklusive MKs) grenzen sich am deutlichsten ab.

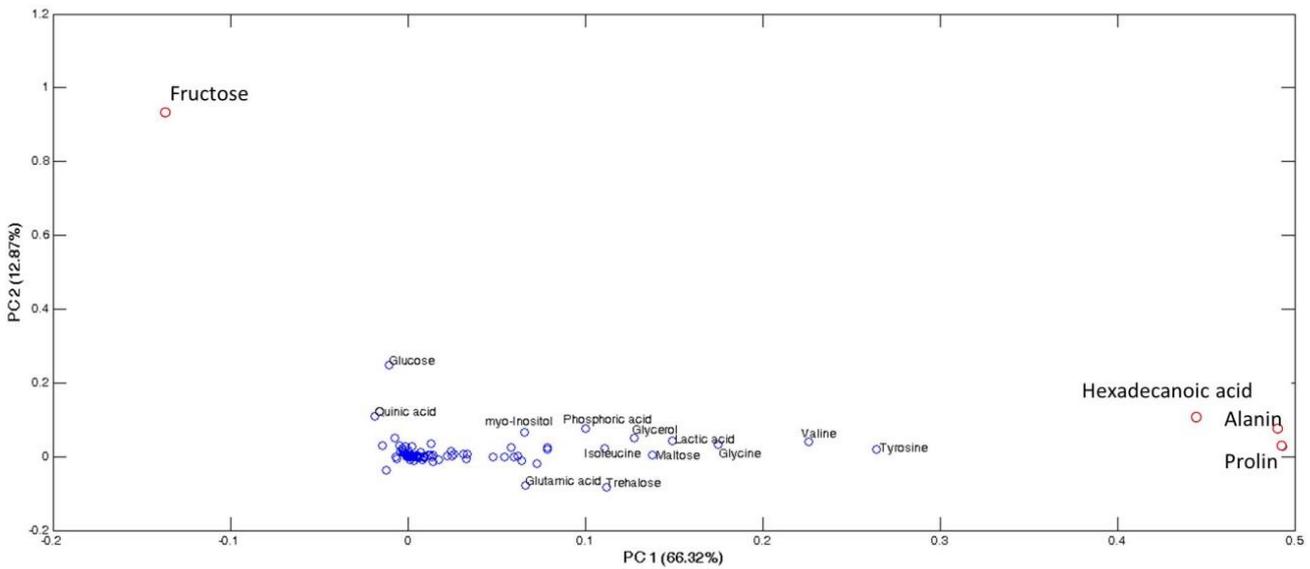


Fig. 12b: PCA-S5; Vergleich der Gewebe: Streuungsrelevante Substanzen

Namentlich angezeigt werden Substanzen, die auf die Streuung der Proben entlang der PC 1 (66.32%)- und PC2 (12.87%) -Achse den meisten Einfluss haben. Fructose ist wichtiger Faktor für die Verortung der Pflanzengruppe, während Hexadecanoic acid, Alanin und Prolin die Positionierung der Insektengruppe maßgeblich beeinflussen und auch teilweise für die Streuung juveniler und adulter Entwicklungsstadien verantwortlich sind.

0

II Substanzkategorien in den Geweben

a Aminosäuren

Es konnten 24 Aminosäuren (=AS) in den Proben nachgewiesen werden. Wie die qualitative Analyse bereits vermuten lässt, sind die AS im Insektengewebe besonders präsent. Auch wenn unterhalb der 75%-Marke auf Vorhandensein der Substanzen geprüft wird, zeigen sich ähnliche Trends. 24 (100%) der untersuchten AS kommen meist mit den höchsten Areawerten in allen Insektengeweben vor. Alle 24 AS wurden zudem in zumindest einem Pflanzengewebe (inklusive MKs) dokumentiert. Der Pilzpatch weist auch bei der quantitativen Untersuchung mit Abstand die wenigsten Aminosäuren auf. Nur 12 (50%) der AS wurden beim Pilzpatch nachgewiesen und die AS waren zudem stets in vergleichsweise ausgesprochen geringer Menge ausgeprägt. Bei der qualitativen Analyse, die nur Substanzen berücksichtigt, die in den Proben in $\geq 75\%$ der Mengen vorkommen, wurden 10 AS festgestellt.

Das Insektengewebe beinhaltet hingegen am häufigsten die höchste Area einer AS. Nur bei 5 AS (20.8%) ist der höchste durchschnittliche Areawert ein pflanzliches Gewebe (viermal bei den MKs). Der Pilzpatch hat niemals den höchsten durchschnittlichen Areawert. Bei 18 AS (75%) weist jedes einzelne Insektengewebe höhere Werte auf als jedes Gewebe der anderen Großreiche.

In Geweben von *Azteca* sind die vorkommenden AS 10mal so stark ausgeprägt als wie im Pflanzengewebe (Ratio: Insekt/Pflanze=10.78 \pm 2). Lediglich bei drei AS konnte ein höherer Areawert im Reich der Pflanzen als im Reich der Insekten festgestellt werden. Bei diesen AS handelt es sich um Asparagine, Aspartic acid und Butyric acid, 4-amino. Jene 12 AS, die auch im Pilzpatch vorgefunden wurden, kommen in Schnitt in den Insekten in über 10 000fach größerer Menge vor (Ratio: Insekt/Pilzpatch=10963.18 \pm 9150). Die erwähnten 12 Aminosäuren sind in der Pflanze im Schnitt 1000mal häufiger vertreten (Ratio: Pflanze/Pilzpatch= 1117.11 \pm 804).

Das Vorkommen der AS in den Insektengeweben unterscheidet sich zwischen den Entwicklungsstadien. In den juvenilen Stadien sind über 1.5mal mehr AS als in den adulten Stadien. Auch wenn alle AS zur Berechnung dieser Ratio herangezogen wurden, ist bei 7 AS (29.1%) die Area bei den adulten Stadien höher. Alanine, Butyric acid 4-amino, Glutamine, Homoserine, Methionine, Pyroglutamic acid und Homocysteine sind häufiger in den adulten Stadien vertreten.

Vergleich der Gewebe

Der Vergleich der Einzelgewebe mit dem Gewebeschnitt zeigt, dass nur die Insektengewebe bei den AS über dem Gesamtdurchschnitt liegen (Fig. 13). Die juvenilen Stadien grenzen sich in ihrer Ratio am stärksten vom Mittelwert ab. Larven und Puppen sind dabei relativ gleich ausgeprägt. Ameisen und

Geschlechtstiere, also die adulten Entwicklungsstadien, unterscheiden sich auch stark vom Mittelwert, grenzen sich aber weniger deutlich ab.

Alle Gewebe, die nicht tierischen Ursprungs sind, weisen eine Ratio unter 1 auf, sind also kleiner als der Mittelwert sämtlicher Gewebeproben. Der Vergleich der Ratios aller AS zeigt, dass die MKs von allen Geweben nicht-tierischen Ursprungs eindeutig die höchste Ratio besitzen. Das bedeutet, dass die 24 AS im Schnitt in den MKs die höchste Area der restlichen Gewebe aufweisen. Vier AS sind in den MKs sogar stärker ausgeprägt als im Insektengewebe. Den Höchstwert aller Gewebe bilden die MKs bei Asparagine, Aspartic acid, Glutamic acid und Homoserine.

Trichome und Trichilium, die in der PCA eine klar erkennbare Gruppe bilden, unterscheiden sich im Vorkommen der AS jedoch deutlich. Obwohl die Gesamtmenge der Trichome zwar eindeutig unter dem Gewebeschnitt liegt (Ratio: Trichome/MW-Gesamt=0.408), ist die gemessene Menge deutlich höher als die der Trichilien, die sehr wenig AS aufzuweisen scheinen (Ratio: Trichilium/MW-Gesamt=0.094). Zwei AS liegen bei den Trichomen in der Ratio über dem Gewebeschnitt: Aspartic acid und Butyric acid 4-amino, wobei letztere die höchsten durchschnittlichen Areawerte aller Gewebe aufweist. Im Pilzpatch sind die AS entweder nicht vorhanden oder nur in äußerst geringen Mengen vertreten (Ratio: Pilzpatch/MW-Gesamt=0.002).

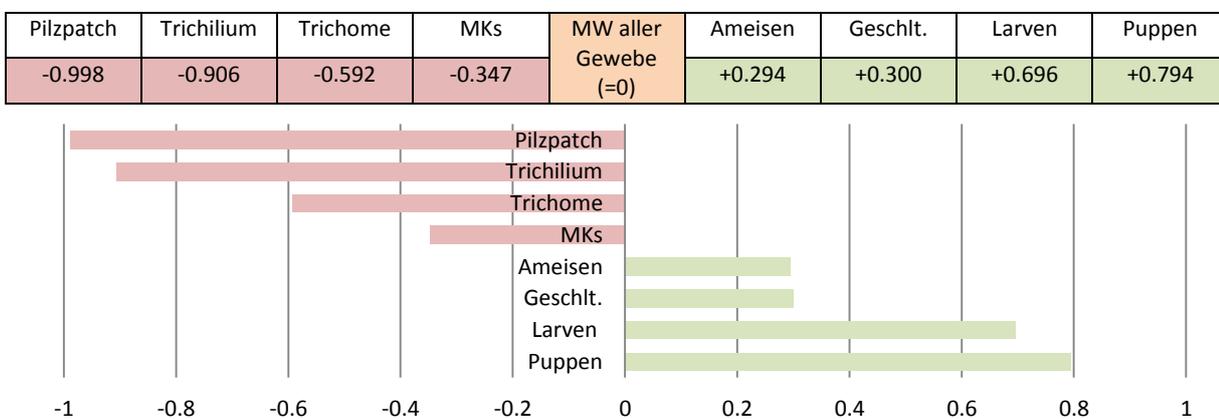


Fig.13: Aminosäuren. Ratio: Einzelgewebe/MW-Gesamt; Unterschiede der Gewebe

Berechnet wurde das Verhältnis eines Einzelgewebes (MW) zum Gesamtdurchschnitt; anschließend wurde der Mittelwert aller AS gebildet und der Abstand der durchschnittlichen Ratio von dem Mittelwert aller Gewebe angegeben. Die Grafik zeigt, dass die Insektengewebe alle überdurchschnittlich viele AS aufweisen. MKs zeigen im Vergleich mit den nicht-tierischen Geweben die höchste Ratio, die dennoch unter dem Gewebeschnitt liegt.

Ausgewählte Substanzen

Alanine, Proline und tw. Isoleucine, Valine, Tyrosine, Glycine und Glutamic acid wurden bereits in der PCA-Analyse besprochen.

b Kohlenhydrate

Es wurden 18 unterschiedliche Kohlenhydrate nachgewiesen, wobei einige Kohlenhydrate nicht näher bestimmt werden konnten und lediglich als Pentose, Hexose bzw. Polysaccharide definiert wurden. Zudem wurden die Zuckersäuren und Zuckeralkohole nicht zur Substanzkategorie gerechnet. Melibiose wurde bei der S5-Untersuchung lediglich in einer einzigen Probe (Geschlechtstiere) mit sehr geringen Areawerten nachgewiesen, weshalb im Kommenden von 17 Kohlenhydraten ausgegangen wird.

15 Kohlenhydrate (88%) wurden im Insektengewebe nachgewiesen, während 14 Kohlenhydrate (82%) in den Pflanzen und 12 im Pilzpatch (71%) dokumentiert wurden. Die Kohlenhydrate sind im Unterschied zu den Aminosäuren sehr unterschiedlich stark ausgeprägt, weshalb sich Trends nicht so leicht feststellen lassen wie bei den AS. Von den acht Geweben haben sieben Gewebe zumindest einmal bei einer Substanz den höchsten Durchschnittswert. Lediglich der Pilzpatch hat nie die höchste Area aller Gewebe. Die Trichome weisen bei vier Kohlenhydraten die durchschnittlich höchste Area auf (Hexose_A, Hexose_B, Hexose_D und Pentose_A), gefolgt von Trichilium und Arbeiterinnen, die in je drei Kohlenhydraten die höchste Area zeigten (Trichilium: Fructose, Glucose, Galactose, Ameisen: Tagatose_?, Not_annotated_Polysaccharid_mglw._Nigerose?, Not_annotated_Polysaccharid_RI_2755.8). Zwei Kohlenhydrate hatten bei Geschlechtstieren (Hexose_C, Not_annotated_Polysaccharid_RI_2846) und Larven (Trehalose, Raffinose) die durchschnittlich höchste Area, Puppen und MKs in je einem Kohlenhydrat (Puppen: Maltose, MKs: Sucrose).

Vergleich Gewebe

Beim Vergleich aller 17 Saccharide liegen die Pflanzengewebe (exklusive MKs) am deutlichsten über dem Gewebeschnitt (Fig. 14). Trichome weisen durchschnittlich die höchste Ratio zum Gesamtdurchschnitt bei allen Sacchariden auf und auch im Trichilium konnten deutlich überdurchschnittlich hohe Ratios festgestellt werden. Unter den Insekten wurde die höchste Ratio durchschnittlich bei den Ameisen festgestellt. Pilzpatch, MKs und Puppen liegen unter dem Gewebeschnitt, wobei der Pilzpatch wiederum insgesamt am weitesten unter dem Gesamtschnitt liegt.

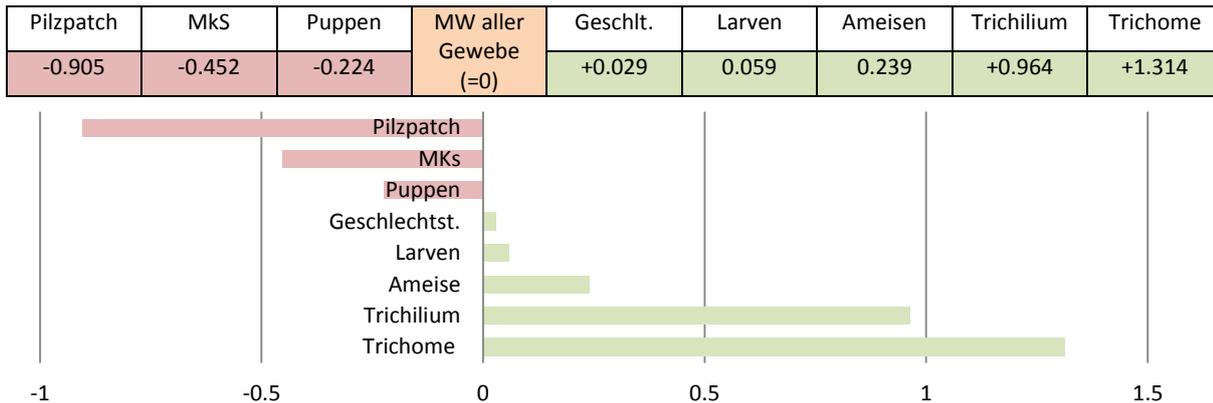


Fig. 14: Kohlenhydrate. Ratio: Einzelgewebe/MW-Gesamt; Unterschiede der Gewebe

Berechnet wurde das Verhältnis eines Einzelgewebes (MW) zum Gesamtdurchschnitt; anschließend wurde der Mittelwert aller AS gebildet und der Abstand der durchschnittlichen Ratio von dem Mittelwert aller Gewebe angegeben. Trichome, Trichilium, Geschlechtstiere und Ameisen liegen im Vergleich aller Saccharide über dem Gewebeschnitt. Pilzpatch, MKs, Puppen und Larven liegen unter Gewebeschnitt.

Ausgewählte Substanzen

Fructose, Glucose, Trehalose und Maltose wurden bereits in den Resultaten der PCA-Analyse diskutiert.

Sucrose ist in den MKs mit Abstand am deutlichsten ausgeprägt. Sucrose ist das einzige Kohlenhydrat, in dem die MKs die höchste Area aller Gewebe besitzen. Sucrose ist in mindestens zehnfacher Menge häufiger in den MKs zu finden als in anderen Geweben, übertrifft die durchschnittlichen Areawerte der Gewebe aber auch teilweise um das 100 bis 1000fache. In den Arbeiterinnen und Puppen ist es durchschnittlich auch noch in größerer Menge vorhanden (Ratio MKs/Arbeiterinnen=11.23; Ratio MKs/Puppen=18.76), in den anderen Geweben ist es nur mehr in deutlich geringeren Mengen vorzufinden. Am wenigsten Sucrose findet sich im Trichilium (Ratio MKs/Trichilium=263.80) und im Pilzpatch (Ratio MKs/Pilzpatch=1051.67). Aufgrund der hohen Standardabweichungen unterscheiden sich die MKs lediglich von den Larven, Puppen und dem Pilzpatch signifikant.

c Fettsäuren

Es wurden 10 Fettsäuren (=FS) nachgewiesen, wobei nur eindeutig als solche identifizierbare Substanzen der Substanzkategorie beigelegt wurden (Butanoic acid 2,4-dihydroxy- und Butanoic acid 2-hydroxy wurden aufgrund ihrer angehängten Gruppen und des Umstandes, dass sie >doppelt< detektiert wurden, nicht aufgenommen). Alle 10 FS konnten in einem Gewebe nachgewiesen werden, wobei Hexanoic acid allerdings nur in einer einzigen MK-Probe dokumentiert wurde und daher beim Errechnen der Ratios von 9 FS ausgegangen wurde.

Die FS sind meist entweder stark in den Insektengeweben (besonders bei den Larven) oder stark in den Pflanzengeweben (besonders bei den Trichomen) ausgeprägt. Bei 6 FS weisen die Larven die höchste Area aller Gewebe auf. Zwei FS kommen eindeutig am häufigsten in den Trichomen vor, nämlich Tetracosanoic acid_?, das in den Trichomen signifikant häufiger als in allen anderen Geweben vorkommt und Docosanoic acid, das sich signifikant von allen Geweben bis auf das Trichilium unterscheidet. Auch die Arbeiterinnen weisen bei einer FS (Decanoic acid), die höchste durchschnittliche Area auf, wobei diese FS in relativ geringen Mengen detektiert wurde und deshalb die Werte kritisch betrachtet werden müssen.

Vergleich Gewebe

Beim Vergleich der FS zeigt sich, dass die Puppen am deutlichsten über dem Gesamtschnitt liegen (Fig. 15). Die zweithöchste Gesamtratio weisen die Trichome auf. Larven und Arbeiterinnen liegen zwar deutlich unter diesen beiden Ratios, sind aber noch immer über dem Gesamtschnitt gelegen. Die restlichen vier Gewebe (Geschlechtstiere, MKs, Trichilium und Pilzpatch) liegen unter dem Gesamtdurchschnitt. Der Pilzpatch zeigt wiederum die kleinste Ratio aller Gewebe.

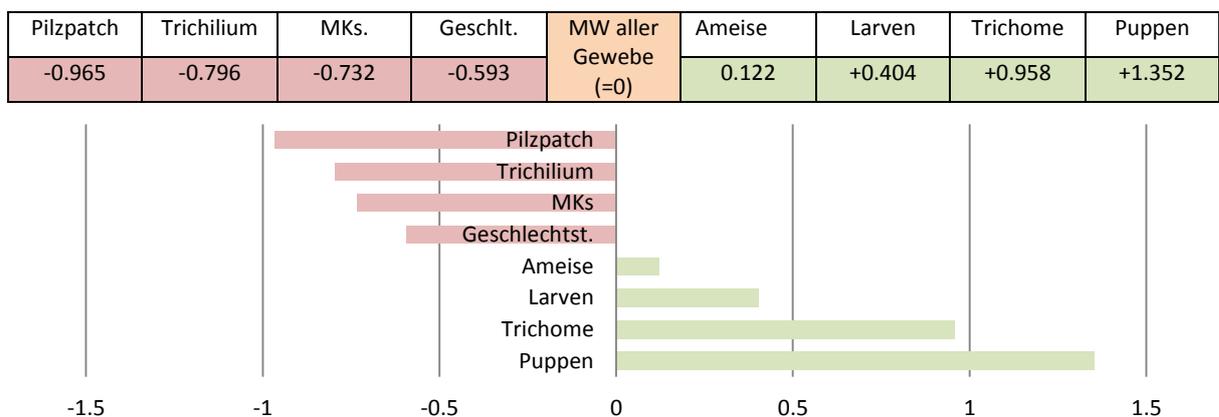


Fig. 15: Fettsäuren. Ratio: Einzelgewebe/MW-Gesamt; Unterschiede der Gewebe

Berechnet wurde das Verhältnis eines Einzelgewebes (MW) zum Gesamtdurchschnitt; anschließend wurde der Mittelwert aller AS gebildet und der Abstand der durchschnittlichen Ratio von dem Mittelwert aller Gewebe angegeben. Puppen, Trichome, Larven und Ameisen liegen im Vergleich aller Saccharide über dem Gewebeschnitt. Pilzpatch, MKs, Puppen und Larven liegen unter dem Gewebeschnitt.

Ausgewählte Substanzen

Die Verteilung von Hexadecanoic acid wurde bereits bei der PCA-S5-Analyse dargestellt. Die restlichen FS werden nicht ausführlicher präsentiert, weil der Schwerpunkt der Untersuchungen auf anderen Substanzkategorien liegt. Wie bei den anderen Substanzklassen auch, finden sich alle 10 FS, bei denen Werte detektiert wurden, im Anhang (Fig. Anhang 6).

d Sterole

Da Sterole für das Überleben und die Entwicklung von Insekten entscheidend sind (Nagata & Nagasawa 2011), wurde ihnen bei der Analyse besondere Aufmerksamkeit entgegengebracht. Es konnten 5 unterschiedliche Sterole identifiziert werden: Campesterol, beta-Sitosterol, Cholesterol_?, „Fucosterol_? und Stigmasterol_?. Aufgrund der relativ ähnlichen Struktur wurde die genaue Definition der Sterole meist über den Retentionsindex vorgenommen. Deshalb konnten drei der Sterole nur mit bedingt (>_?<) identifiziert werden.

Vergleich der Gewebe

Obwohl für die Errechnung der Ratio der Einzelgewebe zum Gesamtschnitt nur fünf Substanzen herangezogen werden konnten, zeigt sich ein eindeutiger Trend. Die adulten *Azteca*-Ameisen (Arbeiterinnen und Geschlechtstiere) weisen überdurchschnittlich viele Sterole auf (Ratio: adulte Insekten/juvenile Stadien=21.59 ±14) Erstaunlicherweise finden sich aber in den Trichomen die meisten Sterole, im Trichilium jedoch verhältnismäßig relativ wenig. Die hohe Anzahl an Sterolen in den Trichomen hat möglicherweise etwas mit dem Kontakt zu den MKs-erntenden *Azteca*-Arbeiterinnen zu tun (Vgl. Kapitel 4.3.1.4: Sterole in den Geweben). Die fünf Gewebe unter dem Durchschnitt (Puppen, MKs, Pilzpatch, Trichilium und Larven) sind relativ homogen ausgeprägt. Sie alle liegen deutlich unter dem MW der Gewebe, weisen aber alle relativ ähnliche Ratios auf.

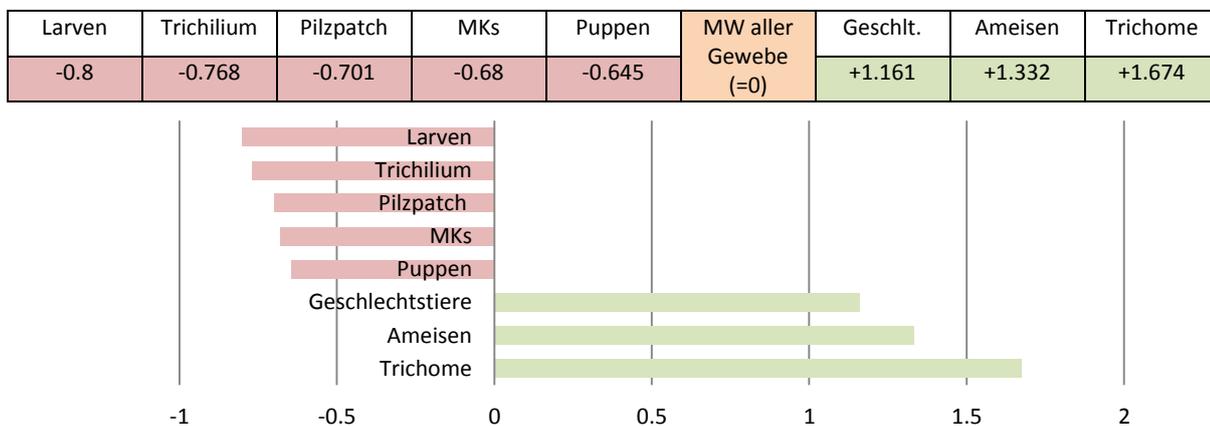


Fig. 16: Sterole. Ratio: Einzelgewebe/MW-Gesamt; Unterschiede der Gewebe

Berechnet wurde das Verhältnis eines Einzelgewebes (MW) zum Gesamtdurchschnitt; anschließend wurde der Mittelwert aller AS gebildet und der Abstand der durchschnittlichen Ratio von dem Mittelwert aller Gewebe angegeben. Die Sterole sind stark in den Trichomen und den adulten Entwicklungsstadien ausgeprägt. Alle anderen Gewebe liegen unter dem Mittelwert der Gewebe und weisen sehr ähnliche Ratios auf.

Analyse ausgewählter Substanzen

Campesterol (Fig. 17. A) wurde in den höchsten Mengen bei den adulten *Azteca* festgestellt. In den Arbeiterinnen finden sich durchschnittlich die höchste Area, aber auch der Mittelwert der Geschlechtstiere ist deutlich größer als jener sämtlicher anderer Gewebe. Die Arbeiterinnen unterscheiden sich somit auch signifikant von sämtlichen Geweben mit Ausnahme der Geschlechtstiere. Auch diese haben noch hohe Areawerte, unterscheiden sich aber nur mehr signifikant von Pilzpatch, Puppen und Larven. Die geringsten Areawerte für Campesterol weisen im Schnitt Pilzpatch und Trichilium auf. MKs, Larven, Puppen und Trichome haben ähnliche, durchschnittliche Areawerte.

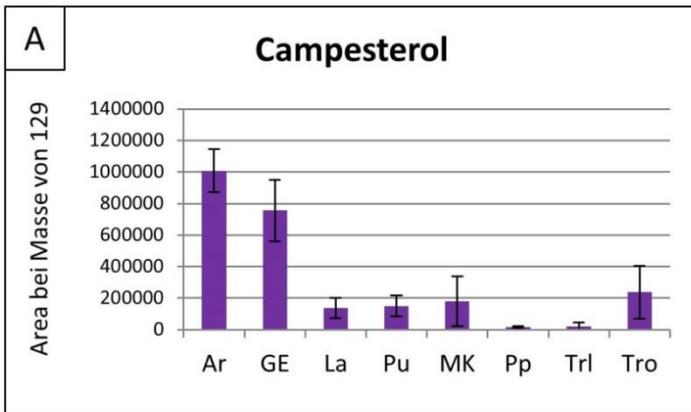
Das Phytosterol beta-Sitosterol (Fig. 17. B) war im Schnitt am stärksten in den Trichomen vertreten. Auch in den Arbeiterinnen wurde es in hoher Menge vorgefunden. Aufgrund der geringen Probemenge schwanken die Areawerte der Trichome stark, sie unterscheiden sich lediglich signifikant von Larven und Puppen. Bei Arbeiterinnen kommen sie aber signifikant in höherer Menge vor als in 5 anderen Geweben, lediglich zu Trichomen und Puppen besteht kein signifikanter Unterschied. Die Areawerte der Geschlechtstiere sind bei beta-Sitosterol nicht auffallend hoch ausgeprägt. Im Schnitt weisen diesmal die juvenilen Entwicklungsstadien, also Larven und Puppen die geringsten Areawerte auf. Auffallend ist, dass der Pilzpatch und das Trichilium, die in der Regel nur sehr geringe Mengen Sterole aufweisen, hier ähnlich hohe durchschnittliche Werte wie die MKs zeigen und sogar etwas höhere Werte aufweisen als die Durchschnittswerte von Larven und Puppen.

Cholesterol (Fig. 17. C) ist in den adulten Entwicklungsstadien am häufigsten anzutreffen. Im Schnitt kommen die höchsten Areawerte in den Geschlechtstieren vor, gefolgt von den Arbeiterinnen. Die Arbeiterinnen, die zwar durchschnittlich deutlich weniger Cholesterol aufweisen als die Geschlechtstiere, unterscheiden sich signifikant von allen anderen Geweben. Die Geschlechtstiere hingegen unterscheiden sich lediglich signifikant von Larven, Puppen, MKs und Pilzpatch, nicht aber von Trichilium, Trichomen und Arbeiterinnen. Ein Umstand, der vermutlich mit den hohen Standardabweichungen der Daten bei den Geschlechtstieren zu erklären ist. Pilzpatch und Trichilium zeigen wiederum die geringsten Mengen an Cholesterol. Larven, Puppen, MKs und Trichome kommen im Durchschnitt in etwa gleichen Mengen vor.

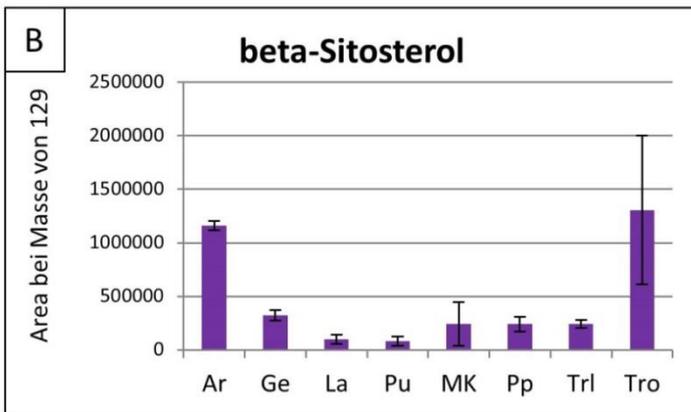
Auch Fucoosterol (Fig. 17. D) ist bei den Arbeiterinnen und Geschlechtstieren am stärksten ausgeprägt. Die Trichome weisen zudem ebenso hohe Areawerte auf. Die Arbeiterinnen unterscheiden sich bis auf Geschlechtstiere und Trichome signifikant von allen anderen Gewebetypen. Die Geschlechtstiere unterscheiden sich signifikant von Larven, MKs, Pilzpatch und

Puppen, nicht aber von Arbeiterinnen, Trichomen und dem Trichilium. In MKs und Pilzpatch kommt Fucosterol₂ in etwa der gleichen Menge vor. Bei Larven und Trichilium konnte kein Fucosterol₂ nachgewiesen werden.

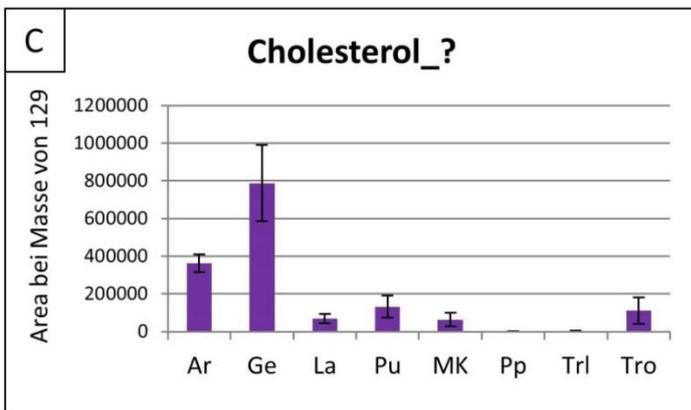
Stigmasterol₂ (Fig. 17. E) wurde in den größten Mengen in den Trichomen nachgewiesen. Der Mittelwert der Areawerte liegt deutlich über den anderen Geweben, aufgrund der hohen Standardabweichungen unterscheiden sich die Trichome aber lediglich signifikant von Larven, Puppen und Pilzpatch. Auch Geschlechtstiere und Arbeiterinnen weisen höhere Areawerte als die anderen Gewebe auf, wobei in den Geschlechtstieren durchschnittlich mehr Stigmasterol₂ nachgewiesen wurde. Auffallend ist, dass in Pilzpatch und Trichilium ungewöhnlich viel Stigmasterol₂ gefunden wurde. Die durchschnittlichen Areawerte des Pilzpatches sind beinahe so hoch wie jene der Arbeiterinnen. In Larven und MKs konnte kein Stigmasterol₂ nachgewiesen werden, in den Puppen wurde lediglich in einer von vier Proben Stigmasterol₂ detektiert.



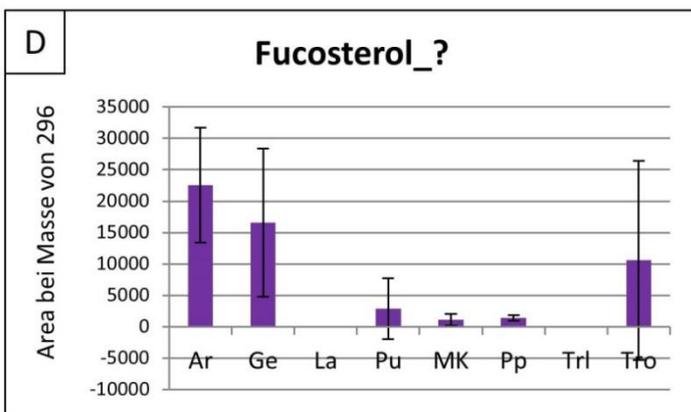
- ### Campesterol
- Ameisen-Larven
 - Ameisen-MKs
 - Ameisen-Pilzpatch
 - Ameisen-Puppen
 - Ameisen-Trichilium
 - Ameisen-Trichome
 - Geschlechtstiere-Larven
 - Geschlechtstiere-Pilzpatch
 - Geschlechtstiere-Puppen



- ### beta-Sitosterol
- Ameisen-Geschlechtstiere
 - Ameisen-Larven
 - Ameisen-MKs
 - Ameisen-Pilzpatch
 - Ameisen-Trichilium
 - Geschlechtstiere-Larven
 - Geschlechtstiere-Puppen
 - Larven-Trichome
 - Puppen-Trichome



- ### Cholesterol_?
- Ameisen-Larven
 - Ameisen-MKs
 - Ameisen-Pilzpatch
 - Ameisen-Puppen
 - Ameisen-Trichilium
 - Ameisen-Trichome
 - Geschlechtst.-Larven
 - Geschlechtst.-Mks
 - Geschlechtst.-Pilzpatch
 - Geschlechtst.-Puppen
 - Larven-Pilzpatch



- ### Fucoesterol_?
- Ameisen-Larven
 - Ameisen-Mks
 - Ameisen-Pilzpatch
 - Ameisen-Puppen
 - Ameisen-Trichilium
 - Larven-Mks
 - Larven-Pilzpatch
 - Larven-Trichome
 - Geschlechtst.-Larven
 - Geschlechtst.-MKs
 - Geschlechtst.-Pilzpatch
 - Geschlechtst.-Puppen
 - Pilzpatch-Trichilium

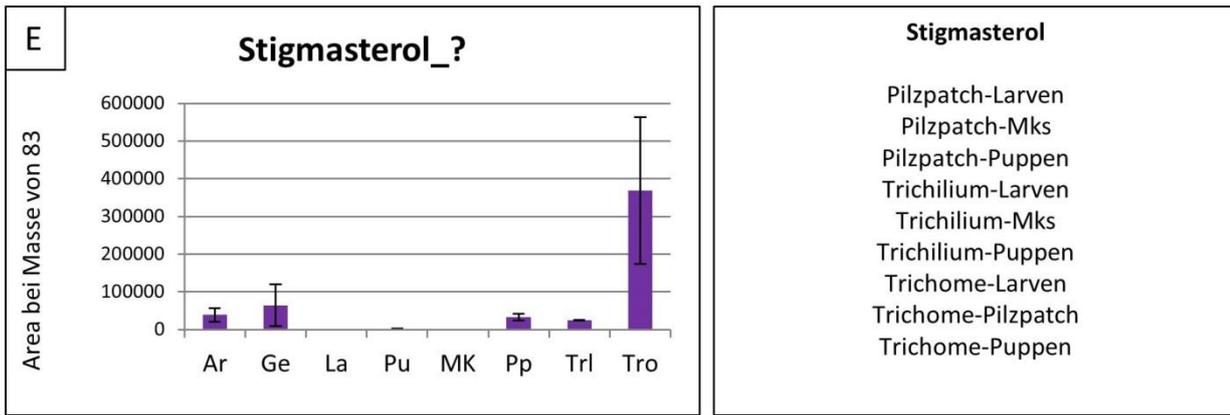


Fig. 17: Sterole in den Geweben

Dargestellt sind die Mittelwerte der Peakfläche (=Area) der jeweils festgelegten Masse einer Substanz (pro Gewebe). Fehlerbalken wurden aufgrund der hohen Schwankungen durch geringe Probenanzahl mit \pm STABW/Wurzel(Anzahl) berechnet. In der y-Achse sind die Areawerte der jeweils berechneten Masse verzeichnet. Hohe Werte sind noch kein Beleg für ein überproportionales Auftreten der Substanz in den Geweben, können aber oft einen Trend verdeutlichen. Im Feld rechts neben der Grafik finden sich sämtliche Gewebe, die sich voneinander signifikant (0.95%) unterschieden.

Ar= Arbeiterinnen, **Ge**= Geschlechtstiere, **La**= Larven, **Pu**= Puppen, **MK**= Müllersche Körperchen, **Pp**= Pilzpatch, **Trl**= Trichilium, **Tro**= Trichome.

3.3.3 SL-Untersuchung

3.3.3.1 Vergleich: MKs verschiedener *Cecropia*-Arten

I Anzahl der signifikanten Unterschiede

Wie bei sämtlichen Geweben der S5-Untersuchungen wurde auch bei den MKs verschiedener *Cecropia* Arten die Anzahl der signifikanten Unterschiede untersucht, um so Rückschlüsse über die Ähnlichkeit der untersuchten *Cecropia*-Arten bezüglich der Futterkörperchen ziehen zu können.

Die T-Tests zeigen, dass es bei den MKs der unterschiedlichen *Cecropia*-Arten kaum signifikante Unterschiede gibt. Ausnahmen sind drei Substanzen im Vergleich zwischen *C. insignis* und *C. peltata*: Asparagine, Methionine und Isovaleric acid 2-oxo_?. Die Aminosäure Asparagine hat signifikant höhere Areawerte in *C. insignis*, während Methionine und Isovaleric acid, 2-oxo_? signifikant höhere Areawerte bei *C. peltata* zeigen. *C. peltata* und *C. obtusifolia* unterscheiden sich in einer Substanz signifikant. Die Areawerte von Hexanoic acid sind bei *C. peltata* signifikant höher als bei *C. obtusifolia*. Bei *C. obtusifolia* und *C. insignis* unterscheiden sich die Areawerte keiner einzigen Substanz signifikant.

Von den 147 gefundenen Metaboliten konnten in den MKs 132 Substanzen festgestellt werden. Die MKs zeigen somit trotz einer Vielzahl dokumentierter Substanzen nur sehr geringe signifikante Unterschiede auf Artniveau. Zudem wird deutlich, dass der größte Teil der untersuchten Metabolite

(90%) in zumindest einer MK-Probe detektiert wurde. Die S5-Untersuchung, bei der durch die stärkere Verdünnung grundsätzlich weniger Substanzen nachgewiesen werden konnten, dokumentiert auch bereits 120 Substanzen (82%) in mindestens einer MK-Probe.

Besonders die MKs von *C. insignis* und *C. obtusifolia* ähneln einander stark. Auch wenn man Unterschiede nur bei einer Signifikanz von 0.85% definiert (statt wie bisher 0.95%), um mehr Unterschiede deutlich zu machen, unterscheiden sich die beiden Arten lediglich in einer einzigen Substanz (Not_annotated_RI_2249.2). *C. peltata* und *C. obtusifolia* unterscheiden sich in 7 Substanzen und *C. peltata* und *C. insignis* in 8 Substanzen zu 0.85% signifikant.

Die drei MK-Proben, die von *C. obtusifolia* im Glashaus geerntet wurden, wurden auf ihre Unterschiede zu den Pflanzen im Freiland untersucht. Da die drei Proben lediglich von einem Individuum gesammelt wurden, berücksichtigt die Berechnung alle technischen Replikate. Die drei Proben der Glashauspflanze unterscheiden sich in 8 Substanzen signifikant von sämtlichen im Freiland gesammelten Proben. Unterschiedlich sind: Hexose_B, Isovaleric acid 2-oxo, Pentose_A, Pinitol, Salicylic_acid_?, Tocopherol alpha, Non_annotated_RI_2038.8.

II PCA-Analyse

Obwohl die T-Tests darauf hinweisen, dass es nur wenig Unterschiede zwischen den MKs der drei untersuchten *Cecropia*-Arten gibt, zeigt die Hauptkomponentenanalyse, dass sie sich durchaus auch unterscheiden (Fig. 18). Die einzelnen *Cecropia*-MKs sind als Gruppe zu erkennen, auch wenn sie nicht so deutlich clustern wie die unterschiedlichen Gewebearten von *Cecropia*.

Besonders deutlich clustern die Proben von *C. peltata* (n=6). Fünf der sechs Proben bilden eine deutliche Gruppe, die sich auf allen drei PCA-Achsen zu den anderen Proben differenzieren. Die sechste *C. peltata*-Probe streut stark entlang der PC 2-Achse (12.66%) und ist dort eher im Bereich von *C. insignis* und *C. obtusifolia* anzutreffen. Auch auf der PC 3-Achse (9.77%) differenziert sie stark von den restlichen *C. peltata*-Proben und ist wieder im Bereich von *C. insignis* und *C. peltata* verortet. Entlang der PC 1-Achse (54.60%) ist die Probe allerdings nicht weit von den restlichen Proben entfernt.

C. insignis und *C. obtusifolia*, die sich bereits bei der Diskussion der signifikanten Unterschiede am wenigsten unterschieden, lassen sich auch in der PCA schwer voneinander abgrenzen. Mit je eine, weiter entfernt liegenden Ausnahme bilden sie gemeinsam eine Gruppe, die sich deutlich von *C. peltata* abgrenzt. Auch bei *C. obtusifolia* (n=5) findet sich eine Probe, die sehr weit von den restlichen Proben entfernt ist. Diese differenziert stark auf allen drei Achsen und ist im Vergleich mit allen anderen Proben am stärksten peripher positioniert. Die restlichen vier Proben sind relativ nahe

beieinander verortet. Entlang der PC 3-Achse gibt es kaum eine Streuung, während die Gruppe entlang der PC 2-Achse leicht differenziert. Auf der PC 1- Achse ist die Streuung am größten (Fig. 18).

Die MK Proben von *C. insignis* (n=3) streuen stark. Zwei der Proben bilden eine erkennbare Gruppe, die allerdings mitten im Cluster von *C. obtusifolia* verortet ist. Die dritte Probe differenziert deutlich entlang der PC 2-Achse.

Streuungsbeeinflussende Substanzen

Welche Substanzen besonders stark auf die Verteilung der Proben Einfluss nehmen, lässt sich bei den MKs schwieriger eruieren als bei der PCA der Gewebe. Keine Substanz übt ähnlich starken Einfluss auf die Positionierung einer Probe oder eines Clusters aus. Allerdings sollen im Kommenden, ohne Anspruch auf Vollständigkeit, einige Substanzen, die die Differenzierung der Proben besonders beeinflussen, angeführt werden.

Für die Positionierung von *C. obtusifolia* links der PC 1-Achse ist etwa Tetracosanoic acid_? von Bedeutung (Fig. Anhang 5) . Die Areawerte der Fettsäure sind bei *C. obtusifolia* 9mal höher als bei *C. peltata* und um 19mal höher als bei *C. insignis*. Auch die Aminosäure Asparagine beeinflusst eine Positionierung der Proben im linken Bereich der PC 1-Achse. Auch Asparagine ist am deutlichsten in *C. obtusifolia* ausgeprägt und unterscheidet sich relativ deutlich von *C. peltata* (Ratio: *C. obtu/C. pelt*= 4.72) und ist auch stärker als *C. insignis* ausgeprägt (Ratio: *C. obtu/C. pelt*= 1.72).

Tetracosanoic acid_? übt ebenso einen Einfluss auf eine Differenzierung entlang der PC 2-Achse (12.66%) aus. Der entgegengesetzte Bereich wird etwa von Raffinose, Maltose oder Not_annotated Polysaccharid_RI_2846 geprägt. Raffinose ist am stärksten in *C. obtusifolia* vorhanden, in *C. peltata* allerdings ähnlich stark ausgeprägt, in *C. insignis* hingegen kaum vorhanden (Ratio: *C. obtu/C. pelt*=1.66; Ratio: *C. obtu/C. insig*=38.45). Maltose ist in *C. peltata* am stärksten ausgeprägt (Ratio: *C. pelt/C. obtu*=2.49; Ratio: *C. pelt/C. insig*=1.72), ein Faktor, der sicherlich die Verteilung im linken Bereich der PC 2-Achse miterklärt. Not_annotated_Polysaccharid_RI_2846 ist in allen drei Pflanzenarten mit hohen Areawerten vertreten, aber ebenso in *C. peltata* am deutlichsten ausgeprägt.

Die Positionierung im oberen Bereich der PC 3 (9.77%) und damit das deutliche Clustern von *C. peltata* wird u.a. von Galactose, Spermidine und wiederum Not_annotated _Polysaccharid_RI_2846 beeinflusst. Die Areawerte von Galactose sind bei *C. peltata* am höchsten und über doppelt so groß wie bei *C. obtusifolia* (Ratio: *C. pelt/C. obtu* = 2.29) und deutlich intensiver ausgeprägt als bei *C. insignis* (Ratio: *C. pelt/C. insig*=41.56), was sicherlich ein Faktor dafür ist, warum *C. peltata* auf der PC 3-Achse am weitesten oben positioniert ist. Spermidine ist in *C. obtusifolia* und *C. peltata* ungefähr

gleich stark ausgeprägt, aber konnte in *C. insignis* nicht nachgewiesen werden. Für die Positionierung im entgegengesetzten Bereich der PC 3-Achse zeigt sich etwa Azelaic acid verantwortlich. Es ist am stärksten in *C. insignis* ausgeprägt, aber auch in *C. peltata* vorhanden. (Ratio: *C. insig/C. obtu*=3.94; *C. insig/C. pelt*=1.69).

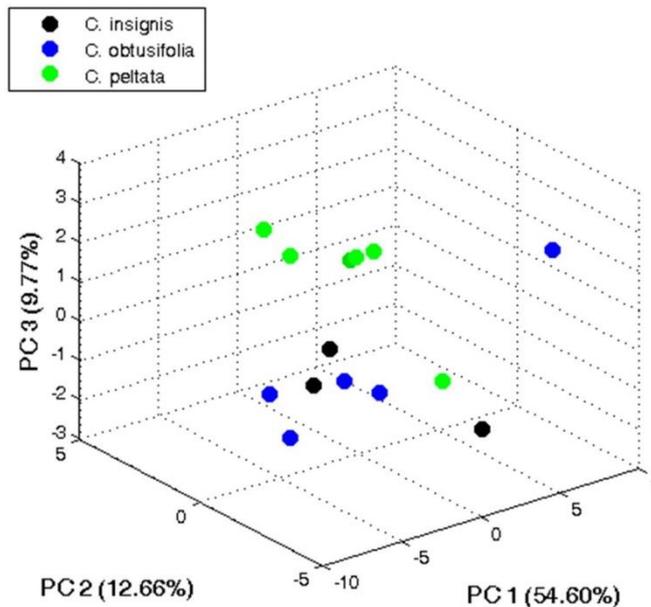


Fig. 18: PCA-SL; der MKs der *Cecropia*-Arten

Proben bilden relativ klar erkennbare Gruppen. *C. peltata* clustert mit einer Ausnahme am deutlichsten und differenziert v.a. auf der PC 3 (9.77%)-Achse. *C. obtusifolia* als Gruppe erkennbar, allerdings verzahnt mit *C. insignis*. Je eine Probe beider Arten peripher angeordnet.

Für die Streuung der Arten relevante Substanzen wenig eindeutig (zugehörigen Graphiken im Anhang) Tetracosanoic acid und Asparagine sind u.a. für Positionierung von *C. obtusifolia* im linken Spektrum der PC 1-Achse (54.60%) ein Faktor. Für die Positionierung von *C. peltata* im oberen Bereich der PC 3-Achse (9.77%) zeigen sich u.a. Galactose, Spermidine und Not_annotated_Polysaccharid_RI_2846 verantwortlich.

3.3.3.2 Vergleich MKs -Pilzpatch

I Anzahl der signifikanten Unterschiede

Um Aufschluss über die Ähnlichkeit von Pilzpatch und MKs zu erhalten, die sich etwa in der PCA-Analyse der Gewebe abzeichnet, wurden die Proben des Pilzpatch auch SL gemessen. MKs und Pilzpatch unterscheiden sich in 28 Substanzen signifikant (t-Test 0.95%): in 8 Aminosäuren, 4 Sacchariden, 2 Fettsäuren, 1 Sterol und 13 nicht identifizierten oder zuordenbaren Substanzen

II PCA

Bereits die PCA aller Gewebe bei der S5-Messung zeigte eine starke Ähnlichkeit zwischen MK- und Pilzpatchgewebe, obwohl bei der SL-Untersuchung dennoch 28 signifikante Unterschiede dokumentiert werden konnten. Trotz dieser Anzahl signifikanter Unterschiede zeigte auch diese PCA sehr geringe Differenzen zu den MKs. 3 Proben des Pilzpatches (n=4) bilden zwar eine sehr enge Gruppe, doch die Unterschiede zu den MKs lassen sich nur bedingt festmachen. Da allerdings aus dem Datenmaterial hervorgeht, dass Unterschiede bestehen, wurden, um diese näher zu verdeutlichen, die Daten mittels eines 10-Loghartimus (log10) bearbeitet, um so die Differenzen zwischen den Geweben deutlich zu machen.

Die log₁₀-PCA zeigt Unterschiede zwischen dem Pilzpatch und den MKs (Fig. 19a). Pilzpatch und MKs bilden zwei klar abgrenzbare Gruppen, wobei die vier Proben des Pilzpatches kaum streuen und eine sehr dichte Gruppe bilden, die sich besonders entlang der PC 1-Achse (67.28%) von den MKs abgrenzt und auch entlang der PC 2-Achse zu den meisten MKs-Proben differiert. Die MKs sind zwar als Gruppe klar erkennbar, aber viel weiter gestreut. Die Streuung vollzieht sich dabei auf allen drei Achsen. Innerhalb der MKs lassen sich auch hier die Gruppierungen der einzelnen Arten erkennen, auch wenn einzelne Proben von der Gruppe entfernt sind oder Gruppen ineinander übergehen. Auf der PC 1-Achse scheint sich *C. peltata*, das relativ deutlich clustert, am deutlichsten vom Pilzpatch abzugrenzen. Auf dieser Achse nähert sich die Art *C. obtusifolia*, die auch größtenteils deutlich clustert, obwohl eine Probe *C. insignis* räumlich nicht von diesem Cluster zu differenzieren ist, am ehesten dem Pilzpatch an, wobei allerdings die größte räumliche Trennung entlang der PC-2 Achse besteht (Fig. 19a).

Streuungsrelevante Substanzen

Für die räumliche Differenzierung des Pilzpatch im linken Bereich der PC 1-Achse und im hintersten Bereich der PC 2-Achse zeigen sich unterschiedliche Substanzen verantwortlich (Fig. 19b). Besonders D-Sorbitol und Not_annotated_RI_1345.6 beeinflussen die Ausprägung. Beide Substanzen sind im Pilzpatch in signifikant größeren Mengen zu finden als in den MKs (Sorbitol: Ratio: Pilzpatch/MKs=37.29; Not_annotated_RI_1345.6: Ratio: Pilzpatch/MKs=24.21).

Für die Positionierung im linken Bereich der PC 2- Achse scheinen u.a. auch Vanillic acid und Hexose A tendenzgebend zu sein. Allerdings sind diese beiden Metabolite für die Differenzierung zwischen Pilzpatch und MKs von geringer Relevanz, da sie in relativ ähnlichen Mengen in beiden Geweben vorkommen (Vanillic acid: Ratio: Pilzpatch/MKs= 1.02; Hexose A: Ratio Pilzpatch/MKs= 1.24).

Für die Positionierung im entgegengesetzten rechten Bereich der PC 1- und PC 2-Achse sind unter anderem Sucrose, Asparagine, Glutamic acid und Isoleucine verantwortlich. Sucrose kommt in den MKs in signifikant größeren Mengen vor als im Pilzpatch (Ratio: MKs/Pilzpatch=533.65). Auch die Aminosäuren Asparagine, Glutamic acid und Isoleucine treten in den MKs in größeren Mengen auf (Asparagine: Ratio: MKs/Pilzpatch=675.93; Glutamic acid: Ratio: MKs/Pilzpatch=404.63; Isoleucine: Ratio: MKs/Pilzpatch=2437.38).

Auch wenn Unterschiede dokumentiert werden konnten und sich einige Substanzen in MKs und Pilzpatch signifikant unterscheiden, ist dennoch festzuhalten, dass sich die beiden Gewebe stark ähneln. Das zeigten die S5-PCA und SL-PCA deutlich.

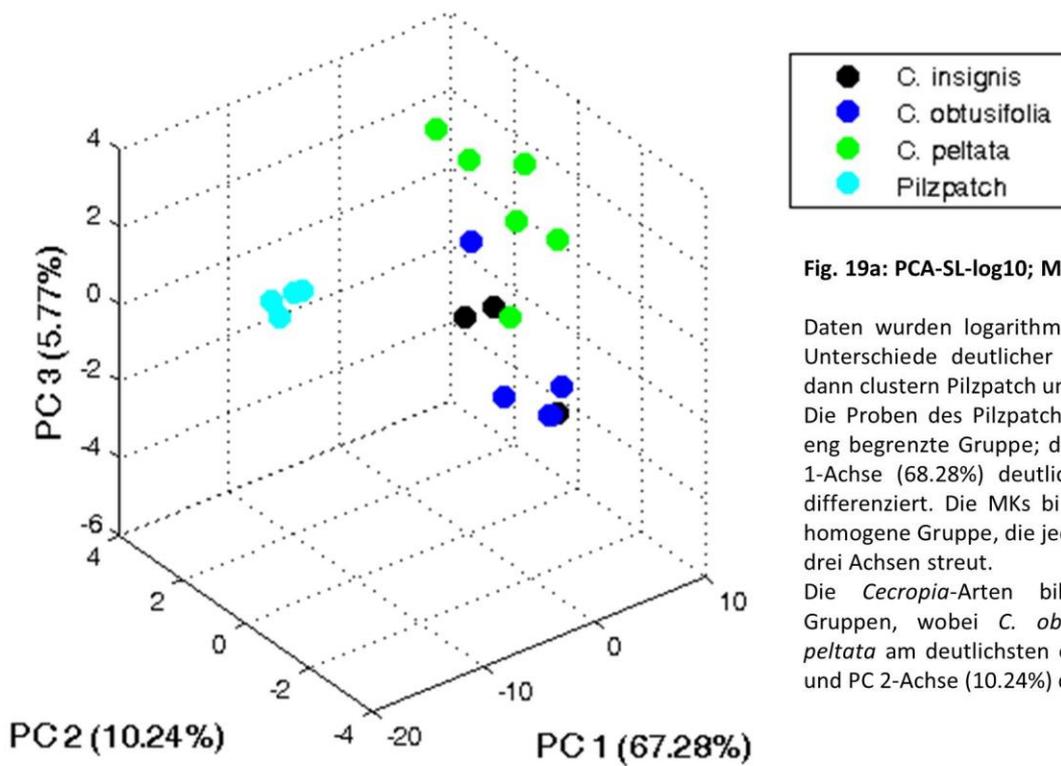


Fig. 19a: PCA-SL-log10; MKs und Pilzpatch

Daten wurden logarithmiert (log 10), um Unterschiede deutlicher zu machen. Erst dann clustern Pilzpatch und MKs deutlich. Die Proben des Pilzpatch bilden eine sehr eng begrenzte Gruppe; die entlang der PC 1-Achse (68.28%) deutlich von den MKs differenziert. Die MKs bilden ebenso eine homogene Gruppe, die jedoch entlang aller drei Achsen streut. Die *Cecropia*-Arten bilden auch hier Gruppen, wobei *C. obtusifolia* und *C. peltata* am deutlichsten entlang der PC 1- und PC 2-Achse (10.24%) differenzieren.

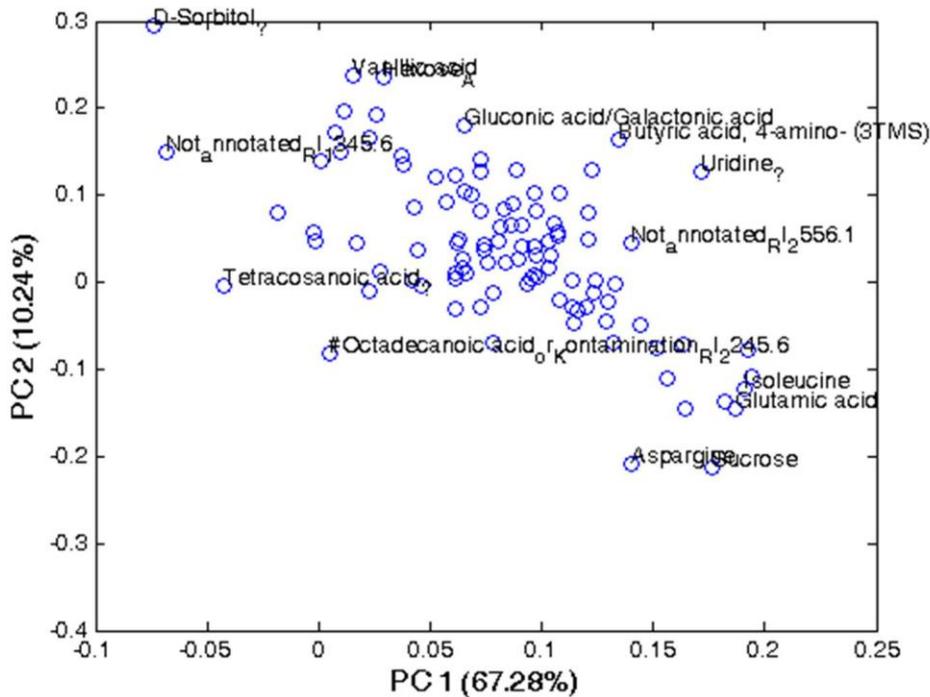


Fig. 19b: PCA-SL-log10; MKs und Pilzpatch: Streuungsrelevante Substanzen

Für die räumliche Differenzierung des Pilzpatch zeigen sich u.a. D-Sorbitol und Not_annotated_RI_1345.6 verantwortlich. Für die Positionierung der MKs im entgegengesetzten Bereich des Spektrums sind u.a. Sucrose, Asparagine, Glutamic acid und Isoleucine ausschlaggebend.

4 Diskussion

4.1 Morphologisch-Anatomische Untersuchungen

4.1.1 Morphologie und Anatomie der MKs

Vom Trichilium und den MKs wurden Schnitte gemacht, die relativ deutlich zeigen, wie produktiv ein einzelnes MK ist. Eine große Anzahl MKs in unterschiedlichsten Entwicklungsstadien werden auf der gesamten Oberfläche des Trichiliums gebildet. Auffallend ist, wie LM- und CT-Untersuchungen zeigten, dass voll entwickelte MKs nicht in unmittelbarer Nähe zueinander liegen, junge Stadien hingegen schon. Möglicherweise wird die Entwicklung einzelner MKs gefördert, während die unmittelbar danebenliegenden MKs in ihrem Wachstum kurzzeitig gehemmt werden.

Die im Pflanzenreich sehr ungewöhnliche Einlagerung von Glykogen in die MKs (Rickson 1976, Bischof et al. 2013) konnte bei den anatomischen Untersuchungen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Bei den voll entwickelten Stadien sind zwar mehrere rundliche Einlagerungen in jeder Zelle zu erkennen (Fig. 3F), ob es sich dabei um Glykogenplastide handelt, kann aufgrund der Schnitte alleine nicht gesagt werden. Für eine eindeutigere Identifizierung müsste etwa ein Nachweis mittels Schiffscher Reaktion erbracht werden, wie bei Rickson (1976). Für weiterführende anatomische Untersuchungen der Plastiden müssten die Proben durch Transmissionselektronenmikroskopie untersucht werden, wie bei Bischof et al. (2013).

Eine weitere Unklarheit betrifft den Entwicklungsstand der reifen MKs. Während Rickson (1976) von 1mm Länge und 0.3mm Breite, dann wieder von 3mm Länge und 1mm Breite spricht, gibt Bischof et al. (2013) den Durchmesser des Transversalschnitts (also die Breite) mit 0,5-1mm an. Die in dieser Untersuchung dokumentierten MKs, die dem Stadium 5 zugeordnet wurden, sind aber durchschnittlich nur 700µm lang und etwa 500µm breit. Auch die im Feld gesammelten MKs waren wohl deutlich größer als 1mm. Die mittels Mikroskop untersuchten MKs waren allerdings allesamt deutlich kleiner als diese Näherungswerte. Das kann bedeuten, dass es sich bei den als reif definierten MKs (Stadium 5) noch gar nicht um fertig entwickelte MKs gehandelt hat, sondern sich diese lediglich frühzeitig durch die Präparation vom Trichiliumgewebe getrennt haben, während sich die größten MKs beim Transport oder der Entwässerung gelöst haben. Da zwei verhältnismäßig kleine Trichilien untersucht wurden, wäre eine andere Erklärung für die kleinen MKs, dass die Größe der MKs an die Größe des Trichiliums gekoppelt ist (wogegen allerdings Feldbeobachtungen sprechen). Vorstellbar ist auch, dass sich die MKs, bereits vom Gewebe gelöst, weiterhin teilen und

an Volumen zunehmen. Zudem kann es auch während der Fixierung zu einem Größenverlust der Proben kommen (Mayer, persönliche Mitteilung).

Wie die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigten, finden sich auf einem Trichilium MKs unterschiedlichster Entwicklungsstadien. Das belegt auch die CT-Untersuchung, allerdings konnten die kleinsten Stadien bei der CT-Untersuchung, im Gegensatz zur LM-Untersuchung, nicht erfasst werden (Fig. 4A-B). Die CT-Untersuchungen zeigen allerdings besser, wie ungemein dicht die MKs gelagert sind (Fig. 6C-D). Auffallend ist auch hier, dass sich bei den reiferen MKs selten zwei MKs gleicher Größe nebeneinander befinden. Auch die CT-Untersuchungen deuten somit auf einen Kontrollmechanismus hin, der verhindert, dass zwei direkt benachbarte MKs zur gleichen Zeit reifen.

Dass die MKs bei der Behandlung mit Wismut nicht kontrastierten, deutet auf ihre Zusammensetzung hin. Lipide und Polysaccharide zeigen nämlich nur bei der Behandlung mit Wismut eine sehr schwache Kontrastierung (Weber, persönliche Kommunikation). Da MKs reich an Lipiden und Glykogen sind (Rickson 1976, Bischof et al. 2013), ist es nicht verwunderlich, dass die MKs bei Kontrastierung mit Wismut in den Aufnahmen nur als >Löcher< in der Trichiliumoberfläche zu erkennen waren.

4.1.2 Umfang der MK-Produktion

Bei der Analyse der Trichilien mittels Computertomographie wurde deutlich, welche enorme Anzahl an MKs ein einzelnes Trichilium bilden kann. In Fig. 2B sind über 600 MKs unterschiedlicher Entwicklungsstadien zu erkennen, obwohl nur eine Seite des Trichiliums zu sehen ist. Hochgerechnet produziert ein aktives Trichilium somit über 1000 MKs gleichzeitig. Da jede Pflanze mehrere aktive Trichilien hat, die über einige Monate MKs produzieren, wird deutlich, welche Menge an MKs *Cecropia* als Nahrung für die mit ihr assoziierten Ameisen produziert.

Folgarait et al. (1994) stellten bei einem Langzeitexperiment an der peruanischen *Cecropia* sp. *B.* (eine Unterart von *C. membranacea*) fest, wie viele MKs ein Trichilium in seiner gesamten Lebensspanne produziert. Dabei wurden je zwei gleich positionierte Trichilien mehrerer Pflanzen von *C. sp. B.* untersucht. Die durchschnittliche Lebensdauer der beiden Trichilien betrug 96 ± 11.3 (STABW) bzw. 90.2 ± 19.4 (STABW) Tage. Bei simulierter Ameisenpräsenz betrug die durchschnittliche MK-Produktion 766 bzw. 855.5 MKs über die gesamte Lebensspanne (Folgarait et al. 1994). Im Vergleich zu den hochgerechneten 1000 MKs, die in der hier untersuchten Trichiliumprobe von *C. cf. peltata* zu einem einzigen Zeitpunkt ermittelt wurden, scheinen die Werte von *C. sp. B.* relativ gering. Möglicherweise bestehen artspezifische Unterschiede in der MK-Produktion zwischen *C. cf. peltata* und *Cecropia* sp. *B.* Da von *Cecropia membranacea* nur die reifen, auf der Trichomoberfläche

präsentierten MKs gezählt wurden, ist es auch denkbar, dass gar nicht alle der in einem Trichilium gebildeten MKs zur vollständigen Entwicklung kommen. Der Unterschied in der Anzahl der MKs könnte letztlich auch damit erklärt werden, dass die Zählung, obzwar gewissenhaft durchgeführt, falsche Anhaltspunkte für die Hochrechnung lieferte.

4.1.3 Versorgung des Trichiliums

Die anatomischen Untersuchungen zeigten, dass das gesamte Trichilium von Leitbündeln durchzogen wird. Ein ungewöhnlich dichtes Netzwerk von vasikulären Bündeln dominiert das gesamte Trichilium. Die naheliegende Erklärung dafür ist, dass eine ungewöhnlich hohe Menge an Nährstoffen in das Trichilium transportiert werden muss. Es wurde bereits erläutert, wie produktiv ein einzelnes Trichilium ist. Um die hohe Produktionsrate zu gewähren, ist natürlich ein entsprechend stark ausgeprägtes Versorgungsnetzwerk notwendig.

4.1.4 Anatomie und Funktion Trichome

4.1.4.1 Einfache Trichome

In der Binokularansicht wurde deutlich, wie ungemein dicht die Trichome die Oberfläche des Trichiliums bedecken. Auffallend dabei ist, dass die Trichome an der Basis anders ausgeprägt sind, als an deren Spitze. Dieser Farbverlauf lässt sich vermutlich durch unterschiedliche Pigmentierung erklären. Die geriffelte Struktur der Spitze der einfachen Trichome ist möglicherweise auf die Präparationsmethode zurückzuführen.

Entscheidender als die erwähnte farbliche Aufteilung der einfachen Trichome in eine Basis und eine Spitze ist allerdings die damit einhergehende unterschiedliche Struktur des Trichoms. An der hellen Basis stehen die Trichome sehr dicht nebeneinander und dieser Bereich scheint um einiges unnachgiebiger als die gekräuselten Spitzen. Möglicherweise besteht dadurch auch ein funktioneller Unterschied. Eine mögliche Erklärung wäre nämlich, dass die dichte Basis als **Stütze für die MKs** dient. Die MKs werden sehr dicht von den Trichomen umlagert. Tatsächlich ist es wahrscheinlich, dass sich die MKs durch das Wachstum Platz verschaffen, indem sie durch die Größenzunahme die Trichome von sich wegbiegen. Eine solch kompakte Struktur ist natürlich dementsprechend stabil. Die MKs, die ja schließlich nur an einer relativ schmalen Basis mit dem Trichiliumgewebe verbunden sind (Fig. 5A), könnten durch die Haare ausreichend gestützt werden. Allerdings werden nur die unvollständig entwickelten MKs von der Basis umhüllt. Dass sich die Trichome im oberen Bereich kräuseln, könnte dementsprechend einen besonderen Nutzen für die reifen MKs haben. Die ausgewachsenen MKs ragen aus dem Trichompolster heraus oder liegen sogar auf dieser auf. Durch

die lockere Struktur ist es den MKs zum einen möglich, leichter nach oben zu kommen, während die gekräuselten Enden möglicherweise die MKs an der Trichiliumoberfläche halten könnten. Diese Struktur könnte den >kopfüber< unter dem Petiolus hängenden MKs den nötigen Halt verleihen. Die Riffelung könnte zudem verhindern, dass die herausgedrückten MKs wieder zurückgleiten.

Neben der stützenden Funktion könnte die Struktur der Trichome auch als **Schutz für die MKs** fungieren. Zumindest die jungen MKs werden schließlich von dem dichten Trichompolster überlagert. Dadurch sind sie vor potentiellen Nahrungskonkurrenten der Ameisen versteckt und geschützt. Dass MKs trotz der aggressiven Verteidigung der Ameisen von Konkurrenten abgeerntet werden, wurde nämlich mehrfach beobachtet. LaPierre (2007) dokumentierte in einer Untersuchung Sozialparasitismus bei *Cecropia*. Es wurde nachgewiesen, dass die Wespenart *Charterginus* sp. in Costa Rica MKs von *C. insignis* und *C. obtusifolia* sammelte und das, auch wenn diese Pflanzen besiedelt waren. Mitunter benutzen die Wespen sogar ein Ablenkungsmanöver, um die MKs ungestört zu rauben (LaPierre 2007). Dass Wespen Trichilien abernten, wurde auch im Zuge dieser Arbeit beobachtet. *Azteca* schälen die MKs stellenweise regelrecht aus den Trichompolstern heraus, um sie abtransportieren zu können (persönliche Beobachtung, Mayer, persönliche Mitteilung).

Die Funktion der Trichome könnte nun allerdings auch darin liegen, dass auch die relativ reifen MKs abgeerntet werden können, während die zahlreichen jüngeren MKs durch die Trichompolster geschützt sind und so unbehelligt bleiben. Die produktiven äußersten Zellreihen der Trichiliumbasis (Fig. 4A-C) werden so zudem vor Verletzung, Austrocknung und starker UV-Strahlung geschützt. Auch Rickson (1976) führt in seinen Überlegungen zur Funktion der Trichome die beiden diskutierten Möglichkeiten an (physikalische Stütze und Schutz). Er weist darauf hin, dass die Trichome nicht zwingend für die MK-Produktion nötig seien, weil auf karibischen Inseln trichomlose *Cecropien* gefunden worden seien, die dennoch MKs produzieren. Zudem verweist er auf die Dokumentation karibischer Exemplare mit voll entwickelten Trichilien mitsamt Trichomen, die keine MKs produzieren (Rickson 1976, Putz & Holbrook 1988, Folgarait et al. 1994).

Es wurde vermutet, dass der Aufbau der Trichome als Stütze fungieren könnte, wobei jedoch noch nicht auf die Rolle des Symbiosepartners eingegangen wurde. Die MKs dienen schließlich den Ameisen als Nahrungsgrundlage und werden von diesen abgeerntet. Beim Ernten wird je eines der an der Trichiliumoberfläche präsentierten MKs von den Ameisen mit den Mundwerkzeugen aufgenommen und ins Domatium transportiert. Doch nur die wenigsten MKs befinden sich zur Gänze auf der Oberfläche des Trichiliums. Die Ameisen ziehen vielmehr die MKs aus dem Trichilium heraus (Rickson 1976, persönliche Beobachtungen) oder schälen sie mitunter, wie bereits erwähnt, aus dem Trichompolster. Die Struktur des Trichiliums scheint dabei die Ernte zu erleichtern. Auch beim

manuellen Abernten für die Analyse der Metabolite ließen sich die MKs mit der Spitze einer Präpariernadel aus dem Trichilium ziehen oder kamen durch den Druck der Nadel aus dem Polster heraus. Folgarait et al. (1994) verweist zudem darauf, dass mehr MKs produziert werden, wenn diese tatsächlich abgeerntet werden. Sie konnten in einem Glashausversuch nachweisen, dass bei manueller Entfernung der MKs, die Trichilien signifikant mehr MKs produzierten als bei den Kontrollgruppen. Dieser Unterschied besteht allerdings nur bei einem durchschnittlichen Nährstoffniveau (Folgarait et al. 1994). Die Produktion der MKs wird somit durch das Abernten der Ameisen stimuliert. Möglicherweise wird durch das Herausziehen der MKs aus dem Trichompolster die erhöhte Produktionsrate getriggert. Bei den komplexen Trichomen könnte es sich demnach hypothetisch um >Fühlhaare< handeln, die zur **Erfassung der Ameisenaktivität** dienen. Dazu müsste eine Form von Reizleitung bestehen, die eine Interaktion zwischen Ameisen und Pflanzen ermöglicht. Da die komplexen Trichome jedoch weiß sind, handelt es sich dabei vermutlich um tote Zellen, was gegen diese Überlegung spricht. Diese Annahme müsste experimentell überprüft werden.

Doch es gibt noch weitere Erklärungen für die Funktion des Trichompolsters, die die bereits angedachten weiterführen. Schutz könnten die Trichome nämlich nicht bloß vor Insekten, die ohne Gegenleistung MKs abernten, bieten, sondern auch vor der Sonne. Das Trichilium könnte somit als **Austrocknungsschutz** fungieren. Bei der Feldarbeit und im Glashaus konnte beobachtet werden, dass auf Trichilien, die lange nicht von den Ameisen abgeerntet wurden (weil unbesiedelt, oder mit Tangle-Trap geschützt), eingeschrumpelte MKs vorgefunden werden konnten. Die Trichome könnten somit die jüngeren MKs vor dem Austrocknen schützen beziehungsweise Sonneneinwirkung auf die produktiven Schichten mit den gerade gebildeten MKs verhindern. Da es sich bei *Cecropia* schließlich meist entweder um Pionierpflanzen oder um >Gap-Species<, die neu entstandene Lichtungen sehr rasch besiedeln, handelt (Folgarait & Davidson 1994), sind sie standortbedingt stark sonnenexponiert. Zudem ist die Sonneneinstrahlung, für die hoch wachsenden *Cecropia* im Baumkronenbereich relativ extrem, was auch zu starker Evaporation und damit einhergehenden Wasserverlust führt (Mayer, persönliche Mitteilung). Dichte Behaarung ist eine im Pflanzenreich häufig auftretende Methode, um Austrocknung vorzubeugen (Lusa et al. 2015). Möglicherweise herrscht in den Trichompolstern auch ein eigenes Mikroklima, das der Austrocknung vorbeugt.

Die Binokularuntersuchungen und persönliche Beobachtungen zeigten, dass vor allem reife MKs an der Trichomoberfläche präsentiert sind, während die jungen MKs noch gänzlich von den Trichomen bedeckt sind. Der Trichompolster schützt somit nicht nur die jungen MKs, sondern ist wahrscheinlich aktiv am Transport der reifen MKs an die Oberfläche beteiligt. Während der Ernte der MKs konnten

Beobachtungen gemacht werden, die darauf hindeuten, dass die Anzahl der auf einem Trichilium präsentierten MKs von der Luftfeuchtigkeit abhängt.

Wahrscheinlicher ist es aber, dass die Ausgabe reifer MKs von der Luftfeuchte beeinflusst wird und es eine **Kopplung der Präsentation der MKs mit dem Klima** gibt. Rossel & Weizer zeigten in einer nicht publizierten Untersuchung (2014), anhand einiger *Cecropia*-Pflanzen, dass diese nicht gleichmäßig, sondern in einem relativ begrenzten Zeitraum MKs produzieren. Der Produktionsbeginn und -stopp war mit Änderungen der relativen Luftfeuchte und der Temperatur gekoppelt, die in diesem Ausmaß zu keiner anderen Tagesphase auftraten. Ein deutlicher Abfall der relativen Luftfeuchte läutete die MK-Produktion ein. Der Anstieg der relativen Luftfeuchte war hingegen mit der Abnahme der Produktion verbunden. Der Start der Produktion fiel mit einem Tiefpunkt der relativen Luftfeuchte (ca. 55%) und einem Hoch in der Temperatur (36°C) zusammen (Rossel & Weizer 2014). Möglicherweise sind besagte Trichome also hygroskopisch und reagieren auf die Luftfeuchtigkeit. Das würde auch den zweigeteilten Aufbau der Trichome erklären. Bei abnehmender Luftfeuchte ziehen sich die Trichome womöglich zusammen und drücken so die MKs nach oben an die Oberfläche. Fig. 1C zeigt deutlich, wie stark umhüllt das MK ist. Ziehen sich die Trichome nun an der Basis zusammen, wird das MK automatisch nach oben gedrückt. Es ist zudem denkbar, dass die Trichome bei hoher Luftfeuchtigkeit aufquellen und so die MKs nicht aus dem Trichompolster freigeben.

Die klimatischen Bedingungen erleichtern dabei nicht nur einen Prozess, der sonst womöglich auf energetisch aufwendigerem Wege bewerkstelligt werden müsste, sondern die Präsentation der MKs erfolgt zu einem für die Pflanze perfekten Zeitpunkt. Regen, der die MKs durchnässen oder abwaschen könnte, führt zu einem Anstieg der Luftfeuchtigkeit, weswegen keine neuen MKs an der Trichiliumoberfläche präsentiert werden.

4.1.4.2 Komplexe Trichome

Neben den einfachen Trichomen wurden noch die längeren, dickeren und weißen **komplexen Trichome** dokumentiert. Die Untersuchung der komplexen Trichome zeigte, dass sie regelmäßig über das Trichilium verteilt sind, aber besonders an den Rändern des Trichiliums auftreten. Es wurden jedoch zum einen zu wenig Proben zu rudimentär untersucht, um darin einen tatsächlichen Trend feststellen zu können. Zum anderen kann es sein, dass nur deswegen dieser Eindruck entstanden ist, weil die weißen Trichome an den Ecken exponierter und die braunen Trichome möglicherweise kürzer sind.

Die CT-Untersuchungen deuten darauf hin, dass die zahlreich auftretenden MKs zwischen den weißen Trichomen gelagert sind. Da die MKs die weißen Trichome kaum verdrängen, entsteht der Eindruck, dass sie zwischen diesen angeordnet sind (Fig. 3C). Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen konnte zwar ein zweiter Trichomtyp mit verdickten Zellwänden dokumentiert werden, allerdings lassen die Schnitte kaum weitere Rückschlüsse zu.

Welche Funktion die speziellen Trichome ausüben, lässt sich schwer feststellen. Möglicherweise erfüllen sie eine der zuvor diskutierten Aufgaben. Da sie dicker und wohl auch widerstandsfähiger als die braunen Trichome sind, könnten sie zur Abwehr von Räufern dienen. Das würde auch erklären, warum sie an den Ecken scheinbar vermehrt auftreten. Sie könnten als Barrikade fungieren, die verhindert, dass Insekten das Trichilium betreten. Allerdings sorgen die aggressiven *Azteca* wohl bereits für ausreichend Schutz. Ebenso könnten sie als Regenschutz dienen, der verhindert, dass den Stamm hinabfließendes Wasser das Trichilium durchnässt. Ihre weiße Färbung kann auch ein Indiz dafür sein, dass sie zu einem Mikroklima beitragen, mit dem der Sonneneinstrahlung entgegen gewirkt wird. Des Weiteren wurde bereits diskutiert, ob die weißen Trichome zur Wahrnehmung der Ameisenaktivität dienen könnten.

Der Zusammenhang zwischen der Anordnung der MKs und der weißen Trichome, auf den die CT-Untersuchungen hinweisen, deutet auf eine mögliche andere Funktion hin. Möglicherweise tragen die weißen Trichome auch zur Regulierung der MK-Produktion bei. Sie könnten zum einen als begrenzende Säulen dienen, die aufgrund ihrer Robustheit den heranwachsenden MKs Stabilität verleihen. Zudem ist es denkbar, dass die Trichome als Begrenzung für die MKs fungieren, die kontrollieren, ab welcher Größe die MKs nach oben zu wandern beginnen.

4.2 Ethologische Untersuchungen

Es wurden zwei *Azteca*-Königinnen gefilmt, die sich dasselbe Domatium teilen. Eine Königin der Art *A. xanthochroa* und eine *A. cf. alfari* wurden im gleichen Domatium gefilmt.

In Costa Rica gibt es vier *Azteca*-Arten, die obligat *Cecropia* besiedeln: *A. constructor*, *A. xanthochroa*, *A. coeruleipennis* und den *A. alfari*-Komplex, wobei letzterer von zwei Arten gebildet wird, *A. alfari* und *A. ovaticeps*. Diese besiedeln meist die oberen Internodien (Longino 2010). Obwohl die Königinnen gefilmt, aber nicht gefangen und zur eindeutigen Bestimmung getötet wurden, konnte durch die Filmaufnahmen eine relativ zuverlässige Artbestimmung durchgeführt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Färbung der Individuen (eine Königin sehr dunkel, eine sehr hell), kann auf jeden Fall davon ausgegangen werden, dass es sich um unterschiedliche Arten handelt.

Dass unterschiedliche Kammern derselben Pflanze gleichzeitig von Gründerköniginnen besiedelt und bewohnt werden, ist nicht ungewöhnlich. Auch dass sich zwei Königinnen eine Kammer teilen, ist sehr häufig. Die Hierarchiekämpfe um die Dominanz der Pflanze beginnen meist erst mit dem Schlüpfen der ersten Arbeiterinnengeneration (Longino 2010).

Der Wettstreit, um die Dominanz einer Kolonie bei *Azteca* beschäftigte die Forschung bereits sehr früh. Bereits von Ihering (1907), der sich schon vor über 100 Jahren mit der *Cecropia-Azteca*-Beziehung intensiv auseinandersetzte, weist auf Kämpfe konkurrierender Königinnen hin. Aufeinandertreffende Königinnen, die um denselben Wohnraum konkurrieren, kämpfen laut von Ihering (1907) bis auf den Tod. Spätere Beobachtungen zeigten allerdings, dass die koloniegründenden Königinnen in neu besiedelten Domatien vorerst friedlich nebeneinander existieren. Choe & Perlman (1997) berichten etwa von Gebieten, in denen es gewöhnlicherweise zu Pleometrose (mehrere Königinnen gründen gemeinsam eine Kolonie) kommt. Es wurden viele (bis zu zwanzig) Königinnen der gleichen *Azteca*-Art in einem einzigen Internodium vorgefunden (Choe & Perlman 1997, Mayer persönliche Mitteilung). Dass zwei Individuen unterschiedlicher *Azteca*-Arten, ein Domatium besiedeln, ist somit nicht weiter ungewöhnlich. Es konnte keine auffallende Interaktion zwischen den beiden Königinnen gefilmt werden.

Bei der Neubesiedlung einer *Cecropia*-Pflanze wirft die Gründerkönigin zunächst ihre Flügel ab, öffnet das Prostoma, und schlüpft durch die Öffnung ins Innere der Pflanze. Das Prostoma wird anschließend mit von den Wänden abgekratztem Parenchym wieder verschlossen (ein wiederverschlossenes Prostoma wurde auch bei den Untersuchungen als Indiz einer Neubesiedlung herangezogen). Im ersten Domatium, das die Königin besiedelt, verbleibt diese, bis sie die erste Generation an Arbeiterinnen herangezogen hat, d.h. die Koloniegründung erfolgt klaustral. Um genug Energie dafür aufzubringen, greift sie auf Reserven ihrer Flugmuskulatur zurück (von Ihering 1907, Sagers 2000, Davidson 2005).

Es konnten keine Verhaltensbeobachtungen gemacht werden, die Rückschlüsse darauf zulassen, dass die Ameisen ihre mit Pilzen beimpften Parenchypellets, die sie vor dem Eierlegen anfertigen, mit Fäzes oder MKs düngen. Es konnte jedoch beobachtet werden, wie eine Königin (*A. cf. alfari*) ein Häufchen am Internodienboden platzierte. Longino (1991) berichtet von häufig in Internodien vorzufindenden braunen, klebrigen, kleiartigen Häufchen, die bereits Müller als „Knollen“ bezeichnet habe. Sie bestehen laut Longino (1991) zum Teil aus abgekratztem Internodiengewebe und sind von kleinen Fliegenlarven und Nematoden bevölkert.

Die hervorgewürgte Substanz war allerdings weiß und keinesfalls braun. Dass es sich dabei um ausgewürgtes Internodiengewebe handelt, ist jedoch keinesfalls abwegig, weil das Gewebe sich bei Oxidation braun färbt (Mayer, persönliche Mitteilung). Valverde & Hanson (2011) weist darauf hin, dass eine Schicht des Parenchyms des Internodiums von den Königinnen gegessen wird und vermutet, dass dieses wohl eine zusätzliche Nährstoffquelle für koloniegründende Königinnen darstellt. Möglicherweise handelt es sich bei dem Häufchen also lediglich um schwer verdauliches Parenchymgewebe. Es ist aber auch möglich, dass die Substanz mit Keimen, auch jenen von Pilzen angereichert wurde.

Dass allerdings keine eindeutige Beimpfung bzw. Düngung eines Pilzpatches beobachtet werden konnte, kann damit zusammenhängen, dass die Ameisenköniginnen und vor allem die Ameisen (bei größeren Kolonien) während der gesamten Videoaufnahme vor allem alarmiert waren und eventuell kein normales Verhalten zeigten. Obwohl versucht wurde das Endoskop so wenig wie möglich zu bewegen und auch mehrmals in das gleiche Domatium hineingefilmt wurde (die Öffnung wurde dabei zwischenzeitlich mit einem Blatt der Versuchspflanze geschlossen), haben sich die Ameisen während der Beobachtungsdauer von zwei bis drei Stunden an je drei aufeinanderfolgenden Tagen nicht an das Vorhandensein des Endoskops gewöhnt. Das Endoskop und das gebohrte Loch wurden von den Ameisen anscheinend als zu große Störung empfunden. Dafür spricht auch, dass einmal beobachtet werden konnte, wie eine Königin das Domatium verlassen hatte, was in diesem frühen Besiedlungsstadium sehr ungewöhnlich ist (Sagers 2000). Vermutlich wurde das relativ große Loch im Domatium als zu große Störung wahrgenommen.

Um das natürliche Verhalten der Ameisen erfolgreicher zu untersuchen, müssten einige Adaptionen im Versuchsaufbau durchgeführt werden. Die Apparatur stets neu aufzubauen ist nicht sinnvoll, da dies von den Ameisen immer wieder aufs Neue als Störung empfunden wurde. Es sollte also versucht werden, einen längeren Beobachtungszeitraum zu gewähren und die Kamera mitsamt eingeschalteter Beleuchtung mehrere Tage am Stück im Einsatz zu haben. Aufgrund des täglichen Regens, viel zu schwacher Batterien und Akkus, und des Wertes der Ausrüstung konnte das allerdings nicht durchgeführt werden. Eine solide Apparatur in einem geschützten Bereich zu errichten, wäre die produktivste Untersuchungsmethode.

4.3 Analyse der Metabolite

Es wurden chemische Analysen acht unterschiedlicher Gewebe (Arbeiterinnen, Larven, Puppen, Geschlechtstiere, Pilzpatch, MKs, Trichilium und Trichome) durchgeführt, wobei besonders die Substanzklassen Aminosäuren (=AS), Kohlenhydrate, Fettsäuren (=FS) und Sterole näher betrachtet

wurden. Einige myrmekophytische Pflanzen wurden bereits auf ihre Inhaltsstoffe untersucht und deren Lipid-, Protein- bzw. Kohlenhydratzusammensetzung ausführlich diskutiert (etwa Rickson 1976, O'Dowd 1982, Heil et al. 1998, Fischer et al. 2002, Heil et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch zum ersten Mal mit einem metabolics-Ansatz gearbeitet, um die Inhaltsstoffe zu analysieren.

Für den Vergleich mit älteren Analysen gibt es dadurch allerdings zwei Schwierigkeiten:

Erstens wurde der prozentuelle Gesamtanteil der Substanzklassen pro mg Trockengewicht nicht berechnet. Es wurde zwar versucht eine Auftrennung in Lipide, Proteine usw. durchzuführen, aufgrund der großen Schwankungen der Massen in den Zwischenschritten wurde jedoch ein moderneres Protokoll gewählt. Ein Vergleich mit dem Gesamttrockengewicht einer Substanzklasse kann daher nicht gezogen werden.

Zweitens wurden die vorgefundenen Substanzen nicht absolut quantifiziert. Untersuchungen von Futterkörperchen, die Einzelsubstanzen (etwa diverse Kohlenhydrate) miteinander vergleichen, quantifizieren diese meist, um so die prozentuale Zusammensetzung einer Substanzkategorie (etwa Kohlenhydrate) auszudrücken. Eine absolute Quantifizierung der Substanzen wurde aber aus zweierlei Gründen nicht durchgeführt: Zum einen wurde aufgrund des hohen Arbeitsaufwands beschlossen, die Quantifizierungen in Nachuntersuchungen vorzunehmen, zum andern finden sich in den verwendeten Standards bei weiten nicht alle in den Geweben identifizierte Substanzen. Eine Quantifizierung aller Substanzen ist somit nicht möglich. Es wurde versucht, eine möglichst große Zahl unterschiedlicher Metabolite zu identifizieren, wodurch ein sehr breites Substanzspektrum eruiert wurde, das allerdings eine absolute Quantifizierung erschwert.

Eine weitere Herausforderung bei der Interpretation ist zudem, dass nur bestimmte Substanzklassen bei der GC-MS festgestellt werden. Über Proteine, Lipide oder große Polysaccharide, wie Glykogen, das in großen Mengen in den MKs eingelagert wird (Rickson 1976, Bischof 2013), können so keine Aussagen getroffen werden. Zudem ist es möglich, dass Substanzen in dem einen Gewebe schnell umgebaut werden, während die gleiche Substanz in einem anderen Gewebe kaum weiterverarbeitet wird und sich deshalb als großer Pool ansammelt. Die Detektion einer großen Menge einer Substanz kann somit auch lediglich der Ausdruck einer >Sackgasse< in einem Stoffwechselweg sein (Fragner, persönliche Mitteilung). Über die Geschwindigkeit dieser Umwandlungsprozesse lassen sich kaum Aussagen treffen, weshalb viele Fettsäuren nicht zwingend auf große Mengen an Lipiden und viele Aminosäuren auf große Mengen an Proteinen hinweisen müssen.

Dennoch werden im Kommenden immer wieder Querverbindungen zur Literatur gezogen, da in der vorliegenden Arbeit die Trends sehr deutlich sind.

4.3.1 Substanzkategorien in den Geweben

4.3.1.1 Freie Aminosäuren in den Geweben

Die Analyse der freien AS ergab, dass die meisten AS in den Insektengruppen nachgewiesen wurden. Die Analyse zeigte dabei drei wichtige Trends: (1) Es wurden bei den Ameisen in den juvenilen Entwicklungsstadien deutlich mehr AS als in den adulten Stadien dokumentiert; (2) zudem wiesen bei den pflanzlichen Geweben die Müller'schen Körperchen (MKs) die meisten AS auf; (3) es fanden sich im Pilzpatch deutlich weniger unterschiedliche AS und in geringeren Mengen als in den Ameisen und Pflanzen.

Grundsätzlich bevorzugen Ameisen unterschiedlicher Entwicklungsstadien oft verschiedene Substanzkategorien (Howard & Tschinkel 1981). Demnach werden Lipide vor allem von Arbeiterinnen und Larven (Echols 1966), Kohlenhydrate vor allem von nahrungssuchenden Arbeiterinnen und Larven (Sorensen et al. 1981, Cassill & Tschinkel 1999) und Proteine vor allem von heranwachsenden Larven und eierlegenden Königinnen benötigt (Lange 1967, Vinson 1968) AS werden hingegen in der gesamten Kolonie geteilt (Howard & Tschinkel 1981; Fischer et al. 2002). Tatsächlich konnten in der vorliegenden Arbeit in allen Ameisenstadien viele unterschiedliche AS nachgewiesen werden, eine gleichwertige Verteilung der AS in allen Entwicklungsstadien wurde hingegen nicht gefunden. In den juvenilen Stadien fanden sich im Schnitt 1.5mal mehr AS als in den adulten Stadien. Auch wenn diese Ratio im Vergleich mit anderen ermittelten Verhältnissen einen bescheidenen Unterschied darstellt, verdeutlicht dies doch einen Trend. Auch für die Differenzierung von juvenilen und adulten Stadien in der PCA sind u.a. Aminosäuren verantwortlich. So wurden etwa drei Mal so viel Proline in den juvenilen als in den adulten Entwicklungsstadien festgestellt.

Wheeler & Martínez (1995) betonen die wichtige Rolle von Storage-Proteinen während der Larvalentwicklung, die auch Aufschluss über die erhöhten AS-Werte in den adulten Stadien liefern könnten. Speicherproteine treten bei Insekten häufig in den späten Larvenentwicklungsstadien auf. Während der Metamorphose ist ein hoher Bedarf an Ressourcen für den Gewebeauf- bzw. -umbau mit fehlender Nahrungsaufnahme gepaart, sodass die Entwicklung in der Puppe rein durch gespeicherte Reserven vorangetrieben wird. Die Synthese und Lagerung von Proteinen erlauben das Lukrieren von AS in Zeiten der Nahrungsknappheit oder des erhöhten Bedarfs (Wheeler & Martínez 1995). Die erhöhten Ratios der AS, die in Larven und Puppen festgestellt wurden, könnten somit ein Ausdruck der Synthese und des Umbaus von Speicherproteinen sein. Demnach wären die höheren AS-Werte im Larvenstadium damit zu erklären, dass in dieser Phase viele AS zur Synthese von Speicherproteinen benötigt werden, während das AS-Vorkommen in den Puppen, das im Schnitt den höchsten AS Anteil aller Gewebe hat, eine Nutzung der Speicherproteine für Umbauprozesse

verdeutlichen könnte. Zwar ist es problematisch, von der Anzahl der AS auf den Proteingehalt rückzuschließen, dennoch bieten die Speicherproteine die plausibelste Erklärung für das Vorkommen der AS in den juvenilen Stadien; vor allem wenn man die unterschiedlichen Typen dieser Proteine näher beleuchtet.

Es gibt drei unterschiedliche Typen dieser Speicherproteine: Hexamine bilden die größte Gruppe, VHDLs (very high density Lipoproteins) zeichnen sich durch besonders hohe Dichte aus und bei der letzten Gruppe handelt es sich um Proteine, die sehr hohe Anteile an Glutamine oder Glutamic acid aufweisen (Wheeler & Martínez 1995). Glutamic acid konnten in den MKs und den Insekten in sehr hohen Mengen nachgewiesen werden, während es im Trichilium, in den Trichomen und besonders im Pilzpatch in nur sehr geringen Mengen vorkam (Glutamic acid: Ratio: MKs/Pilzpatch=404.63). Es überrascht vor allem, dass Glutamic acid in den MKs in diesen hohen Mengen dokumentiert wurde. Bei der S5-Untersuchung zeigten die MKs sogar den höchsten durchschnittlichen Glutamic acid-Areawert aller Gewebe (allerdings bei hoher STABW). Das ist insofern bemerkenswert, weil bei fast allen untersuchten AS die Insektengewebe die durchschnittlich höchste Area aufweisen. Nur in fünf der untersuchten AS (20.8%) war ein anderes Gewebe in höheren Mengen vorhanden. Zudem weist Glutamic acid in der S5-Untersuchung die höchste Area aller 147 untersuchten Substanzen auf.

Der Speicherproteintyp, der hohe Glutamine/Glutamic acid-Anteile aufweist, wurde nur bei Bienen und Ameisen nachgewiesen und ist in der Regel am Anfang des Puppenstadiums am häufigsten. Am Ende der Entwicklung in den Puppen sind diese Reserven aufgebraucht (Wheeler & Martínez 1995). Der hohe Anteil an Glutamic acid in den MKs könnte somit dafür sprechen, dass diese besonders an die Larven verfüttert werden, weil sie den hohen Bedarf an Glutamic acid decken können. Wenn nun in der frühen Entwicklung der Puppen die Menge der Speicherproteine am höchsten ist, kann angenommen werden, dass diese Proteine wohl vor allem in der larvalen Phase aufgebaut werden. Für diese Proteinsynthese bieten die aminosäurereichen MKs, die zudem noch große Mengen Glutamic acid aufweisen, wohl optimale Voraussetzungen.

Bei den Insekten selbst wiesen Geschlechtstiere, Arbeiterinnen, Larven und Puppen ähnliche durchschnittliche Areawerte von Glutamic acid auf. Höhere Glutamic acid Werte konnten in Larven und Puppen trotz insgesamt höherer AS Werte nicht festgestellt werden. Wheeler & Martínez (1995) verweisen allerdings auf Phasen, in denen Speicherproteine auch in ausgewachsenen Ameisen vorzufinden sind. Bei Königinnen, die ihre Kolonien claustral bilden, also in der Phase der Entwicklung der ersten Arbeiterinnengeneration nicht auf Nahrungssuche gehen, wurden bei einigen Ameisenarten (*Crematogaster opuntiae*, *Pheidole spadonia*, *Solenopsis xyloni* und *Conomyrmas* sp.) Speicherproteine dokumentiert (Wheeler & Buck 1995). Da auch Königinnen von *Azteca* ihre

Kolonien claustral gründen, könnten sich die hohen Arewerte von Glutamic acid in den Geschlechtstieren durch das Vorkommen von Speicherproteinen erklären lassen.

Neben Glutamic acid konnte noch eine Vielzahl anderer AS festgestellt werden, die ebenso detaillierter diskutiert werden sollten. Davis (1975) untersuchte die AS-Bedürfnisse von Mehlkäfern (*Tenebriomolitor*) über mehrere Generationen. Um essentielle AS festzustellen, verabreichte er den Tieren einen AS-Mix, in dem je eine AS fehlte. Über die Überlebensrate und Gewichtszunahme der Larven konnte er so Rückschlüsse darüber ziehen, welche AS eine besondere Rolle in der Ernährung spielen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Mehlkäfer die gleichen zehn essentiellen AS (Lysine, Isoleucine, Tryptophan, Methionine, Leucine, Phenylalanine, Valine und Threonine Histidine, Arginine) benötigen, die auch beim Wachstum von Ratten und anderen Vertebraten von Bedeutung (Davis 1975) und die auch zum Großteil (Arginine und Histidine sind nur bedeutend für das normale Wachstum) für den Menschen essentiell sind (Ganong 2013). Mittlerweile werden neben den genannten AS auch Glycine und Serine als für Insekten essentiell betrachtet, während Histidine und Arginine ausgenommen werden. (Hagen et al. 1984, Chen 1985, Gewecke 1995, Barbehenn et al. 1999).

Von diesen zehn essentiellen AS (exklusive Histidine und Arginine) wurden in der qualitativen Analyse 8 in den MKs nachgewiesen. Bei den Ameisenproben wurden in der qualitativen Analyse 9 der essentiellen AS nachgewiesen. Von jenen essentiellen AS, die auch in *Azteca* nachgewiesen wurden, waren fast alle auch in den MKs zu finden, während der Pilzpatch den Untersuchungen zufolge wohl kaum als Lieferant freier AS dient. Möglicherweise sind AS in den Pilzpatches in Proteinen gebunden. Hervorzuheben ist noch, dass in keiner einzigen Probe der acht unterschiedlichen Gewebe Tryptophan gefunden wurde. Interessanterweise verweisen auch Fischer et al. (2002) explizit darauf, dass in den Futterkörperchen von vier myrmekophytischen *Piper*-Arten kein Tryptophan gefunden wurde. In den Futterkörperchen von fünf myrmekophytischen *Acacia*-Spezies wurde hingegen auch Tryptophan nachgewiesen (Heil et al. 2004). Möglicherweise ist diese Aminosäure nicht für alle Ameisen essentiell.

González-Teuber & Heil (2009) fanden heraus, dass die symbiontischen Ameisen zweier myrmekophytischer *Acacia*-Arten (*A.cornigera*, *A.hindsii*) im extrafloralen Nektar (=EFN) eindeutig hohe AS-Konzentration bevorzugten. Zudem favorisierten diese die Nektarmischungen mit jenen vier AS, die den Nektar ihrer assoziierten Pflanze am signifikantesten charakterisierten. Bei der AS Zusammensetzung zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem EFN von nicht-myrmekophytischen und myrmekophytischen *Acacia*-Arten. Für die Differenzierung waren besonders Phenylalanine und Proline verantwortlich (González-Teuber & Heil 2009). Beide AS konnten auch in

den MKs nachgewiesen werden, lagen allerdings unter dem Durchschnitt. In den Futterkörperchen von *Acacia* wurden die Aspartate als dominanteste Fraktion aller AS nachgewiesen. Aspartate konnten auch in den MKs (dort unter Aspartic acid) dokumentiert werden. Hohe Konzentrationen von AS scheinen erheblich zum Geschmack von EFN beizutragen (González-Teuber & Heil 2009), daher könnten die hohe Anzahl und Menge von AS in den MKs (neben den Kohlenhydraten) einen wichtigen Beitrag zu Geschmack und Attraktivität der MKs leisten. Zu empfehlen wären Fütterungsexperimente mit AS-Mischungen, um eine Präferenz für spezielle AS von *Azteca* festzustellen.

4.3.1.2 Kohlenhydrate in den Geweben

Bei der Analyse der Kohlenhydrate ergaben sich folgende grundlegende Trends: (1) Die Arbeiterinnen wiesen von allen Ameisenproben die meisten Kohlenhydrate auf; (2) in den MKs fanden sich große Mengen von Fructose, Glucose und besonders Sucrose; (3) Trichilium und Trichome wiesen mit Abstand die höchste Kohlenhydrat-Ratio im Vergleich mit allen anderen Geweben auf. Besonders Fructose und Glucose fanden sich in diesen Geweben in überdurchschnittlich hohen Mengen; (4) der Pilzpatch liegt zwar wie bei allen Substanzkategorien am weitesten unter dem Gewebsschnitt, doch einige Kohlenhydrate (etwa Trehalose) finden sich im Pilzpatch häufiger als in den MKs.

Kohlenhydrate dienen für Insekten allgemein als essentielle Energiequelle und sind zudem wichtig für die Formation des Exoskeletts (Boevé & Wäckers 2003). Da sich Ameisen holometabol entwickeln und somit Arbeiterinnen/Geschlechtstiere keine Energie mehr in den Aufbau neuer Strukturen investieren müssen, dienen für diese Gruppen Kohlenhydrate vor allem als Energielieferant (Boevé & Wäckers 2003). Dass Kohlenhydrate besonders von nahrungssuchenden Arbeiterinnen konsumiert werden, wurde bereits hervorgehoben. Insofern ist es auch nicht verwunderlich, dass die höchsten Ratios in den Arbeiterinnen festgestellt wurden.

Ameisen können auf vielfältigste Weise Kohlenhydrate zu sich nehmen. EFN, floraler Nektar, Phloem- oder Xylemsaft, Fruchtbrei oder Honigtau können Quellen für Kohlenhydrate darstellen (Boevé & Wäckers 2003). Bei *Azteca* sind wohl vor allem die MKs und der Honigtau der im Inneren der Domatien gehaltenen *Coccoidea*, Hauptkohlenhydratquellen. Grundsätzlich können von Insekten aufgenommene Zucker auf dreifache Weise umgebaut werden: Die Kohlenhydrate können als Glykogen und Trehalose gespeichert oder mittels Oxidation als Energiequelle verwendet werden. Zudem werden Zuckerpolymeren zu Monosacchariden hydrolisiert. Das heißt, dass Kohlenhydrate nur als Monosaccharide die Darmwand passieren können (Weil 1987, Boevé & Wäckers 2003). Das in den MKs gelagerte Glykogen muss von den Ameisen zuerst in Monosaccharide zerlegt werden, bevor es als Energiequelle benutzt wird.

In den MKs finden sich aber auch Mono- und Disaccharide wie Fructose, Glucose und Sucrose, von denen sich der Großteil der Ameisen bevorzugt ernährt (Detrain & Prieur 2014). Alle drei Zucker können die intestinale Barriere von Insekten überwinden, zeigen sich sehr tauglich für metabolische Prozesse und wirken sich damit positiv auf das Überleben der Ameisen aus (Boevé & Wäckers 2003, Detrain & Prieur 2014). Die Präferenzen von Ameisen für bestimmte Zucker variieren allerdings auch artspezifisch. Bei Untersuchungen mit *Myrmica rubra* (Rote Gartenameise) wurden u.a. Fütterungsversuche mit diversen Kohlenhydraten durchgeführt und gezeigt, dass die Ameisen besonders lange (Feedingtime) Sucrose, Erlose und Melzitose aufnahmen. Die aufgrund der Mortalitätsrate geeignetsten Zucker waren u.a. Glucose, Melzitose, Sucrose und Trehalose (Boevé & Wäckers 2003). Auch bei der Untersuchung von *Lasius niger* (Schwarze Gartenameise) konnte festgestellt werden, dass diese stark auf Sucrose und Melezitose reagieren (Detrain & Prieur 2014). Bei den neben Sucrose oft präferierten Kohlenhydraten Erlose und Melzitose handelt es sich um Trisaccharide, die beide in den Proben nicht nachgewiesen werden konnten. Aufgrund der geringen Unterschiede im Spektrum von Kohlenhydraten kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die beiden Metabolite nachgewiesen wurden, jedoch lediglich als Unknown_Polysaccharid (auch Saccharide mit einer relativ geringen Anzahl von Monosacchariden wurden der Einfachheit halber bereits als Polysaccharide bezeichnet) identifiziert wurden.

Von den nachgewiesenen Kohlenhydraten in den MKs ist besonders **Sucrose** in überdurchschnittlich hohen Mengen dokumentiert worden. Hohe Sucrosewerte finden sich allerdings nicht in allen myrmekophytischen Systemen. Heil et al. (2005) stellten eine hohe Invertase-Aktivität im EFN von *Acacia* fest. Da Invertase Sucrose spaltet, wurde keine Sucrose in den EFN nachgewiesen. Da im Intestinaltrakt der symbiontischen Ameisen (*Pseudomyrmex*) kaum Invertase-Aktivität stattfindet, wird der sucrose-freie von den Symbionten EFN bevorzugt (Heil et al. 2005). Durch den Mangel an Sucrose, die vor allem nicht-symbiontische Ameisen anzieht, ist der EFN von mit Ameisen-assoziierten *Acacia* für fakultative Ameisen weniger attraktiv. Bei *Acacia* wirkt also die Kohlenhydrat-Zusammensetzung ausgrenzend auf fakultative Ameisen. Durch eine Spezialisierung wird somit garantiert, dass die Nährstoffe den Symbiosepartner erreichen.

Cecropia scheint eine konträre Strategie zu verfolgen. Das Vorkommen der allgemein attraktiven Kohlenhydrate und freien Aminosäuren machen deutlich, dass MKs für eine Vielzahl von Insekten attraktiv sein müssen. Ein möglicher Ausschluss von symbiosefremden Tieren scheint zumindest nicht über die Zusammensetzung zu erfolgen. Die Exklusion fakultativer Ameisen scheint viel eher von *Azteca* übernommen zu werden. Da *Azteca*-Ameisen *Cecropia* und deren MKs sehr aggressiv verteidigen, ist eine zusätzliche Exklusion durch die Nährstoffzusammensetzung wohl überflüssig.

Dass *Azteca* im Gegensatz zu *Pseudomyrmex* Invertase besitzt, um die Sucrosemengen zu nutzen, kann wohl angenommen werden. Cafeteria-Experimente zeigten außerdem, dass Sucrose wohl für *Azteca* besonders attraktiv wirkt. Rossel & Weizer (2014) boten *Azteca* verschiedene Substanzen, darunter auch Zuckerlösungen aus Haushaltszucker an und konnten dokumentieren, dass die Zuckerlösung zu den stärksten Reaktionen bei *Azteca* führte (Rossel & Weizer 2014).

Auch Bischof et al. (2013) zeigten, dass Sucrose in sehr hohen Mengen in den MKs von *C. peltata* vorkommt. Zudem wiesen sie auch noch Glucose, Fructose und Maltose nach und stellten fest, dass alle genannten Zucker in den MKs stärker vertreten waren als im getesteten Blattmaterial. Diese Ergebnisse verdeutlichen noch einmal die wichtige Rolle von Sucrose in der Assoziation zwischen *Cecropia* und *Azteca*.

Fructose und Glucose wurden in Trichomen und Trichilium in signifikant höheren Mengen festgestellt als in den MKs, was wahrscheinlich mit der Synthese von Sucrose und Glykogen in den MKs zusammenhängen könnte. Das Disaccharid Sucrose ist aus Fructose und Glucose aufgebaut (Nultsch 2006). Glykogen besteht aus α -1,4-verknüpften Glucanketten, die über α -1,6 Verknüpfungen verzweigt sind. Diese Glucanketten sind wiederum aus Glucose-Einheiten aufgebaut (Bischof et al. 2013). Die hohen Mengen von Fructose und Glucose im Trichilium lassen sich also vermutlich mit Bildungsprozessen von Sucrose und Glykogen in den MKs erklären. Darauf, dass während der Photosynthese gebildete Kohlenhydrate in die Trichilien transportiert werden, um so die Genese der MKs zu unterstützen, deuten nicht nur die hohen Kohlenhydratmengen in Trichilium und MKs hin, sondern auch die mächtigen Leitbündel, die das Trichilium durchziehen (Fig. 2D, 3B). Dass im Trichilium sehr wenig Sucrose nachgewiesen wurde, ließe sich mit der raschen Einlagerung dieses Zuckers in die MKs erklären.

Gegen diese Annahme spricht hingegen, dass die meisten Pflanzen Sucrose als Haupt-Transportzucker verwenden (Seifert 1997). Dementsprechend ist es verwunderlich, dass im Trichilium verhältnismäßig wenig davon nachgewiesen wurde, während die Fructose- und Glucosewerte so hoch sind. Zudem ist es bemerkenswert, dass auch in den Trichomen sehr hohe Fructose und Glucose-Werte festgestellt wurden.

Auch wenn der Pilzpatch die geringsten Mengen an Kohlenhydraten aufwies, wie es auch in allen anderen Substanzkategorien der Fall war, deuten die Ratios darauf hin, dass Kohlenhydrate vergleichsweise in höheren Mengen als andere Substanzkategorien vorkamen. Während die Anteile der gefundenen AS im Pilzpatch niedriger waren und viele AS gar nicht nachgewiesen werden konnten, verhält es sich mit den Kohlenhydraten anders. Es fanden sich, bis auf zwei Kohlenhydrate

(zwei nicht näher bestimmte Polysaccharide), alle Kohlenhydrate der MKs auch im Pilzpatch. Zudem fanden sich Trehalose, Hexose A, Hexose D, Pentose A und Tagatose sogar in höheren Mengen als in den MKs. Trehalose, Pentose A und Hexose D kamen signifikant öfter im Pilzpatch als in den MKs vor, wobei Hexose D in den MKs nicht nachgewiesen werden konnte. Die Ratios, die nur den Durchschnitt jener Substanzen wiedergeben, die sowohl in Pilzpatch als auch in den MKs nachgewiesen wurden, verdeutlichen diesen Trend: Es fanden sich zwar 85mal mehr Kohlenhydrate in den MKs als im Pilzpatch (Ratio Kohlenhydrate: MKs/Pilzpatch=85.91), allerdings wird dieses Verhältnis stark von Sucrose beeinflusst, die in den MKs über 500mal stärker vertreten war als im Pilzpatch. Die durchschnittliche Ratio der Aminosäuren zeigt hingegen, dass die AS über 400mal so häufig in den MKs wie im Pilzpatch zu finden waren (Ratio AS: MKs/Pilzpatch=399.01). Da MKs große Mengen an löslichen Zuckern enthalten (Bischof 2013), kann aus diesem Verhältnis durchaus geschlossen werden, dass auch im Pilzpatch eine relativ große Menge an Kohlenhydraten festgestellt werden konnte.

Betrachtet man die Kohlenhydrate im Detail, ist besonders das signifikant höhere Vorkommen von Trehalose im Pilzpatch von Interesse. Trehalose, ein aus zwei Glucose-Einheiten aufgebautes Disaccharid, ist für Insekten von entscheidender Bedeutung, weil es sich dabei um den häufigsten freien Zucker in der Hämolymphe handelt (Elbein et al. 2003). Trehalose dient v.a. als Energielieferant. Im Vergleich zu Glucose, dem Hauptzucker im Blut von Vertebraten, zeigt es deutliche Vorteile. Ohne die osmotische Konzentration zu verändern, ist die verfügbare Energie um Doppelte größer. Zudem ist Trehalose viel weniger chemisch aktiv als Glucose. Das ermöglicht es, Insekten sehr hohe Mengen von Trehalose in der Hämolymphe zu konzentrieren (Schilman & Roces 2008). Trehalose wurde in den höchsten Mengen in den Larven gemessen, aufgrund sehr hoher Schwankungen bestehen aber keine signifikanten Unterschiede zu allen anderen Geweben. Da bei adulten Insekten der Trehalosewert nach Aktivitäten, die viel Energie verbrauchen, drastisch sinken kann (Evans & Dethier 1957) und die Arbeiterinnen auf das Öffnen des Domatiums (Vgl. Kapitel 2.3.1.4: Ernte restlicher Gewebe) hektisch reagierten, könnten so die niedrigen Werte von Arbeiterinnen und Geschlechtstieren im Vergleich zu den Larven erklärt werden. Tendenziell kommt Trehalose in den Insektengeweben in den höchsten Mengen vor. Die SL-Untersuchungen ergaben zudem, dass sich signifikant mehr Trehalose im Pilzpatch als in den MKs findet. Trehalose ist allgemein relativ häufig in Pilzen und kann dort in sehr hoher Menge vorkommen (Elbein et al. 2003). Fütterungsexperimente mit *Myrmica rubra* zeigten, dass Trehalose von den Ameisen gut akzeptiert wurde und auch positive Einflüsse auf das Überleben hatte (Boevé & Wäckers 2003). *Lasius niger* hingegen vernachlässigte Trehalose im Vergleich zu anderen Zuckerlösungen (Detrain & Prieur 2014). Das Vorkommen von Trehalose und anderen Sacchariden und Zuckeralkoholen (besonders D-

Sorbitol) könnte somit möglicherweise den Pilzpatch für *Azteca* attraktiv machen. Fütterungsexperimente mit Trehalose und anderen Kohlenhydraten könnten hierfür Anhaltspunkte liefern.

4.3.1.3 Fettsäuren in den Geweben

Die Analyse der Fettsäuren (=FS) lieferte sehr diverse Resultate, die zeigen, dass gewisse FS eher in der Pflanze (vor allem Trichome) und manche eher in den Insekten (vor allem Larven und Puppen) in höheren Mengen vorkommen. Demnach lassen sich folgende Trends festhalten: (1) Die juvenilen Stadien weisen mehr FS auf als die adulten, wobei besonders die Geschlechtstiere im Vergleich sehr wenige FS besitzen; (2) die Trichome weisen von bestimmten FS (Docosanoic acid, Tetracosanoic acid_?) sehr hohe Mengen auf; und (3) die MKs besitzen nur relativ wenige FS, ebenso der Pilzpatch, der allerdings noch geringere Areawerte als die MKs aufweist.

Die Ergebnisse der FS-Analyse sollen an dieser Stelle nur kurz diskutiert werden, weil sie nur bedingt Aufschluss über das Vorkommen der Lipide geben. Lipide selbst können in manchen Futterkörperchen in enormen Mengen auftreten, z.B. bestehen die Futterkörperchen von vier myrmekophytischen *Piper*-Arten zu 41-48% der Trockenmasse aus Lipiden (Fischer et al. 2002). Die MKs von *Cecropia* weisen laut Rickson (1976) auch höhere Mengen an Lipiden auf (Rickson 1976). Dass Lipide aber eine ähnlich große Menge des Trockengewichts bilden, kann wohl eher ausgeschlossen werden; nicht zuletzt aufgrund des massiven Glykogenanteils und den in diesen Untersuchungen nur in geringer Zahl dokumentierten FS. Zudem wurden auch bei Futterkörperchen anderer Myrmekophyten Lipide gefunden, allerdings machten diese meist weniger Prozent des Trockengewichts aus: etwa 1-9% der Trockenmasse bei fünf *Acacia*-Arten (Heil et al. 2004), oder 5.5% bis 40% bei *Macaranga*, wobei hier artabhängige Schwankungen auftreten (Heil et al. 1998). Rickson (1976) stellte den hohen Lipidanteil der MKs nur optisch fest und auch Bischof et al. (2013) beschreiben ca. 2µm große Lipidtröpfchen in den Parenchymzellen der MKs. Eine Prozentangabe, die das Lipidverhältnis zum Trockengewicht beschreibt, wurde bei *Cecropia* MKs bisher noch nicht berechnet und kann auch durch diese Untersuchung nicht aufgezeigt werden.

4.3.1.4 Sterole in den Gewebe

Bei der Analyse konnten fünf Sterole (beta-Sitosterol, Campesterol, Cholesterol_?, Fucosterol_?, Stigmasterol_?) identifiziert werden. Sterole nehmen bei Insekten vor allem drei wichtige Funktionen ein: Erstens sind sie wichtige Bestandteile der Zellmembran und übernehmen dort regulatorische Funktionen, zweitens sind sie Vorläufer vieler Hormone, auch jener, die regulativ auf die Entwicklung

wirken, und drittens spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Genen für den Entwicklungsprozess. (Jing 2014).

Im Vergleich zu den meisten anderen Tieren können Insekten aber die Sterole nicht selbst synthetisieren, da ihnen das Enzym Squalene Synthase fehlt, das für einen wichtigen Zwischenschritt in der Sterolsynthese benötigt wird (Jing 2014). Auch Cholesterol, das wichtigste Sterol der Insekten, muss über die Nahrung aufgenommen oder durch die Aufnahme pflanzlicher Sterole selbst metabolisiert werden. Es gibt hunderte unterschiedliche Phytosterole und Insekten können davon nicht alle in Cholesterol umwandeln (Jing 2014). Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass das Verhältnis von >guten< (umwandelbaren) und >schlechten< (nicht umwandelbaren) Phytosterolen entscheidende Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit von Insekten haben kann (Behmer et al. 1999, Jing 2014). In den Geweben von *Cecropia* und *Azteca* wurden Cholesterol und vier weitere Phytosterole identifiziert, wobei aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Sterole nur zwei mit Sicherheit bestimmt werden konnten. Die Analyse lieferte drei entscheidende Ergebnisse: (1) Cholesterol wurde nicht nur in allen Insektengeweben nachgewiesen, sondern auch in den MKs und in den Trichomen; (2) bei den Insekten wurde die weitaus größere Menge der Sterole in den adulten Entwicklungsstadien vorgefunden; und (3) Die meisten Sterole konnten in den Trichomen nachgewiesen werden.

Cholesterol kann auch in Pflanzen vorkommen, jedoch meist in sehr geringen Mengen (Dadd 1977). Der Nachweis von Cholesterol in den MKs könnte somit bedeuten, dass in diesem Gewebe hohe Mengen für die vergesellschafteten Ameisenpartner eingelagert werden. Auch bei der SL-Analyse konnte in jeder der 14 MK-Proben Cholesterol nachgewiesen werden. Die bereits diskutierte Anreicherung von Glykogen, ein in Pflanzen sehr seltenes Kohlenhydrat, zeigt, dass eine Anpassung an die Nährstoffbedürfnisse des Partners möglich ist. Deshalb erscheint es durchaus plausibel, dass *Azteca* einen Teil seines Cholesterol-Bedarfs direkt über die MKs deckt und nicht ausschließlich über die Metabolisierung von Phytosterolen. Auch in den fettreichen Anhängseln (Elaiosomen) der von Ameisen verbreiteten Samen von *Ulex* (Stechginster) konnten beta-Sitosterol und Cholesterol nachgewiesen werden (Fischer et al. 2008). Demnach könnte auch der Nachweis von Cholesterol in den MKs eine besondere Anpassung an die Ernährungsbedürfnisse von *Azteca* darstellen.

In den adulten *Azteca* kamen alle fünf festgestellten Sterole in höheren Mengen vor als in den juvenilen; meist sogar signifikant. Die Bedeutung der Sterole für die Metamorphose wurde bereits angemerkt. Studien an Lepidoptera und Orthoptera ergaben, dass die Cholesterol-Konzentration in den Eiern bzw. Embryos 10-100mal höher ist, als in den Larven und Puppen (Lafont et al. 2005). Die Eier von *Azteca* konnten bei der Analyse allerdings nicht berücksichtigt werden, weil sowohl Eier als

auch MKs im Domatium gelagert werden und diese ohne Binokular schwer unterscheidbar sind. Aufgrund dieser wichtigen Rolle der Sterole für Entwicklungsprozesse wäre zu erwarten gewesen, dass in den juvenilen *Azteca*-Stadien mehr Sterole als in den adulten zu finden sind. Das erhöhte Sterol-Vorkommen in den Adulten lässt sich jedoch auf vielfältige Weise erklären. Möglicherweise werden die Sterole (besonders Cholesterol) in den juvenilen Stadien sofort zu anderen Stoffen weitersynthetisiert, während der Cholesterol-Pool in den adulten Stadien nur langsam verarbeitet wird. Aufgrund der vielfältigen Funktionen von Cholesterol bei Insekten könnte das Sterolverhältnis von juvenilen zu adulten Tieren bei *Azteca* schlicht eine bei Ameisen gängige Relation darstellen. Letztlich verweisen Schilman & Roces (2008) auf ein Problem bei Untersuchungen der Nährstoffe erntender Arbeiterinnen: die kollektive Dimension. Soziale Insekten verwerten im Gegensatz zu nicht sozialen Insekten nämlich die aufgenommene Nahrung nicht schnellstmöglich. Geerntete Nahrung wird nicht nur vom Individuum verwendet, sondern mittels Trophallaxis mit der Kolonie geteilt (Hölldobler & Willson 1990, Schilman & Roces 2008). Arbeiterinnen und Geschlechtstiere könnten demnach auch mit der Nahrung aufgenommene Sterole in ihren Kröpfen für spätere Weitergabe speichern, was die hohen Sterolwerte erklären würde.

Im Pilzpatch wurden zwar auch gewisse Mengen an Cholesterol_? nachgewiesen, doch in viel geringeren Mengen als in den MKs (Ratio: MKs/Pilzpatch=46.15). Im Trichilium wurde hingegen kein Cholesterol_? dokumentiert. In den Trichomen konnte Cholesterol_? sogar in größeren Mengen als in den MKs nachgewiesen werden. Eine Erklärung für die Ähnlichkeit von MKs und Trichomen ist durch die Sammelmethode gegeben. Die Trichome wurden mit der Pinzette entfernt, dabei konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass kleine, noch nicht vollständig entwickelte MKs mit aufgenommen wurden. Das erklärt allerdings kaum die höheren Werte in den Trichomen. Außerdem wurden immer mehr Sterole in den Trichomen als in den MKs und deutlich mehr als in den Trichiliumproben gefunden. Besonders der Vergleich mit dem Trichilium ist bemerkenswert. Die PCA-S5-Untersuchung hat die Gemeinsamkeiten von Trichilium und Trichomen aufgezeigt. Auch bei der Untersuchung der Substanzkategorien wurde deutlich, dass Trichome bei Aminosäuren und Kohlenhydraten sehr ähnliche Ratios aufweisen. Lediglich bei den Fettsäuren und den Sterolen sind sie nicht kongruent.

Eine Erklärung für die hohen Sterol-Werte, insbesondere für die Cholesterol_?-Werte könnte sein, dass die Arbeiterinnen durch den intensiven Kontakt mit den Trichomen beim Ernten die Trichome mit Sterolen anreichern. Nata & Nagasawa (2011) zeigten bei einer Untersuchung von *Bombyx mori* (Seidenraupe), dass diese viele Sterole wieder ausscheiden. Zudem dokumentierten sie einen erhöhten Cholesterol-Wert in den Exkrementen im Vergleich zum Darminhalt (Nata & Nagasawa

2011). Gegen das Argument, Sterol-Werte in den Trichomen könnten auf Exkretionen von Ameisen zurückzuführen sein, sprechen allerdings die gemessenen Areawerte von **beta-Sitosterol** und **Stigmasterol**. Beta-Sitosterol ist das häufigste Phytosterol und kann von den meisten Insekten zu Cholesterin metabolisiert werden (Jing 2014). Stigmasterol kommt auch sehr häufig in Pflanzen vor, kann aber nicht von allen Insekten genutzt werden; Orthoptera (*Schistocera americana*) können es etwa nicht in Cholesterin umwandeln (Behmer et al. 1999).

Beide Phytosterole kommen im Durchschnitt aller Gewebe am häufigsten in den Trichomen vor, in den Trichilliumproben konnten zwar auch beta-Sitosterol und Stigmasterol nachgewiesen werden, aber in geringeren Mengen als in den Trichomen, was auch für eine Anreicherung in den Trichomen spricht. Die anatomischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die MKs dicht von Trichomen umlagert sind (vgl. CT-Untersuchungen/LM-Untersuchungen), möglicherweise geben die Trichome Phytosterole als Sekret ab, das von den Ameisen dann aufgenommen wird. Anatomische Strukturen, die diese Theorie unterstützen, konnten allerdings keine festgestellt werden. Wahrscheinlicher scheint es, dass *Azteca*-Ameisen immer wieder Bruchstücke der Trichome, die an den MKs haften bleiben, mit aufnehmen, diese metabolisieren und so ihren restlichen Bedarf an Cholesterin decken. Aufschluss darüber würden Proben des Pflanzenmaterials (Blatt und Stielproben) geben, um sicherzustellen, ob die Trichome von allen Pflanzengeweben tatsächlich überdurchschnittlich stark mit Phytosterolen angereichert sind.

Bei der SL-Untersuchung wurde mehr Stigmasterol_? und beta-Sitosterol im Pilzpatch als in den MKs nachgewiesen. Campesterol, Fucosterol_? und Cholesterin_? waren hingegen stärker in den MKs ausgeprägt. Auffallend ist, dass Stigmasterol_? im Pilzpatch viel deutlicher vertreten war als in den MKs (Ratio Stigmasterol_?: Pilzpatch/MK=20.36). Für die hohen Phytosterole-Werte im Pilzpatch ergeben sich zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnten die Pilzpatchproben möglicherweise mit Pflanzenmaterial (etwa Parenchymgewebe) verunreinigt sein. Dafür spricht auch, dass ähnliche Ratios im Vergleich von Pilzpatch und MKs und Pilzpatch und Trichillium für die Sterole festgestellt wurden. Zum anderen erscheint es aber auch möglich, dass der Pilzpatch Phytosterole aufweist und so als zusätzliche Phytosterolquelle der *Azteca* dient (Vgl. Kapitel 4.3.2.2: Vergleich von MKs und Pilzpatch).

4.3.2 Vergleich der Gewebe

Die PCA-Analyse lieferte deutliche Ergebnisse, die eine klare Gruppierung der unterschiedlichen Gewebe zeigten und Rückschlüsse auf die Ähnlichkeit zuließen. Lediglich eine einzige Puppenprobe ist in der PCA-S5 peripher zu allen anderen Proben positioniert. Möglicherweise handelt es sich bei dieser Probe um einen Ausreißer. Auch wenn die Blanks nicht darauf hindeuten, könnte diese Probe kontaminiert worden sein. Bei der PCA-S5 stellten sich vor allem die vier Metabolite Fructose, Hexadecanoic acid, Proline und Alanine als besonders streuungsrelevant heraus. Tatsächlich konnten hier große Differenzen zwischen den Geweben nachgewiesen werden, die auch sicherlich einen Einfluss auf die Streuung nehmen. Problematisch ist allerdings, wie extrem diese vier Substanzen auf die Streuung Einfluss nehmen. Bildet man den Mittelwert sämtlicher Proben und sortiert diesen, ungeachtet der unterschiedlichen Massenwerte, nach Größe, zeigt sich, dass Fructose, Hexadecanoic acid, Proline und Alanine am häufigsten im Gewebeschnitt auftreten. Tatsächlich sind alle vier Metabolite sicherlich streuungsrelevant, ihr hoher Einfluss basiert aber auf hohen Areawerten, die möglicherweise auch auf >günstige< Massen zurückzuführen sind.

4.3.2.1 MKs im Vergleich mit dem restlichen Pflanzengewebe

MKs und Pflanzenmaterialien zeigen relativ deutliche Unterschiede bei der PCA-Analyse. Obwohl Trichilium und Trichome auch an der Entstehung der MKs beteiligt sind, bestehen deutliche Unterschiede. Tatsächlich wiesen die MKs mit einigen Puppen und Larvenproben mehr Ähnlichkeit auf als mit Trichomen und Trichilium und scheinen der Großgruppe der Insekten fast näher zu stehen als der Pflanze. Allerdings muss man diese Gruppierung teilweise differenziert betrachten, weil die größten Streuungen auf der PC 2-Achse (12.87%) zu erkennen sind und hierbei Fructose, das in Trichilium und Trichomen deutlich häufiger vorkommt als in den MKs, einen überproportionalen Faktor spielt. Doch die Distanz zu den Pflanzenteilen zeigt trotzdem klar, dass die MKs sich im Laufe der Evolution immer mehr an die Nährstoffbedürfnisse angepasst haben. Dass Futterkörperchen von Myrmekophyten eine essentielle Rolle in der Symbiose spielen, wurde bereits mehrfach gezeigt (Fischer et al 2002); dass Futterkörperchen sogar Glykogen aufweisen, wurde bisher allerdings nur bei *Cecropia* nachgewiesen. Die Einlagerung von Glykogen und das in dieser Arbeit nachgewiesene Vorkommen von Sterolen (besonders Cholesterol) in den MKs zeigen, wie stark die Zusammensetzung der MKs an die Nahrungsbedürfnisse der *Azteca* angepasst ist. Beide Substanzen sind in dieser Menge in Pflanzen sonst sehr unüblich.

4.3.2.2 Vergleich von MKs und Pilzpatch

Pilzpatch und MKs differenzieren kaum und sind sich unter allen anderen Geweben am ähnlichsten. Da MKs auf den Pilzpatches gefunden wurden und dokumentiert werden konnte, dass Hyphen des Pilzes die MKs durchdringen (Mayer, persönliche Mitteilung), wurde vermutet, dass die MKs möglicherweise auch zur Düngung des Pilzpatches genutzt werden. Es ist auch möglich, dass es sich beim Pilzpatch um eine wichtige Stickstoffquelle handelt, während die MKs eine wichtige Kohlenstoffquelle innerhalb des Systems darstellen könnte. Schließlich könnte die Funktion des Pilzpatches auch in der Bereitstellung von Nahrungsreserven für *Azteca* liegen. Die Ergebnisse der Untersuchung liefern jedoch keine Hinweise darauf, dass die MKs zur Düngung von Pilzpatches genutzt werden.

Die Verfügbarkeit von Stickstoff ist oft ein limitierender Faktor für arboreale Ameisen in tropischen Lebensräumen, weshalb angenommen wird, dass Stickstoff in Pflanzen-Ameisen-Systemen recycelt wird (Tobin 1995, Defosse et al. 2010, Blatrix et al. 2012). In der Assoziation von *Hirtella* und *Allomerus* zeigte sich, dass der dort kultivierte Pilz der Symbiose als Stickstoffquelle dient (Leroy et al. 2011). Auch Studien an *Cecropia* legen nahe, dass ein großer Teil des Stickstoffs in der Pflanze auf Aktivitäten der Ameisen zurückzuführen ist (Sagers et al. 2000; Trimble & Sagers 2004). Die Studien, die auf dem natürlich vorkommenden Isotop $^{15}\text{N}_2$ basierten, berücksichtigen den Pilzpatch allerdings nicht. Voruntersuchungen zeigten, dass Pilzpatches in einer künstlichen $^{15}\text{N}_2\text{O}_2$ -Atmosphäre Stickstoff fixieren können (Mayer, persönliche Mitteilung). Außerdem sind Pilze und Bakterien dazu imstande, Zellulose und Chitin abzubauen (Beier & Bertilsson 2013, Glass et al. 2013, Brezinska et al. 2014). Daher könnte es sein, dass im Pilzpatch durch Fixierung von Luftstickstoff und den Abbau von Abfallprodukten Stickstoff für Ameise und Pflanze verfügbar gemacht wird und keine MKs zur Düngung gebraucht werden.

Die Resultate der chemischen Analyse sprechen am ehesten für die dritte Hypothese, die den Pilzpatch als Nährstoffspeicher versteht. Die qualitative Analyse zeigt bereits, dass 25 Substanzen (29% aller MKs-Metabolite) exklusiv in den MKs und 16 Substanzen (21% aller Pilzpatch-Metabolite) exklusiv im Pilzpatch in $\geq 75\%$ der Probenmenge vorkamen. Die MKs weisen dabei 9 AS exklusiv auf, während drei Kohlenhydrate nur im Pilzpatch vorkommen. Die PCA-S5-Analyse ergab, dass sich Pilzpatch und MKs von allen Geweben am stärksten ähneln. Allerdings zeigte die Untersuchung der signifikanten Unterschiede, dass sich MKs und Pilzpatch immerhin in 28 Substanzen signifikant voneinander unterscheiden. Der Pilzpatch zeigt im Vergleich zu den anderen Geweben durchschnittlich die höchste Anzahl signifikanter Unterschiede und ähnelt den MKs somit dennoch am stärksten. Diese hohe Anzahl an signifikanten Unterschieden von Pilzpatch zu den restlichen

Gewebe verdeutlicht auch den Umstand, dass im Pilzpatch stets sehr geringe Mengen der Metabolite nachgewiesen wurden. Bei der Diskussion der unterschiedlichen Substanzkategorien zeigte sich bereits, dass der Pilzpatch stets am weitesten unter dem Gewebeschnitt liegt. Da jedoch immer die gleiche Trockenmasse extrahiert und sämtliche Areawerte auf ihr Gewicht normalisiert wurden, ist auszuschließen, dass die Probenmenge des Pilzpatches diese geringen Werte verursacht. Möglicherweise wurden deswegen geringe Areawerte dokumentiert, weil im Pilzpatch mehr Substanzen in Form von Proteinen und Lipiden gebunden sind, weshalb bei gleicher Menge Trockengewicht weniger freie Stoffe dokumentiert wurden.

Diese **Ähnlichkeit** im Nährstoffaufbau zwischen MKs und Pilzpatch ist ein entscheidendes Indiz dafür, dass beide als Nahrung für *Azteca* dienen. Eine ähnliche Metabolitenzusammensetzung deutet darauf hin, dass sich auch der Pilz stark an die Nährstoffbedürfnisse des Symbiosepartners angepasst hat. Bei den *Attini* (pilzzüchtende Ameisen) beispielsweise, werden Pilze von Ameisen als Hauptnahrungsquelle genutzt (Hölldobler & Wilson 2009). Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass auch der Domatium-Pilz in Ameisen-Pflanzen Assoziationen (*Petalomyrmex phylax* - *Leonardoxa africana*, *Tetraponera aethiops* - *Barteria fistulosa* und *Pseudomyrmex penetrator* - *Tachigali*) an die Larven der vergesellschafteten Ameisen verfüttert wurde (Blatrix et al. 2012). Da alle bisher untersuchten Domatienpilze derselben Ordnung (Ascomycetes; Chaetothyriales) angehören (Defosse et al. 2010, Voglmayr et al. 2011, Blatrix et al. 2013) und diese auch in *Cecropia* nachgewiesen wurde (Mayer persönliche Mitteilung), wurde angenommen, dass auch der Pilzpatch der *Cecropia*-*Azteca*-Assoziation geeignetes Larvenfutter darstellen könnte. Die Ähnlichkeit mit den MKs spricht durchaus dafür.

Juvenile *Azteca* weisen teilweise große Ähnlichkeiten mit Pilzpatch und MKs auf. Die Ähnlichkeit von MKs und Pilzpatch mit den Proben der Larven könnte ein Indiz dafür sein, dass die beiden vor allem an die Larven verfüttert werden. Für konkretere Aussagen über die Nährstoffflüsse müssten jedoch noch andere Untersuchungen gemacht werden (z.B. mit stabilen Isotopen). Generell konnten bei der Untersuchung nicht alle an den Nährstoffflüssen beteiligten Partner und Gewebe berücksichtigt werden. *Coccoidea*, die von *Azteca* gehalten werden und die für diese vermutlich eine wichtige Kohlenhydratquelle darstellen, wurden nicht analysiert, da lediglich eine sehr geringe Probenmenge gesammelt werden konnte. Zudem wurden *Azteca*-Eier (zu große Verwechslungsgefahr mit MKs), die Pearl bodies der Blätter (zu geringe Mengen) und Blattproben (zu hohe Chlorophyllmenge für das angewandte Laborprotokoll) nicht berücksichtigt.

Möglicherweise greift *Azteca* in Phasen großer Nahrungsknappheit bzw. großen Nahrungsbedarfs auf den Pilzpatch als Reserve zurück. *Cecropia* produziert auf nährstoffärmeren Böden weniger MKs

(Folgarait et al. 1994), möglicherweise nutzt *Azteca* in Zeiten der Nährstoffknappheit den Pilzpatch als Ersatznahrung. Zudem darf nicht nur alleine vom Pilz als Symbiosepartner von *Azteca* und *Cecropia* ausgegangen werden, sondern die mit dem Pilz assoziierten Bakterien und Archaea müssen ebenso berücksichtigt werden. Chaetothyriales wachsen langsam (Mayer & Voglmayr 2009; Voglmayr et al. 2011), während von Bakterien angenommen wird, dass sie Substanzen bei Stoffwechselfvorgängen relativ rasch umsetzen. Eine rasche Aufnahme und Metabolisierung aller eingebrachten Nährstoffe, die von den Bakterien erleichtert wird, würde so mit einer längerfristigen Lagerung in der Biomasse des Pilzes einhergehen. Das würde auch die geringe Menge dokumentierter Metabolite (besonders die geringe Anzahl freier AS) erklären. Viele Nährstoffe würden somit im Pilzpatch in Form von in der GC-MS nicht detektierbaren Proteinen, Lipiden und Polysacchariden gespeichert werden. Die vergleichsweise hohe Anzahl an Kohlenhydraten (v.a. Trehalose und Sorbitol) könnte dabei den Pilzpatch für *Azteca* besonders attraktiv machen.

Bisher wurden allerdings nur die Ähnlichkeiten zwischen MKs und Pilzpatch betont, die **Unterschiede** jedoch noch nicht aufgezeigt. Zum einen weist der Großteil der Metabolite im Pilzpatch eine geringere Area auf als die MKs. Zum anderen bestehen bei einigen Substanzen besonders deutliche Unterschiede. Es erscheint möglich, dass der Pilzpatch nicht bloß eine Nahrungsreserve darstellt, sondern für gewisse Entwicklungsstadien von *Azteca* einen wichtigen Bestandteil ihrer Ernährung ausmacht. Ist der Pilzpatch aber essentiell als Nahrung für ein Entwicklungsstadium vorgesehen, muss er mit speziell für dieses Stadium wichtigen Stoffen angereichert sein. Insofern ist es aufschlussreich zu untersuchen, welche Metabolite im Pilzpatch häufiger vorkommen als in den MKs.

Zum einen konnten zwei der gängigsten Phytosterole im Pilzpatch in höheren Mengen nachgewiesen werden, wobei besonders Stigmasterol_? in signifikant höheren Mengen im Pilzpatch festgestellt wurde (Vgl. Kapitel 4.3.1.4: Sterole in den Geweben). Zum anderen kamen diverse Kohlenhydrate (Trehalose, Hexose A, Pentose A, Tagatose_?, D-Sorbitol) und einige keiner Substanzkategorie zugeordneten Metabolite häufiger im Pilzpatch als in den MKs vor. Da dokumentiert wurde, dass Chaetothyriales an Larven verfüttert wird (Blatrix et al. 2012), ist besonders das Vorkommen der Phytosterole im Pilzpatch von Interesse. Sterole spielen bei der Entwicklung eine wichtige Rolle (Jing 2014), und durch das hohe Vorkommen von Phytosterolen könnten die Pilzpatches eine wichtige Quelle für die Larven darstellen. Der Mix aus Kohlenhydraten könnte demnach dazu dienen, den Pilzpatch geschmacklich von den MKs abzugrenzen und gleichzeitig die Attraktivität des Pilzpatch als Nahrung zu garantieren. In den MKs wurden aber Spuren von Cholesterol_?, das nicht wie die Phytosterole von den Insekten umgebaut werden muss, nachgewiesen. Daher scheint es

wahrscheinlicher, dass das Reservoir an Phytosterolen im Pilzpatch ebenso als wichtige Reserve dient, auf die bei Nahrungsknappheit zurückgegriffen wird.

4.3.2.3 Artspezifische Unterschiede in den MKs

Beim Vergleich der chemischen Zusammensetzung der MKs der drei untersuchten *Cecropia*-Arten konnten kaum signifikante Unterschiede zwischen den Arten festgestellt werden. Dies erscheint sinnvoll, da sich die *Azteca*-Gründerköniginnen bei der Besiedlung junger *Cecropia*-Pflanzen nicht spezialisieren. Sie besiedeln teilweise sogar nicht-myrmekophytische *Cecropia*-Arten (Longino 2010). Stark unterschiedliche Nährstoffzusammensetzungen der MKs müssten in einer Spezialisierung der Ameisenpartner resultieren.

Longino verweist allerdings darauf, dass *Azteca* zwar bei der Besiedlung von Jungpflanzen beliebig vorgeht, dass bei älteren *Cecropia*-Bäumen aber durchaus Trends zu erkennen sind. So beobachtete er, dass ausgewachsene *C. obtusifolia* Bäume nur mehr von *A. xanthochroa* bzw. *A. constructor* besiedelt waren, nicht aber von *A. alfari* oder *A. ovaticeps*. Er vermutet darin allerdings eher einen Einfluss der Ameisen auf die Pflanze als einen Spezialisierungsdruck von Seiten der Pflanze. Laut Longino (1991) legen die beiden letztgenannten Arten nämlich ein weitaus weniger aggressives Verhalten an den Tag und produzieren bereits in kleineren Pflanzen Nachkommen. Der daraus resultierende verringerte Schutz der Pflanzen könnte zu einer verringerten Überlebensfähigkeit führen. Longino geht davon aus, dass *C. obtusifolia* für ihr Überleben eine viel aggressivere Verteidigung durch *Azteca* benötigt als *C. insignis*. (Longino 1991, Longino 2010).

Auch Untersuchungen anderer myrmekophytischer Pflanzen ergaben kaum Unterschiede in der Zusammensetzung der Futterkörperchen. Bei den vier *Piper*-Arten *P. cenocladum*, *P. fimbriatum*, *P. obliquum* und *P. sagittifolium* ähnelte sich die Zusammensetzung der Futterkörperchen ziemlich stark. Signifikant unterschiedliche Konzentrationen waren lediglich bei den löslichen Kohlenhydraten bei *P. obliquum* und dem aus Proteinen stammenden Stickstoff bei *P. sagittifolium* zu finden (Fischer et al. 2002). Bei der Untersuchung der Futterkörperchen von *Macaranga* zeigten sich hingegen spezifische Gruppierungen in der Zusammensetzung der löslichen Kohlenhydrate innerhalb der sechs untersuchten Arten (Heil et al. 1998).

Cecropia-Pflanzen werden nicht ausschließlich von *Azteca* besammelt, sondern besonders bei unbewohnten Pflanzen von anderen Insekten abgeerntet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Wespenart *Charterignus* sp. MKs von *C. insignis* und *C. obtusifolia* sammelt und das sogar, wenn die Pflanze von Ameisen besiedelt ist (Pierre 2007). Neben den *Azteca*-Ameisen besiedeln auch immer wieder Ameisen anderer Gattungen (*Gnamptogenys*, *Heteroponera*, *Pachycondyla*, *Pseudomyrmex*,

Crematogaster, *Slenopsis*, *Pheidole*, *Wasmania*, *Zarcpytocerus*, *Procryptocerus*, *Camponotus* und *Myrmelachista*) *Cecropia*-Jungpflanzen oder verlassene Domatien (Longino 1991, Davidson & McKey 1993, Davidson & Fisher 1991).

Die große Anzahl möglicher MKs-Sammler zeigt bereits deren hohe Attraktivität. Eine Nährstoffzusammensetzung, die fakultative Insekten benachteiligt (oder exkludiert), wie sie etwa bei den *Acacia*-Futterkörperchen besteht (Heil et al. 2005), scheint nicht zuletzt aufgrund der festgestellten Sucrosewerte unwahrscheinlich (vgl. Diskussion Kohlenhydrate). Vielmehr kann bei allen drei Arten von einer allgemeinen Attraktivität der MKs ausgegangen werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Über 40 Arten der Pflanzengattung *Cecropia* sp. (Urticaceae) leben mit *Azteca* Ameisen (Formicidae, Dolichoderinae) in Symbiose. Die Pflanzen bieten hohle Stängel als Nistraum und bilden in Haarpolstern (Trichilien) an der Basis des Blattstiels Nahrung für die symbiontischen Ameisen. Diese Futterkörperchen, auch „Müller’sche Körperchen“ (MKs) genannt, gelten gemeinhin als Futter für die Ameisenbrut. *Azteca* kultiviert im Inneren der Stängel aber auch Pilze (Ascomycota, Chaetothyriales), deren Funktion bei *Cecropia* bisher noch unbekannt ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es einerseits die Entwicklung der MKs zu dokumentieren. Andererseits sollte in einem metabolomischen Ansatz geklärt werden, welche Inhaltsstoffe in den MKs vorhanden sind, ob deren Nährstoffangebot für die Ameisen ausreichend ist, ob der Pilzpatch bei MK-Knappheit als Substitution verwendet werden kann oder als Nahrungsergänzung fungiert, oder gänzlich andere Funktionen als angenommen haben muss. Zudem wurden auch die Inhaltsstoffe der Ameisen in die Analyse mit einbezogen.

Die **anatomischen Untersuchungen** mit Binokular, Computertomographie und Lichtmikroskopie zeigten, dass in einem Trichilium eine große Menge Müller’scher Körperchen (ca. 1000) unterschiedlicher Entwicklungsstadien vorhanden ist. Jedes Trichilium wird durch ein sehr dicht ausgeprägtes Netz an Leitbündeln versorgt und ist von einem Polster einfacher, mehrzelliger Trichome bedeckt, die sich aus der Epidermis entwickeln. Dickere, längere, weiße, komplexe Trichome sind ebenso Bestandteil der Trichompolster. Die Funktion dieser Trichomschicht liegt wohl darin, dass sie den MKs Schutz vor Fressfeinden und Austrocknung bieten und zudem als Stütze für die MKs fungieren. Die mehrzelligen MKs werden knapp unterhalb der Epidermis gebildet, wachsen rasch an, wölben die Epidermis auf und sind schließlich nur mehr über einen schmalen Bereich mit dem Trichiliumgewebe verbunden. Nach dem Erreichen der vollen Größe lösen sie sich vom Trichiliumgewebe und wandern durch die Trichompolster an die Oberfläche, wo sie von *Azteca* abgeerntet werden. Untersuchungen (Rossel & Weizer 2014, unpubliziert) deuten darauf hin, dass eine Korrelation zwischen der Präsentation der MKs an der Oberfläche des Trichiliums und dem Klima besteht. Vermutlich reagieren die Trichome auf Veränderungen der Luftfeuchte und beeinflussen so den Transport der MKs an die Oberfläche.

Bei der **chemischen Analyse** wurde keine absolute Quantifizierung vorgenommen; durch die Berechnung der Verhältnisse der Gewebe können aber Aussagen über das Vorkommen einer Substanzklasse getroffen werden.

Artspezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der MKs konnten fast keine festgestellt werden. Da auch *Azteca* bei der *Cecropia*-Besiedlung nicht artspezifisch vorgeht, ist es naheliegend, dass die Zusammensetzung der MKs dieser generalistischen Besiedlungsstrategie entspricht.

Bei der Analyse der Metabolite wurde in den MKs ein Großteil der für Insekten essentiellen Aminosäuren nachgewiesen. In den MKs konnte eine große Menge des, für einen Storageprotein-Typen charakteristischen, Glutamic acid festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass die MKs an die Larven verfüttert werden könnten. In den juvenilen *Azteca*-Stadien fand sich eine hohe Menge an AS, was mit der Bildung von Storage-Proteinen in diesem Entwicklungsstadium erklärt werden kann. Im Pilzpatch fanden sich erstaunlich wenig AS.

In den MKs wurden große Mengen des Kohlenhydrats Sucrose dokumentiert. Zudem wird in den MKs Glykogen eingelagert (Bischof et al. 2013). Das Vorkommen größerer Mengen für generalistische Ameisen attraktive Kohlenhydrate und Aminosäuren, sowie das Abernten der MKs durch andere Insekten deuten darauf hin, dass keine Exklusion symbiosefremder Insekten durch die Zusammensetzung der MKs gewährleistet wird. Im Pilzpatch wurden zwar durchschnittlich wenig Kohlenhydrate dokumentiert, doch einige Zucker, z.B. Trehalose, der wichtigste Zucker der Insektenhämolymphe, wurden in größeren Mengen im Pilzpatch als in den MKs nachgewiesen. Die meisten Fettsäuren wurden in den Puppen und Trichomen dokumentiert.

Besonderes Augenmerk wurde auf die Sterole gelegt, da Insekten diese nicht selbst synthetisieren können, sondern diese durch die Nahrung aufnehmen müssen. In den MKs und Trichomen wurde das in Pflanzen seltene Cholesterol nachgewiesen. Wie Glykogen ist vermutlich auch das Vorhandensein von Cholesterol ein Indiz für die Anpassung der MKs an die Nährstoffbedürfnisse des Symbiosepartners. Hohe Mengen von Phytosterolen, die Insekten teilweise zu Cholesterol umbauen können, wurden überraschenderweise in den Trichomen nachgewiesen. Möglicherweise nimmt *Azteca* über Bruchstücke der Trichome diese Sterole mit den MKs gemeinsam auf. Das Vorkommen von Phytosterolen im Pilzpatch könnte für deren Eignung als Nahrungsreserve für *Azteca* sprechen.

Weder die ethologischen Untersuchungen noch die chemische Analyse lieferten Hinweise darauf, dass die MKs zur Düngung des Pilzpatches verwendet werden. Die Analyse der Metabolite lassen auch kaum Rückschlüsse darüber zu, ob es sich beim Pilzpatch um eine wichtige Stickstoffquelle handelt. Die Untersuchung unterstützt jedoch die Hypothese, dass der Pilzpatch von *Azteca* als Ersatznahrung verwendet wird. Die chemische Zusammensetzung von Pilzpatch und MKs ähneln einander, was ein Indiz dafür darstellt, dass beide als Nahrung für *Azteca* dienen. Möglicherweise greift *Azteca* bei Nahrungsknappheit auf den Pilzpatch zurück. Da nachgewiesen wurde, dass Hyphen von Chaetothyrales in anderen Assoziation an die Ameisen-Larven verfüttert werden (Blatrix et al. 2012),

ist es zudem vorstellbar, dass der Pilzpatch auch eine Ergänzung der Ernährung der Larven darstellt. Ein anderes Kohlenhydratspektrum und das Vorhandensein von Phytosterolen im Pilzpatch deuten darauf hin. Diese Annahme muss aber durch weiterführende Untersuchungen überprüft werden.

Schlüsselwörter: *Cecropia*, *Azteca*, Chaetothyriales, Myrmecophyten, Müller'sche Körperchen, Pilzpatch, Trichilium, Metabolite, Sterole, Insektenentwicklung

5.2 Abstract

In the study presented here, the food sources for the ants inhabiting myrmecophytic *Cecropia* species are investigated with a metabolomic approach. The food bodies of *Cecropia*, the so called Mullerian bodies (MBs), are produced from trichilia, a structure located at the petiolus base have been the focus of a few studies, but a metabolomic analysis was never performed. An additional partner of the obligate *Cecropia-Azteca*-that has been overlooked for a long time are Chaetothyrialean fungi. They are cultivated in so called >fungal patches<, and may play an important role in the nutrient cycle of association. Therefore fungal patches were also chemically investigated as well as worker, queens, larvae and pupae of *Azteca*.

Anatomical studies with binocular, CT-scanning and microscopy revealed that trichilia produced a large amount (about 1000) of MBs of different development stages. It was found that two mature MBs never directly adjoin one another, suggesting a control mechanism. Each trichilium is supplied through a very dense and extensive network of vesicular bundles. A mat of two trichome types usually covers the whole trichilium: multicellular simple ones and thicker, longer, white, complex ones. Three possible functions of this layer of trichomes were assumed: (1) protection of the MBs against predators and desiccation; (2) structural support for the MBs; (3) control of the MB-presentation on the surface of the mat, triggered by changes in humidity.

The metabolomic analysis allows statements about the ratio of tissues of substance classes, although no absolute quantification was performed. A large amount of glutamic acid was detected in the MBs. Glutamic acid is characteristic for a special storage protein type, which is important in larval development of the ants. This suggests that MBs are fed to the larvae. Additionally most of the amino acids detected in the MBs are essential for insects.

Compared to the other tissues investigated (trichilia, trichomes, fungal patches and ants), a large amount of sucrose was documented in the MBs. The presence of common carbohydrates and a high diversity of amino acids, which are attractive to generalistic ants, as well as the harvesting of MBs by other insects, indicate that exclusion of non-symbiotic insect by the composition of the MBs is not

implemented. Although lower amounts of carbohydrates have been documented in the fungal patch than in the MBs, some sugars are found in higher quantities. Trehalose, the most important sugar in the hemolymph, was detected in large quantities in the fungal patch, which may support attraction to *Azteca*.

Cholesterol has been documented in the MBs and the trichomes. Insects can't synthesize sterols themselves and have to consume them through food. The occurrence in *Cecropia* MKs probably illustrates an adaptation of the MBs to the nutritional needs of the symbiont partner. Phytosterols, which can partly be metabolized to cholesterol by insects, were surprisingly high in the trichomes. Maybe *Azteca* consumes this phytosterol via fragments of the trichomes stuck to the MBs. The presence of phytosterols in the fungal patch might indicate their suitability as a food reserve for *Azteca*.

MBs differed considerably from the other plant tissues (trichilium and trichomes), providing an additional argument for an adaptation to the nutritional needs of *Azteca*. However, the metabolic analysis allowed hardly any conclusions about whether the fungal patch is an important source of nitrogen. Few free amino acids were detected in the fungal patch, which could point to a low nitrogen concentration on the one hand, or to a high protein content, which has to be verified by further studies.

In summary, the study supports the hypothesis that the fungal patch of *Azteca* is used as a substitute food. A Principal Component Analysis (PCA) has shown that fungal patches and MBs are chemically similar to each other. Maybe *Azteca* consumes the fungi in times of MK shortage. Another possibility is, that the fungi are an additional part of the larval diet. Since it was demonstrated that chaetothyrals are fed to the larvae in other ant-plants-association (Blatrix et al. 2012), this is supposedly the case. The different carbohydrate spectrum and the presence of phytosterols in the fungal patch could be an evidence for this.

Significant species-specific differences in the composition of the MBs were not detected. Since *Azteca* does not colonise specific *Cecropia* species, the composition of MBs matches this generalist colonization strategy.

Keywords: *Cecropia* sp., *Azteca* sp., Chaetothyrals, Myrmecophyte, Mullerian bodies, fungal patch, trichilium, Metabolomics, sterols, insect development

6 Literaturverzeichnis

- Barbehenn, R.V., Reese, J.C., Hagens, K.S. (1999). The food of insects, 83-121, In: Huffaker, C.B. & Gutierrez, A.P. (eds.). Ecological Entomology, John Wiley & Sons, New York.
- Behmer, S. T., Elias, D. O., & Grebenok, R. J. (1999). Phytosterol metabolism and absorption in the generalist grasshopper, *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 42(1), 13-25.
- Beier, S., & Bertilsson, S. (2013). Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. Frontiers in Microbiology, 4:149. doi: 10.3389/fmicb.2013.00149.
- Berg, C. C., Rosselli, P. F., & Davidson, D. W. (2005). *Cecropia*. Flora Neotropica Monographs 94, 1-230.
- Bischof, S., Umhang, M., Eicke, S., Streb, S., Qi, W., & Zeeman, S. C. (2013). *Cecropia peltata* accumulates starch or soluble glycogen by differentially regulating starch biosynthetic genes. The Plant Cell, 25(4), 1400-1415.
- Blatrix, R., Djiéto-Lordon, C., Mondolot, L., La Fisca, P., Voglmayr, H., & McKey, D. (2012). Plant-ants use symbiotic fungi as a food source: new insight into the nutritional ecology of ant–plant interactions. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 279(1744), 3940-3947.
- Boevé, J. L., & Wäckers, F. L. (2003). Gustatory perception and metabolic utilization of sugars by *Myrmica rubra* ant workers. Oecologia, 136(4), 508-514.
- Bronstein, J.L., Alarcon, R., Geber, M., (2006). The evolution of plant-insect mutualisms. New Phytologist, 172(3), 412–428.
- Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U., Burkowska, A., & Walczak, M. (2014). Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. Current Microbiology, 68(1), 71-81.
- Cassill D.L., & Tschinkel W.R. (1999). Regulation of diet in the fire ant, *Solenopsis invicta*. Journal of Insect Behavior 12(3), 307–328.
- Choe, J., & Perlman, D. (1997). Social conflict and cooperation among founding queens in ants (Hymenoptera: Formicidae). The evolution of social behavior in insects and arachnids, 19, 392-406.
- Dadd, R. H. (1977). Qualitative requirements and utilization of nutrients: Insects. 305–346. In: Rechcigl, M., Jr. (ed.). Handbook Series in Nutrition and Food. Section D: Nutritional Requirements, (1), OH: CRC Press, Cleveland.
- Davidson, D.W., McKey, D. (1993). The evolutionary ecology of symbiotic ant–plant relationships. Journal of Hymenoptera Research, 2, 13–83.
- Davis, G. R. (1975). Essential dietary amino acids for growth of larvae of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. The Journal of Nutrition, 105(8), 1071-1075.

- Defosse, E., Djiéto-Lordon, C., McKey, D., Selosse, M. A., & Blatrix, R. (2010). Plant-ants feed their host plant, but above all a fungal symbiont to recycle nitrogen. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 278(1710), 1419-1426.
- Detrain, C., & Prieur, J. (2014). Sensitivity and feeding efficiency of the black garden ant *Lasius niger* to sugar resources. *Journal of Insect Physiology*, 64, 74-80.
- Echols H.W. (1966). Assimilation and transfer of mirex in colonies of Texas leaf cutting ants. *Journal of Economic Entomology*, 59, 1336–1338.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., & Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R-27R.
- Fischer, R. C., Richter, A., Wanek, W., & Mayer, V. (2002). Plants feed ants: food bodies of myrmecophytic *Piper* and their significance for the interaction with *Pheidole bicornis* ants. *Oecologia* 133(2), 186-192.
- Fischer, R. C., Wanek, W., Richter, A., & Mayer, V. (2003). Do ants feed plants? A 15N labelling study of nitrogen fluxes from ants to plants in the mutualism of *Pheidole* and *Piper*. *Journal of Ecology* 91(1), 126-134.
- Fischer, R. C., Richter, A., Hadacek, F., & Mayer, V. (2008). Chemical differences between seeds and elaiosomes indicate an adaptation to nutritional needs of ants. *Oecologia*, 155(3), 539-547.
- Folgarait, P. J., Johnson, H. L., & Davidson, D. W. (1994). Responses of *Cecropia* to experimental removal of Mullerian bodies. *Functional Ecology*, 8(1), 22-28.
- Folgarait, P. J., & Davidson, D. W. (1994). Antiherbivore defenses of myrmecophytic *Cecropia* under different light regimes. *Oikos* 71(2), 305-320.
- Fragner, L. (2012). Metabolomic studies on polyploid poplar clones using an integrated GC- and LC-MS based analytical platform, Diplomarbeit der Universität Wien.
- Gaume, L., McKey, D., & Anstett, M. C. (1997). Benefits conferred by “timid” ants: active anti-herbivore protection of the rainforest tree *Leonardoxa africana* by the minute ant *Petalomyrmex phylax*. *Oecologia*, 112(2), 209-216.
- Gegenbauer, C., Mayer, V.E., Zotz, G., Richter, A. (2012). Uptake of ant-derived nitrogen in the myrmecophytic orchid *Caularthron bilamellatum*. *Annals of Botany*, 110(4), 757–765.
- Gewecke, M.(1995): Physiologie der Insekten. Berichte des naturwissenschaftlich medizinischen Vereins in Innsbruck, 82, 382.
- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H., & Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual Review of Microbiology*, 67, 477-498.
- González-Teuber, M., & Heil, M. (2009). The role of extrafloral nectar amino acids for the preferences of facultative and obligate ant mutualists. *Journal of chemical ecology*, 35(4), 459-468.
- Hagen, K. S., Dadd, R. H., & Reese, J. (1984). The food of insects. 79-112 In: Huffaker, C.B. & Rabb, R.L. (eds.). *Ecological Entomology*, John Wiley & Sons, New York.

- Heil, M., Fiala, B., Kaiser, W., & Linsenmair, K. E. (1998). Chemical contents of *Macaranga* food bodies: adaptations to their role in ant attraction and nutrition. *Functional Ecology* 12(1), 117-122.
- Heil, M., Baumann, B., Krüger, R., & Linsenmair, K. E. (2004). Main nutrient compounds in food bodies of Mexican *Acacia* ant-plants. *Chemoecology*, 14(1), 45-52.
- Heil, M., Rattke, J., & Boland, W. (2005). Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science*, 308(5721), 560-563.
- Heil, M., (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178, 41–61.
- Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The ants*. Harvard University Press.
- Howard, D. F., & Tschinkel, W. R. (1981). The flow of food in colonies of the fire ant, *Solenopsis invicta*: a multifactorial study. *Physiological Entomology* 6(3), 297-306.
- Janzen, D. H. (1969). Allelopathy by myrmecophytes: the ant *Azteca* as an allelopathic agent of *Cecropia*. *Ecology*, 50(1), 147-153.
- Jing, X., Grebenok, R. J., & Behmer, S. T. (2014). Diet micronutrient balance matters: How the ratio of dietary sterols/steroids affects development, growth and reproduction in two lepidopteran insects. *Journal of Insect Physiology*, 67, 85-96.
- Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmüller, E., & Steinhauser, D. (2005). GMD@ CSB. DB: the Golm metabolome database. *Bioinformatics*, 21(8), 1635-1638.
- Lafont, R., Dauphin-Villemant, C., Warren, J. T., & Rees, H. (2012). Ecdysteroid chemistry and biochemistry. *Insect Endocrinology*, 106-176.
- Lange, R. (1967). Die Nahrungsverteilung unter den Arbeiterinnen des Waldameisenstaates. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 24(5), 513–545.
- LaPierre, L., Hespeneide, H., & Dejean, A. (2007). Wasps robbing food from ants: a frequent behavior? *Naturwissenschaften*, 94(12), 997-1001.
- Leroy, C., Séjalon-Delmas, N., Jauneau, A., Ruiz-González, M. X., Gryta, H., Jargeat, P., & Orivel, J. (2011). Trophic mediation by a fungus in an ant–plant mutualism. *Journal of ecology*, 99(2), 583-590.
- Longino, J. T. (1991). *Azteca* ants in *Cecropia* trees: taxonomy, colony structure, and behaviour. *Ant-plant interactions*. Oxford University Press, Oxford, 271-288.
- Longino, J. T. (2010) <http://academic.evergreen.edu/projects/ants/AntsofCostaRica.html>
- Lusa, M. G., Cardoso, E. C., Machado, S. R., & Appezzato-da-Glória, B. (2015). Trichomes related to an unusual method of water retention and protection of the stem apex in an arid zone perennial species. *AoB plants*, 7, plu088.
- Mayer, V. E., & Voglmayr, H. (2009). Mycelial carton galleries of *Azteca brevis* (Formicidae) as a multi-species network. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276, 3265–3273.

- Mayer, V. E., Frederickson, M. E., McKey, D., & Blatrix, R. (2014). Current issues in the evolutionary ecology of ant–plant symbioses. *New Phytologist*, 202(3), 749-764.
- Nagata, S., & Nagasawa, H. (2011). Sterol Composition in Larvae of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(5), 1003-1005.
- Nultsch, W. (2000). *Allgemeine Botanik*. Thieme, Stuttgart.
- O'Dowd, D. J. (1982). Pearl bodies as ant food: an ecological role for some leaf emergences of tropical plants. *Biotropica*, 14(1), 40-49.
- Putz, F.E., Holbrook, N.M. (1988). Further observations on the dissolution of mutualism between *Cecropia* and its ants: the Malaysian case. *Oikos*, 53(1), 121–125.
- Rickson, F. R. (1976). Anatomical development of the leaf trichilium and Mullerian bodies of *Cecropia peltata* L. *American Journal of Botany*, 63(9), 1266-1271.
- Rico-Gray, V., Oliveira, P.S. (2007). *The ecology and evolution of ant–plant interactions*. The University of Chicago Press, Chicago
- Rossel, C., & Weizer, G. (2014). *Felduntersuchungen zu den Müllerschen Körperchen an Cecropia sp.*, Bachelorarbeit der Universität Wien.
- Sagers, C. L., Ginger, S. M., & Evans, R. D. (2000). Carbon and nitrogen isotopes trace nutrient exchange in an ant-plant mutualism. *Oecologia*, 123(4), 582-586.
- Schilman, P. E., & Roces, F. (2008). Haemolymph sugar levels in a nectar-feeding ant: dependence on metabolic expenditure and carbohydrate deprivation. *Journal of Comparative Physiology B*, 178(2), 157-165.
- Schupp, E.W. (1986). *Azteca* protection of *Cecropia*: ant occupation benefits juvenile trees. *Oecologia*, 70(3), 379–385.
- Seifert, B. (1996). *Ameisen: beobachten, bestimmen*. Naturbuch Verlag, Augsburg.
- Sorensen, A. A., Mirenda, J. T., & Vinson, S. B. (1981). Food exchange and distribution by three functional worker groups of the imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren. *Insectes sociaux*, 28(4), 383-394.
- Sun, X., & Weckwerth, W. (2012). COVAIN: a toolbox for uni-and multivariate statistics, time-series and correlation network analysis and inverse estimation of the differential Jacobian from metabolomics covariance data. *Metabolomics*, 8(1), 81-93.
- Tobin, J. E., Lowman, (1995). Ecology and diversity of tropical forest canopy ants. 129-147. In: M. D., & Nadkarni, N. M (eds.). *Forest canopies*, CA: Academic, San Diego.
- Trimble, S. T., & Sagers, C. L. (2004). Differential host use in two highly specialized ant-plant associations: evidence from stable isotopes. *Oecologia*, 138(1), 74-82.
- Urbach D. (2012). MSTFA und MSTFA-D₉ – unverzichtbare Werkzeuge für die massenspektrometrische Strukturaufklärung. *Toxichem Krimtech* 79 (3), 137-145.

- Valverde, J. P., & Hanson, P. (2011). Parenchyma: a neglected plant tissue in the *Cecropia*/ant mutualism. *Symbiosis*, 55(1), 47-51.
- Vasconcelos, H.L. (1991), Mutualism between *Maieta guianensis* Aubl. a myrmecophytic melastome, and one of its ant inhabitants: ant protection against insect herbivores. *Oecologia* 87(2),295–298.
- Vinson, S.B. (1968). The distribution of an oil, carbohydrate, and protein food source to members of the imported fire ant colony. *Journal of Economic Entomology*, 61, 712–714.
- Voglmayr, H., Mayer, V., Maschwitz, U., Moog, J., Djieto-Lordon, C., & Blatrix, R. (2011). The diversity of ant-associated black yeasts: insights into a newly discovered world of symbiotic interactions. *Fungal Biology*, 115(10), 1077-1091.
- von Ihering, H. (1907). Die Cecropien und ihre Schutzameisen. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 39, 666-714.
- Weckwerth, W., Wenzel, K., & Fiehn, O. (2004). Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics*, 4(1), 78-83.
- Wheeler, D.E., & Buck, N.A. (1995). Storage proteins in ants during development and colony founding. *Journal of Insect Physiology*, 41(10), 885-894.
- Wheeler, D. E., & Martinez, T. (1995). Storage proteins in ants (Hymenoptera: Formicidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(1), 15-19.

7 Anhang

| Name | Mass | RI | RT | Name | Mass | RI | RT |
|--|------|--------|--------|--------------------------------------|------|--------|--------|
| 2-Oxoglutaric acid (1MEOX) (2TMS) BP | 198 | 1587.9 | 798.75 | Campesterol (1TMS) | 129 | 3302.6 | 1738.5 |
| 2-Oxoglutaric acid (1MEOX) (2TMS) MP | 75 | 1562.4 | 778 | Cholesterol (1TMS)_? | 129 | 3186.9 | 1691.9 |
| Acetic acid, 3,4-dihydroxyphenyl- (3TMS)_? | 179 | 1846.9 | 986.85 | Cinnamic acid, trans- (1TMS) | 205 | 1550.9 | 768.65 |
| Acetic acid, 4-hydroxyphenyl- (2TMS) | 179 | 1648.9 | 844.5 | Citric acid (4TMS) | 273 | 1843.8 | 984.8 |
| Adenine (2TMS) | 264 | 1881.8 | 1010.1 | Cysteine (3TMS)_? | 218 | 1569.9 | 784.1 |
| Alanine (2TMS) | 116 | 1115.5 | 392.6 | Decanoic acid (1TMS) | 117 | 1460.3 | 695 |
| Alanine (3TMS) | 188 | 1369.5 | 618.85 | Docosanoic acid (1TMS) | 132 | 2640.5 | 1446 |
| Alanine [+CO2] (2TMS) | 160 | 1405.3 | 650.3 | Dodecanoic acid (1TMS)_? | 117 | 1654.8 | 848.85 |
| Alanine, beta- (3TMS) | 174 | 1437.3 | 676.3 | D-Sorbitol (6TMS)_? | 147 | 1968.7 | 1068 |
| Amine_mglw_Dopamine (4TMS)_? | 174 | 2103 | 1151.7 | Ethanolaminephosphate (4TMS) | 174 | 1803.6 | 958 |
| Amine_RI_1928.2_Tyramine?(3TMS) | 86 | 1928.2 | 1041 | Fructose (1MEOX) (5TMS) BP | 103 | 1919.2 | 1035.1 |
| Arginine [-NH3] (3TMS)_ | 157 | 1840.2 | 982.4 | Fructose (1MEOX) (5TMS) MP | 103 | 1908.9 | 1028.2 |
| Ascorbic acid (4TMS) | 332 | 1976.5 | 1073.3 | Fructose (5TMS)_ Version2 | 217 | 1835.9 | 979.5 |
| Asparagine (2TMS) | 44 | 1604.6 | 811.95 | Fucosterol (1TMS)_? | 296 | 3406.8 | 1780.2 |
| Asparagine (3TMS) | 116 | 1687.3 | 872.75 | Fumaric acid (2TMS) | 245 | 1351.2 | 602.55 |
| Asparagine (4TMS) BP1 | 188 | 1650.4 | 845.6 | Galactinol (9TMS) | 204 | 3073.5 | 1644 |
| Asparagine (4TMS) BP2 | 188 | 1890 | 1015.6 | Galactose (1MEOX) (5TMS) BP | 205 | 1950.4 | 1055.9 |
| Asparagine (4TMS) MP | 188 | 1626.6 | 828.15 | Galactose (1MEOX) (5TMS) MP | 205 | 1929.4 | 1041.8 |
| Asparagine [-H2O] (2TMS) | 100 | 1511.1 | 736.3 | Galactosylglycerol (6TMS) | 204 | 2341.7 | 1290.2 |
| Aspartic acid (2TMS) | 160 | 1430.6 | 670.85 | Gallic acid (4TMS)_? | 281 | 1978.6 | 1074.6 |
| Aspartic acid (3TMS) | 232 | 1535.3 | 755.95 | Gluconic acid/Galactonic acid (6TMS) | 292 | 2044.3 | 1115.9 |
| Azelaic Acid | 317 | 1801.6 | 956.65 | Gluconic acid-1,5-lactone (4TMS)_? | 220 | 1916.2 | 1033.1 |
| Benzoic acid, 4-hydroxy- (2TMS) | 223 | 1635.1 | 834.35 | Glucose (1MEOX) (5TMS) BP | 319 | 1953.7 | 1058 |
| beta-Sitosterol (1TMS) | 129 | 3389.8 | 1773.3 | Glucose (1MEOX) (5TMS) MP | 319 | 1934.8 | 1045.4 |
| Butanoic acid, 2,4-dihydroxy- (3TMS) | 103 | 1424.8 | 666.15 | Glutamic acid (2TMS) | 84 | 1539.2 | 759.15 |
| Butanoic acid, 2-hydroxy- (2TMS)_? | 131 | 1139.9 | 414.3 | Glutamic acid (3TMS) | 246 | 1633.2 | 833 |
| Butyric acid, 4-amino- (3TMS) | 305 | 1542.7 | 762 | Glutamic acid, N-acetyl- (2TMS)_? | 84 | 1796.8 | 953.25 |
| Caffeoylquinic acid (6TMS)_cis_trans_3_5 | 73 | 3173 | 1686.1 | Glutamine (3TMS)_ Version2 | 156 | 1793.7 | 950.95 |

| Name | Mass | RI | RT | Name | Mass | RI | RT |
|---|------|--------|--------|---------------------------------|------|--------|--------|
| Glutamine [-H2O] (3TMS) MP | 154 | 1609.1 | 815.25 | Kontamination?_Mass_167? | 167 | 2173.5 | 1194.6 |
| Glutaric acid (2TMS) | 55 | 1408.6 | 652.95 | Kontamination?_MZ_167? | 167 | 2172.8 | 1194.2 |
| Glutaric acid, trans (1TMS) | 129 | 1587.5 | 798.45 | Kontamination?_RI_1153.1 | 147 | 1152.5 | 425.55 |
| Glyceric acid (3TMS) | 189 | 1344.3 | 596.35 | Kontamination?_RI_1194.4 | 167 | 2173.2 | 1194.4 |
| Glycerol (3TMS) | 218 | 1288.6 | 546.75 | Kontamination?_RI_1713.6 | 97 | 1713.6 | 892.1 |
| Glycerol 3-phosphate (4TMS) | 299 | 1786.5 | 945.65 | Kontamination?_RI_2246.1 | 359 | 2246.1 | 1236.6 |
| Glycerol-2-phosphate (4TMS)_? | 211 | 1752.5 | 920.65 | Kontamination?_RI_2795.3 | 116 | 2795.3 | 1520.5 |
| Glycine (3TMS) | 174 | 1316.8 | 571.85 | Kynurenic acid (2TMS)_? | 231 | 2086.7 | 1141.7 |
| Glycolic acid (2TMS) | 147 | 1089.7 | 369.65 | Lactic acid | 117 | 1077.6 | 358.8 |
| Heptadecanoic acid (1TMS) | 132 | 2146.5 | 1178.2 | Leucine (1TMS) | 86 | 1164.4 | 436.1 |
| Hexadecanoic acid (1TMS) | 132 | 2049.8 | 1119.3 | Leucine (2TMS) | 171 | 1281.4 | 540.35 |
| Hexadecenoic acid, 9-(Z)- (1TMS) | 129 | 2027.8 | 1105.8 | Lysine (3TMS) | 174 | 1866.3 | 999.8 |
| Hexanoic acid (1TMS) | 119 | 1085.5 | 365.85 | Lysine (4TMS) | 156 | 1940.3 | 1049.1 |
| Hexose_RI_1924.5 | 319 | 1924.5 | 1038.6 | Maleic acid | 147 | 1313.4 | 568.85 |
| Hexose_RI_1931.0 | 321 | 1931 | 1042.9 | Malic acid (3TMS) | 233 | 1503.5 | 730.1 |
| Hexose_RI_1937.4 | 160 | 1937.4 | 1047.2 | Malonic acid (2TMS) | 147 | 1171.1 | 442.1 |
| Hexose_RI_1956.1 | 319 | 1956.1 | 1059.6 | Maltose (1MEOX) (8TMS) BP | 204 | 2844 | 1542.6 |
| Histidine (4TMS) | 153 | 2177.2 | 1196.9 | Maltose (1MEOX) (8TMS) MP | 204 | 2815.7 | 1529.9 |
| Homocysteine (3TMS) | 128 | 1679.5 | 867 | Melibiose (1MEOX) (8TMS) BP | 204 | 2976.2 | 1602.2 |
| Homoserine (2TMS) | 146 | 1364.5 | 614.4 | Melibiose (1MEOX) (8TMS) MP | 204 | 2933.8 | 1583.1 |
| Homoserine (3TMS)_? | 218 | 1463.6 | 697.65 | Methionine (1TMS) | 104 | 1414.8 | 658.05 |
| Hypoxanthine (2TMS) | 265 | 1820.3 | 969.1 | Methionine (2TMS) | 176 | 1531.1 | 752.55 |
| Inosine (4TMS) | 230 | 2608.5 | 1430.5 | Methionine sulfoxide (3TMS) | 128 | 1801.2 | 956.4 |
| Isobutyric acid, 3-amino- (2TMS) | 131 | 1213.9 | 480.2 | Mucic Acid (6TMS)_? | 333 | 2059.8 | 1125.3 |
| Isobutyric acid, 3-amino- (3TMS)_? | 175 | 1472.1 | 704.6 | myo-Inositol (6TMS) | 217 | 2129.8 | 1168 |
| Isoleucine (1TMS) | 86 | 1185.4 | 454.85 | myo-Inositol-1-phosphate (7TMS) | 318 | 2470.3 | 1359.3 |
| Isoleucine (2TMS) | 158 | 1305.7 | 562 | Nicotinamide (1TMS) | 75 | 1486.1 | 715.95 |
| Isovaleric acid, 2-oxo- (1MEOX) (1TMS) MP_? | 89 | 1122.9 | 399.2 | Nicotinic acid (1TMS) | 180 | 1298 | 555.1 |

| Name | Mass | RI | RT | Name | Mass | RI | RT |
|--|------|--------|--------|--|------|--------|--------|
| Itaconic acid (2TMS)_? | 215 | 1351.1 | 602.4 | Nonanoic acid (1TMS) | 215 | 1363.1 | 613.15 |
| Octadecanoic acid_or_Kontamination_RI_2245.6 | 359 | 2245.6 | 1236.3 | Quinic acid (5TMS) | 345 | 1893.9 | 1018.2 |
| Octadecenoic acid_or_Kontamination_RI_2223.6 | 155 | 2223.6 | 1224 | Raffinose (11TMS) | 361 | 3495.8 | 1816.4 |
| Octadecenoic acid_or_Kontamination_RI_2230.2 | 331 | 2230.2 | 1227.7 | Salicylic acid_?tissue? | 267 | 1523.4 | 746.3 |
| Oleanolic acid (2TMS) | 203 | 3624.7 | 1871.4 | Scopoletin (1TMS) | 234 | 2054.1 | 1121.9 |
| Ornithine (3TMS) | 174 | 1765 | 929.9 | Serine (2TMS) | 132 | 1267.4 | 527.85 |
| Ornithine (4TMS) | 142 | 1836.5 | 979.9 | Serine (3TMS) | 204 | 1372.4 | 621.4 |
| Ornithine-1,5-lactam (2TMS)_? | 128 | 1468.7 | 701.85 | Serine, N-acetyl- (2TMS) | 116 | 1519.8 | 743.4 |
| Oxalic acid (2TMS) | 147 | 1133.1 | 408.3 | Spermidine (+CO2) (5TMS) | 174 | 2494.2 | 1371.6 |
| Oxaloacetate (1MEOX) (2TMS) BP | 89 | 1448.7 | 685.6 | Spermidine (4TMS) | 200 | 2215.2 | 1219.3 |
| Oxaloacetate (1MEOX) (2TMS) MP | 98 | 1477.4 | 708.9 | Spermidine (5TMS) | 144 | 2280.2 | 1255.7 |
| Oxamic acid (2TMS) | 116 | 1264.6 | 525.35 | Stigmasterol (1TMS)_? | 83 | 3329.5 | 1749.2 |
| Panhotenic acid (3TMS)_? | 291 | 2015.3 | 1098.2 | Succinic acid (2TMS) | 75 | 1321.8 | 576.35 |
| Pentonic acid (5TMS) | 292 | 1795.9 | 952.55 | Sucrose (8TMS) | 361 | 2706.3 | 1477.7 |
| Pentose_alcohol_RI_1739.0_Version1 | 217 | 1739 | 910.75 | Tagatose (1MEOX) (5TMS)_? | 103 | 1858.3 | 994.45 |
| Pentose_alcohol_RI_1749.8_Version2 | 217 | 1749.8 | 918.7 | Tetracosanoic acid (1TMS)_? | 117 | 2839.2 | 1540.5 |
| Pentose_RI_1692.5 | 114 | 1692.5 | 876.55 | Tetradecanoic acid (1TMS)_? | 117 | 1850.8 | 989.45 |
| Phenylalanine (1TMS) | 120 | 1554.6 | 771.7 | Threitol_or_Erythritol (4TMS) | 217 | 1521.7 | 744.95 |
| Phenylalanine (2TMS) | 218 | 1640.2 | 838.1 | Threonine acid-1,4-lactone (2TMS) | 147 | 1385.2 | 632.8 |
| Phosphoric acid (3TMS) | 299 | 1274 | 533.75 | Threonine_or_Erythronic acid (4TMS)_Version1 | 147 | 1565.6 | 780.65 |
| Pinitol (5TMS) | 260 | 1866.6 | 999.95 | Threonine_or_Erythronic acid (4TMS)_Version2 | 292 | 1582.2 | 794.1 |
| Proline (+CO2) (2TMS) | 142 | 1592.5 | 802.45 | Threonine (2TMS) | 117 | 1305.5 | 561.85 |
| Proline (1TMS) | 70 | 1175.5 | 446.05 | Threonine (3TMS) | 57 | 1399.4 | 645.45 |
| Proline (2TMS) | 142 | 1308.6 | 564.6 | Tocopherol, alpha- (1TMS) | 502 | 3167.4 | 1683.7 |
| Putrescine (4TMS) | 174 | 1753.2 | 921.2 | Trehalose (8TMS) | 191 | 2813.1 | 1528.7 |
| Pyroglutamic acid (2TMS) | 230 | 1537.1 | 757.45 | Tryptophan (2TMS) | 130 | 2209.5 | 1216.1 |
| Pyruvic acid (2TMS) | 66 | 1086.8 | 367 | Tyrosine (2TMS) | 179 | 1899.6 | 1022 |
| Tyrosine (3TMS) | 218 | 1960.4 | 1062.5 | Urea (2TMS)_Version2 | 189 | 1260.1 | 521.35 |

| Name | Mass | RI | RT | Name | Mass | RI | RT |
|---|------|--------|--------|---------------------------|------|--------|--------|
| Unknown_Polysaccharid_Nigerose? | 160 | 2804.8 | 1525 | Uric acid (4TMS)_? | 441 | 2133.3 | 1170.1 |
| Unknown_Polysaccharid_RI_2755.8 | 361 | 2755.8 | 1501.5 | Uridine (3TMS)_Version1 | 169 | 2475.7 | 1362.1 |
| Unknown_Polysaccharid_RI_2846 | 204 | 2846.5 | 1543.8 | Uridine (3TMS)_Version2_? | 217 | 2432.6 | 1339.7 |
| Unknown_Polysaccharid_RI_2952.2 | 361 | 2952.2 | 1591.4 | Ursolic acid (2TMS) | 203 | 3669.3 | 1894 |
| Unknown_RI_1186.5 | 281 | 1186.5 | 455.8 | Valine (1TMS) | 72 | 1084.2 | 364.75 |
| Unknown_RI_1337.9 | 132 | 1337.9 | 590.7 | Valine_(2TMS) | 144 | 1222.6 | 488 |
| Unknown_RI_1345.6 | 184 | 1345.6 | 597.5 | Vanillic acid (2TMS) | 297 | 1774.6 | 936.9 |
| Unknown_RI_1456.1_maybe_Erythronic_acid | 95 | 1456.1 | 691.6 | | | | |
| Unknown_RI_1650.6 | 168 | 1650.6 | 845.75 | | | | |
| Unknown_RI_1724.9 | 165 | 1724.9 | 900.4 | | | | |
| Unknown_RI_1879.1 | 128 | 1879.1 | 1008.3 | | | | |
| Unknown_RI_2013.4 | 204 | 2013.4 | 1097.1 | | | | |
| Unknown_RI_2038.8 | 297 | 2038.8 | 1112.6 | | | | |
| Unknown_RI_2080.1 | 73 | 2080.1 | 1137.7 | | | | |
| Unknown_RI_2249.2 | 292 | 2249.6 | 1238.6 | | | | |
| Unknown_RI_2419.7 | 437 | 2419.7 | 1333 | | | | |
| Unknown_RI_2458.5 | 73 | 2458.5 | 1353.1 | | | | |
| Unknown_RI_2556.1 | 446 | 2556.1 | 1403.7 | | | | |
| Unknown_RI_2598.0 | 73 | 2598 | 1425.4 | | | | |
| Unknown_RI_2598.0 | 73 | 2596.9 | 1424.8 | | | | |
| Unknown_RI_2774.5 | 397 | 2774.5 | 1510.5 | | | | |
| Unknown_RI_2794.2 | 399 | 2794.2 | 1520 | | | | |
| Unknown_RI_3809.9 | 187 | 3809.9 | 1966.8 | | | | |
| Unknown_RI_3810.8 | 237 | 3810.8 | 1967.4 | | | | |
| Unknown_RI_3931.1 | 57 | 3931.1 | 2047.4 | | | | |
| Unknown_RI_4152.1 | 129 | 4152.1 | 2194.6 | | | | |
| Uracil (2TMS) | 99 | 1348.9 | 600.45 | | | | |

Fig. Anhang 1: Derivatliste

Angegeben ist die Referenzliste mit allen Derivaten, nach denen die Proben untersucht wurden. Spätere Arbeitsschritte wie das Eliminieren von Kontaminationen, die Zusammenfügung von TMS-Derivaten usw. werden in dieser Liste noch nicht abgebildet. Mit >_?< markierte Substanzen konnten nur mit geringerer Sicherheit identifiziert werden.

Mass =Unique-Mass: die Masse, deren Peakfläche (Areawerte) zur Berechnung der Untersuchungen herangezogen wurde.

RI = Retentionsindex, **RT** =Retentionstime

| Metabolit | Name | Name | Name | Name |
|------------------------|------|-------------------------------------|------|-------------------------------|
| Alanine | AS | Not_annotated_PolySa_mglw_Nigerose? | Sa | Gluconic acid-1,5-lactone_? |
| Arginine [-NH3] | AS | Not_annotated_PolySa_RI_2755.8 | Sa | Gluconic acid/Galactonic acid |
| Asparagine | AS | Not_annotated_PolySa_RI_2846 | Sa | Glutaric acid |
| Aspartic acid | AS | Not_annotated_PolySa_RI_2952.2 | Sa | Glyceric acid_? |
| Butyric acid, 4-amino- | AS | Campesterol | St | Glycerol |
| Cysteine_? | AS | Cholesterol_? | St | Glycerol 3-phosphate |
| Glutamic acid | AS | Fuosterol_? | St | Glycerol-2-phosphate_? |
| Glutamine | AS | Stigmasterol_? | St | Glycolic acid |
| Glycine | AS | beta-Sitosterol | St | myo-Inositol |
| Histidine | AS | Decanoic acid | FS | myo-Inositol-1-phosphate |
| Homoserine | AS | Docosanoic acid | FS | Ascorbic acid |
| Isoleucine | AS | Dodecanoic acid_? | FS | Pinitol |
| Leucine | AS | Heptadecanoic acid | FS | Not_annotated_RI_1650.6 |
| Lysine | AS | Hexadecanoic acid | FS | Not_annotated_RI_1724.9 |
| Methionine | AS | Hexadecenoic acid, 9-(Z)- | FS | Not_annotated_RI_1879.1 |
| Ornithine | AS | Hexanoic acid | FS | Not_annotated_RI_2013.4 |
| Phenylalanine | AS | Octadecenoic acid | FS | Not_annotated_RI_2038.8 |
| Proline | AS | Tetracosanoic acid_? | FS | Not_annotated_RI_2080.1 |
| Pyroglutamic acid | AS | Tetradecanoic acid_? | FS | Not_annotated_RI_2249.2 |
| Serine | AS | Pentonic acid | n.z. | Not_annotated_RI_2419.7 |
| Tryptophan | AS | 2-Oxoglutaric acid | n.z. | Not_annotated_RI_2458.5 |
| Tyrosine | AS | Acetic acid, 3,4-dihydroxyphenyl- | n.z. | Not_annotated_RI_2556.1 |
| Valine | AS | Acetic acid, 4-hydroxyphenyl- | n.z. | Not_annotated_RI_2774.5 |
| Homocysteine | AS | Adenine | n.z. | Not_annotated_RI_2794.2 |
| Threonine | AS | Amine_mglw_Tyramine_? | n.z. | Not_annotated_RI_3809.9 |
| Fructose | Sa | Amine_mglw_Dopamine_? | n.z. | Not_annotated_RI_3810.8 |
| Galactose | Sa | Azelaic Acid | n.z. | Not_annotated_RI_3931.1 |
| Glucose | Sa | Benzoic acid, 4-hydroxy- | n.z. | Not_annotated_RI_4152.1 |
| Hexose_A | Sa | Butanoic acid, 2,4-dihydroxy- | n.z. | Not_annotated_RI_1186.5 |
| Hexose_B | Sa | Butanoic acid, 2-hydroxy-? | n.z. | Not_annotated_RI_1337.9 |
| Hexose_C | Sa | Caffeoylquinic acid_cis_trans_3_5 | n.z. | Not_annotated_RI_1345.6 |
| Hexose_D | Sa | Cinnamic acid, trans- | n.z. | Not_annotated_RI_1456.1_ |
| Maltose | Sa | Citric acid | n.z. | |
| Melibiose | Sa | D-Sorbitol_? | n.z. | |
| Pentose_A | Sa | Ethanolaminephosphate | n.z. | |
| Raffinose | Sa | Fumaric acid | n.z. | |
| Sucrose | Sa | Galactinol | n.z. | |
| Tagatose_? | Sa | Galactosylglycerol | n.z. | |
| Trehalose | Sa | Gallic acid_? | n.z. | |

Fig. Anhang 2: Substanzkategorien

Metabolite und deren Zuordnung zu den Substanzkategorien, die bei der Analyse herangezogen wurden. Nur eindeutige zuordenbare Metabolite wurden in eine Kategorie aufgenommen.

AS = Aminosäure, Sa = Saccharid (Kohlenhydrat), St = Sterol, FS = Fettsäure, n.z. = nicht zuordenbar n.i. = nicht identifiziert

| Metabolit | Zuordnung | Metabolit | Zuordnung |
|---|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 2-Oxoglutaric acid | kurzkettige Oxo-Carbonsäure | Glutamic acid | Aminosäure |
| Acetic acid, 3,4-dihydroxyphenyl- | aromatische Carbonsäure | Glutamine | Aminosäure |
| Acetic acid, 4-hydroxyphenyl- | aromatische Carbonsäure | Glutaric acid | kurzkettige Carbonsäure |
| Adenine | Purin | Glyceric acid | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure |
| Alanine | Aminosäure | Glycerol | Polyalkohol |
| Amine_mglw_Dopamine_? | aromatische Carbonsäure | Glycerol 3-phosphate | Glycerol_Phosphate |
| Amine_mglw_Tyramine_? | aromatische Carbonsäure | Glycerol-2-phosphate_? | Glycerol_Phosphate |
| Arginine [-NH3] | Aminosäure | Glycine | Aminosäure |
| Ascorbic acid | Zuckersäure (Vitamin C) | Glycolic acid | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure |
| Asparagine | Aminosäure | Heptadecanoic acid | Fettsäure |
| Aspartic acid | Aminosäure | Hexadecanoic acid | Fettsäure |
| Azelaic Acid | kurzkettige Carbonsäure | Hexadecenoic acid, 9-(Z)- | Fettsäure |
| Benzoic acid, 4-hydroxy- | aromatische Carbonsäure | Hexanoic acid | kurzkettige Carbonsäure |
| beta-Sitosterol | Sterol | Hexose_A | Kohlenhydrat |
| Butanoic acid, 2,4-dihydroxy- | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure | Hexose_B | Kohlenhydrat |
| Butanoic acid, 2-hydroxy-? | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure | Hexose_C | Kohlenhydrat |
| Butyric acid, 4-amino- | nicht proteinogene Aminosäure | Hexose_D | Kohlenhydrat |
| Caffeoylquinic acid_cis_trans_3_5 | aromatische Carbonsäure | Histidine | Aminosäure |
| Campesterol | Sterol | Homocysteine | nicht proteinogene Aminosäure |
| Cholesterol_? | Sterol | Homoserine | nicht proteinogene Aminosäure |
| Cinnamic acid, trans- | aromatische Carbonsäure | Hypoxanthine | Purinderivat |
| Citric acid | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure | Inosine | Purin-Nukleosid |
| Cysteine_? | Aminosäure | Isobutyric acid, 3-amino | nicht proteinogene Aminosäure |
| Decanoic acid | Fettsäure | Isoleucine | Aminosäure |
| Docosanoic acid | Fettsäure | Isovaleric acid, 2-oxo-? | kurzkettige Oxo-Carbonsäure |
| Dodecanoic acid_? | Fettsäure | Itaconic acid_? | kurzkettige Carbonsäure |
| D-Sorbitol_? | Zuckeralkohol | Kynurenic acid_? | aromatische Carbonsäure |
| Ethanolaminephosphate | Aminoalkohol | Lactic acid | kurzkettige Carbonsäure |
| Fructose | Kohlenhydrat | Leucine | Aminosäure |
| Fucosterol_? | Sterol | Lysine | Aminosäure |
| Fumaric acid | kurzkettige Carbonsäure | Malic acid | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure |
| Galactinol | Zuckeralkohol | Malonic acid | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure |
| Galactose | Kohlenhydrat | Maltose | Kohlenhydrat |
| Galactosylglycerol | Zucker_alkohol | Melibiose | Kohlenhydrat |
| Gallic acid_? | aromatische Carbonsäure | Methionine | Aminosäure |
| Gluconic acid/Galactonic acid | Zuckersäure | Mucic Acid_? | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure |
| Gluconic acid-1,5-lactone_? | Zuckersäure | myo-Inositol | Zuckeralkohol |
| Glucose (1MEOX) | Kohlenhydrat | myo-Inositol-1-phosphate | Zuckeralkohol-Phosphat |
| Nicotinamide | Pyridin-Derivat | Oxamic acid | nicht proteinogene Aminosäure |
| Nicotinic acid | Pyridin-Derivat | Panthenic acid_? | Vitamin B |
| Not_annotated_Polysaccharid_mglw_Nigerose_? | Kohlenhydrat | Pentonic acid_? | kurzkettige Carbonsäure |

| Metabolit | Zuordnung | Metabolit | Zuordnung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Not_annotated_Polysaccharid_RI_2755.8 | Kohlenhydrat | Pentose_A | Kohlenhydrat |
| Not_annotated_Polysaccharid_RI_2846 | Kohlenhydrat | Pentose_alcohol_A | Zucker_alkohol |
| Not_annotated_Polysaccharid_RI_2952.2 | Kohlenhydrat | Phenylalanine | Aminosäure |
| Not_annotated_RI_1186.5 | Nicht_identifiziert | Phosphoric acid | Phosphorsäure |
| Not_annotated_RI_1337.9 | Nicht_identifiziert | Pinitol | zyklisches Polyol |
| Not_annotated_RI_1345.6 | Nicht_identifiziert | Tetradecanoic acid_? | Fettsäure |
| Not_annotated_RI_1456.1_maybe_Erythronic_acid | Nicht_identifiziert | Threitol_or_Erythritol | Polyalkohol |
| Not_annotated_RI_1650.6 | Nicht_identifiziert | Threonic acid-1,4-lactone | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure |
| Not_annotated_RI_1724.9 | Nicht_identifiziert | Threonic_or_Erythronic acid_Peak1 | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure |
| Not_annotated_RI_1879.1 | Nicht_identifiziert | Threonic_or_Erythronic acid_Peak2 | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure |
| Not_annotated_RI_2013.4 | Nicht_identifiziert | Threonine | Aminosäure |
| Not_annotated_RI_2038.8 | Nicht_identifiziert | Tocopherol, alpha- | Vitamin E |
| Not_annotated_RI_2080.1 | Nicht_identifiziert | Trehalose | Kohlenhydrat |
| Not_annotated_RI_2249.2 | Nicht_identifiziert | Tryptophan | Aminosäure |
| Not_annotated_RI_2419.7 | Nicht_identifiziert | Tyrosine | Aminosäure |
| Not_annotated_RI_2458.5 | Nicht_identifiziert | Uracil | Pyrimidin |
| Not_annotated_RI_2556.1 | Nicht_identifiziert | Urea | Harnstoff |
| Not_annotated_RI_2774.5 | Nicht_identifiziert | Uric acid_? | Purin-Abbauprodukt |
| Not_annotated_RI_2794.2 | Nicht_identifiziert | Uridine_? | Pyrimidin-Nucleosid |
| Not_annotated_RI_3809.9 | Nicht_identifiziert | Ursolic acid | pentazyklisches Triterpen |
| Not_annotated_RI_3810.8 | Nicht_identifiziert | Valine | Aminosäure |
| Not_annotated_RI_3931.1 | Nicht_identifiziert | Vanillic acid | aromatische Carbonsäure |
| Not_annotated_RI_4152.1 | Nicht_identifiziert | Quinic acid | kurzkettige Hydroxy-Carbonsäure |
| Octadecenoic acid | Fettsäure | Raffinose | Kohlenhydrat |
| Oleanolic acid | pentazyklisches Triterpen | Salicylic_acid_? | aromatische Carbonsäure |
| Ornithine | nicht proteinogene Aminosäure | Scopoletin | Coumarin-Derivat |
| Ornithine-1,5-lactam_? | Piperidin | Serine | Aminosäure |
| Oxalic acid | kurzkettige Carbonsäure | Spermidine | Polyamin |
| Oxaloacetate | kurzkettige Carbonsäure | Stigmasterol_? | Sterol |
| Proline | Aminosäure | Succinic acid | kurzkettige Carbonsäure |
| Putrescine | Polyamin | Sucrose | Kohlenhydrat |
| Pyroglutamic acid | nicht proteinogene Aminosäure | Tagatose_? | Kohlenhydrat |
| Pyruvic acid | kurzkettige Carbonsäure | Tetracosanoic acid_? | Fettsäure |

Fig. Anhang 3: Substanzliste, mit detaillierten Substanzklassen Aufgelistet sind alle untersuchten Substanzen und die jeweilige Zuordnung zu den Substanzklassen. Die Klassifikation ist detaillierter; in der Untersuchung wurde von einer einfacheren Liste ausgegangen.

Qualitative Analyse

| | Insekt | Pflanze | Pilz | Arbeiter- innen | -tiere Geschlechts | Larven | MKS | Pilzpatch | Puppen | Trichilium | Trichome |
|-----------------------------------|--------|---------|------|--------------------|-----------------------|--------|-----|-----------|--------|------------|----------|
| Acetic acid, 3,4-dihydroxyphenyl- | | | X | X | | | | | X | | |
| Acetic acid, 4-hydroxyphenyl- | X | | | X | X | X | | | X | | |
| Adenine | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Alanine | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X |
| Amine_mglw_Tyramine_? | | | X | | X | | X | X | X | | X |
| Amine_mglw_Dopamine_? | X | | | X | X | | | | X | | |
| Arginine [-NH3] | X | | | | X | X | | | X | | |
| Ascorbic acid | X | | | X | X | X | | | X | | |
| Asparagine | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X |
| Aspartic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Azelaic acid | | X | X | X | | | | X | | X | X |
| Benzoic acid, 4-hydroxy- | X | | X | X | X | X | | X | X | X | X |
| Butanoic acid, 2,4-dihydroxy- | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Butanoic acid, 2-hydroxy- ? | X | | X | | X | X | X | X | X | | |
| Butyric acid, 4-amino- | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Caffeoylquinic acid_cis_trans_3_5 | | X | X | | | | X | X | | X | X |
| Campesterol | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| Cholesterol_? | X | X | | X | X | X | X | | X | | X |
| Cinnamic acid, trans- | | X | | | | | X | | | X | X |
| Citric acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Cysteine_? | X | | | X | X | X | | | X | | |
| D-Sorbitol_? | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Decanoic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| Docosanoic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Dodecanoic acid_? | X | | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| Ethanolaminephosphate | X | | | X | X | X | X | | X | | |
| Fructose | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Fucoesterol_? | | | X | X | X | | X | X | X | | X |
| Fumaric acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Galactinol | | | X | | | | | X | | | |
| Galactose | | X | X | X | X | | X | X | | X | |
| Galactosylglycerol | | | | X | X | X | X | | X | | |
| Gallic acid_? | | | X | | | | | X | | | X |
| Gluconic acid-1,5-lactone_? | X | | X | X | X | X | X | X | X | | |
| Gluconic acid/Galactonic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Glucose | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Glutamic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Glutamine | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X |
| Glutaric acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Glyceric acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Glycerol | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X |

Qualitative Analyse

| | Insekt | Pflanze | Pilz | Arbeiter- innen | Geschlechts- tiere | Larven | Mks | Pilzpatch | Puppen | Trichilium | Trichome |
|---------------------------|--------|---------|------|--------------------|-----------------------|--------|-----|-----------|--------|------------|----------|
| Glycerol 3-phosphate | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| Glycerol-2-phosphate_? | X | | | X | X | X | X | | X | | |
| Glycine | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Glycolic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Heptadecanoic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Hexadecanoic acid_? | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Hexadecenoic acid, (9-Z)- | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Hexanoic acid | | | | | | | | | | | |
| Hexose_A | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Hexose_B | | | X | | | | | X | | X | X |
| Hexose_C | X | X | | X | X | X | | | X | X | X |
| Hexose_D | X | | | X | X | X | | | X | | X |
| Histidine | | | | | | | | | X | | |
| Homocysteine | X | | | X | X | X | | | X | | |
| Homoserine | X | | | X | X | X | X | | X | | |
| Hypoxanthine | | | | | X | X | | | X | | |
| Inosine | X | | | X | X | X | | | X | | |
| Isobutyricacid, 3-amino | X | | | X | X | X | | | X | | |
| Isoleucine | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Isovalericacid, 2-oxo-? | | | | | | | | | | | |
| Itaconic acid_? | | X | | X | | | X | | | X | |
| Kynurenic acid_? | X | | | | X | X | | | X | | |
| Lactic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Leucine | X | | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| Lysine | X | | | X | X | X | X | | X | | |
| Malic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | |
| Malonic acid | X | | X | X | | X | | X | X | | |
| Maltose | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Melibiose | | | | | | | | | | | |
| Methionine | X | | | X | X | X | | | X | | X |
| Mucic acid_? | | X | | X | | X | X | | | X | |
| Nicotinamide | X | | | X | X | X | X | | X | | X |
| Nicotinic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Octadecanoic acid | | X | | X | X | X | | X | X | X | X |
| Oleanolic acid | | | | | | | | | | X | X |
| Ornithine | X | | | X | X | X | X | | X | | |
| Ornithine-1,5-lactam_? | X | | | X | X | X | | | X | | |
| Oxalic acid | X | | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| Oxaloacetate | | | | | | | | | | | |
| Oxamic acid | X | | | X | X | X | | | X | | X |
| Panhotenic acid_? | X | | | X | | X | X | | X | | |

Qualitative Analyse

| | Insekt | Pflanze | Pilz | Arbeiter- innen | -tiere Geschlechts | Larven | MKS | Pilzpatch | Puppen | Trichilium | Trichome |
|---|--------|---------|------|--------------------|-----------------------|--------|-----|-----------|--------|------------|----------|
| Pentonic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Pentose_A | | | X | | | | | X | | X | X |
| Pentose_alcohol_A | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Phenylalanine | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X |
| Phosphoric acid | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | X |
| Pinitol | | | | X | | | | | | | |
| Proline | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X |
| Putrescine | X | | | X | X | X | X | | X | | |
| Pyroglutamic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Pyruvic acid | | | X | X | X | | | X | | | |
| Quinic acid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Raffinose | | | | | | | | | | | |
| Salicylic_acid_? | | X | X | X | | X | X | X | | X | X |
| Scopoletin | | | | | | | | | | X | X |
| Serine | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Spermidine | | | | | X | X | | | | | |
| Stigmasterol_? | | | X | X | | | | X | | X | X |
| Succinicacid | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Sucrose | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Tagatose_? | X | | | X | X | X | | | X | X | X |
| Tetracosanoic acid_? | | X | X | | | | X | X | | X | X |
| Tetradecanoic acid_? | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Threitol_or_Erythritol | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X |
| Threonic acid-1,4-lactone | X | | | X | X | X | | | X | X | |
| Threonic_or_Erythronic acid_Peak1 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Threonic_or_Erythronic acid_Peak2 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Threonine | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X |
| Tocopherol, alpha- | X | | | X | X | X | | | X | | |
| Trehalose | | | X | | | X | | X | | X | X |
| Tryptophan | | | | | | | | | | | |
| Tyrosine | X | | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| Not_annotated_Polysaccharid_mglw_Nigerose? | | | | X | | | | | X | X | X |
| Not_annotated_Polysaccharid_RI_2755.8 | X | | | X | X | | | | X | | |
| Not_annotated_Polysaccharid_RI_2846 | | | | | X | | | | | | |
| Not_annotated_Polysaccharid_RI_2952.2 | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X |
| Not_annotated_RI_1186.5 | X | | X | X | X | X | X | X | X | | |
| Not_annotated_RI_1337.9 | X | | | | | | | | | | |
| Not_annotated_RI_1345.6 | X | X | X | | | X | X | X | X | X | X |
| Not_annotated_RI_1456.1_maybe_Erythronic_a cid | X | | | X | X | | | | X | | |
| Not_annotated_RI_1650.6 | | | | X | | | | | | | |

| Qualitative Analyse | Insekt | Pflanze | Pilz | Arbeiter- innen | Geschlechts- tiere | Larven | MKS | Pilzpatch | Puppen | Trichilium | Trichome |
|--------------------------|-------------------------|---------|------|--------------------|-----------------------|--------|-----|-----------|--------|------------|----------|
| | Not_annotated_RI_1724.9 | | | X | X | X | | | X | | X |
| Not_annotated_RI_1879.1 | X | | | | X | X | | | X | | X |
| Not_annotated_RI_2013.4 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Not_annotated_RI_2038.8 | | | X | | | | | X | | X | |
| Not_annotated_RI_2080.1 | | | X | | | X | | X | | | X |
| Not_annotated_RI_2249.2 | | | | X | | | | | | | |
| Not_annotated_RI_2419.7 | X | | | | X | X | | | X | | |
| Not_annotated_RI_2458.5 | | | | | X | | | | X | | |
| Not_annotated_RI_2556.1 | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X |
| Not_annotated_RI_2774.5 | X | | | X | X | X | X | | X | | |
| Not_annotated_RI_2794.2 | X | | | X | X | X | | | X | | |
| Not_annotated_RI_3809.9 | | | | | | | | | | | |
| Not_annotated_RI_3810.8 | | | | | | | | | | | X |
| Not_annotated_RI_3931.1 | | | | X | | X | | | | | |
| Not_annotated_RI_4152.1 | | | | X | X | | | | | | |
| Uracil | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Urea | X | | X | X | X | X | | X | X | | |
| Uric acid_? | X | | | X | X | X | | | X | | |
| Uridine_? | X | | | X | X | X | X | | X | | |
| Ursolic acid | | | | | | | | | | X | |
| Valine | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Vanillic acid | | X | X | | | | | X | | X | X |
| beta-Sitosterol | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| myo-Inositol | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| myo-Inositol-1-phosphate | X | | | X | X | X | X | | X | | |

Fig. Anhang 4: Qualitative Analyse; Substanzliste Aufgelistet sind alle untersuchten Substanzen. Mit >X< gekennzeichnete Felder weisen das entsprechende Metabolit in über ≥75% der Proben auf.

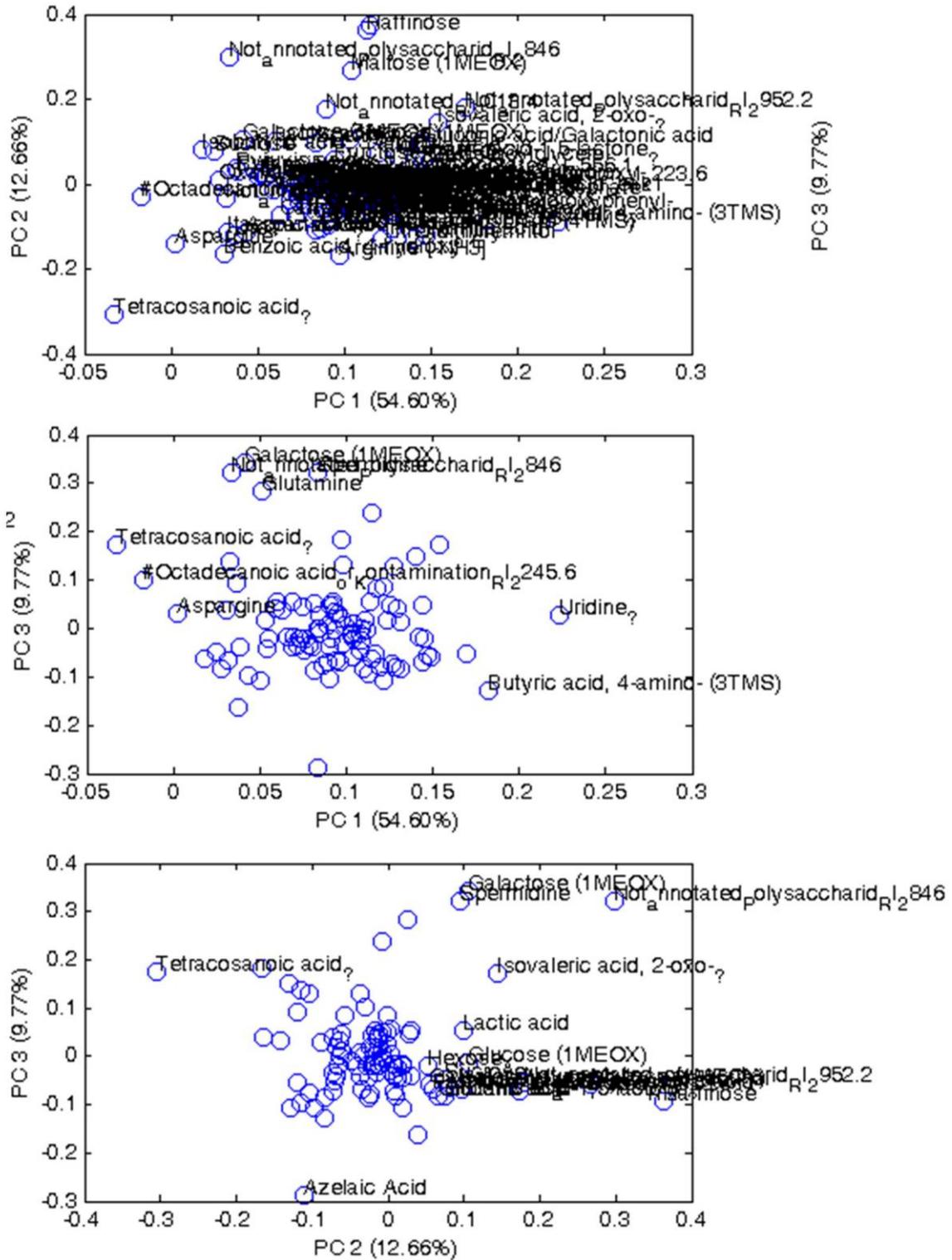
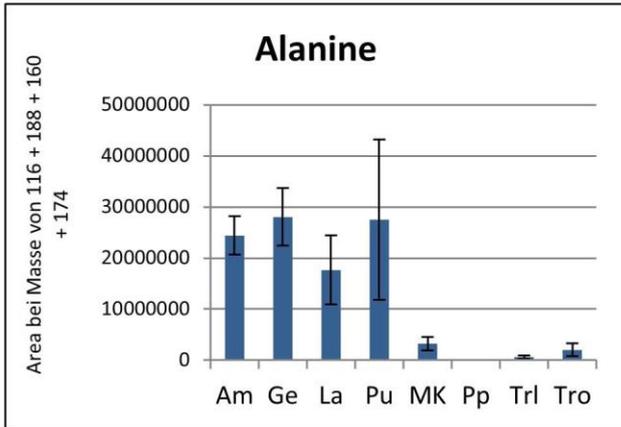


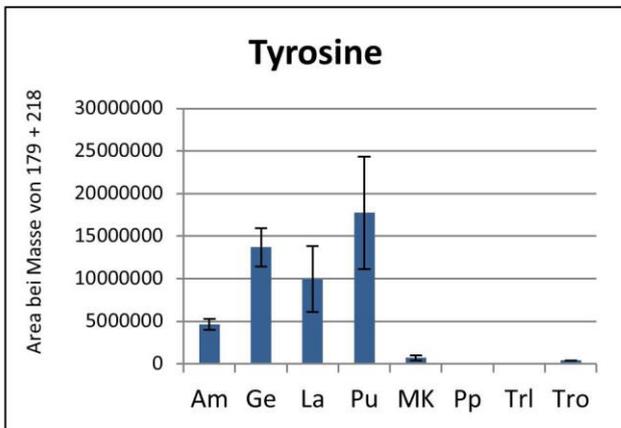
Fig. Anhang 5: PCA-SL der MKs der *Cecropia*-Arten; Streuungsrelevante Substanzen

Angezeigt sind die streuungsrelevanten Substanzen für Fig. 18: PCA-SL der MKs der *Cecropia* Arten. Für die Streuung der Arten relevante Substanzen wenig eindeutig; Tetracosanoic acid und Asparagine sind u.a. für Positionierung von *C. obtusifolia* im linken Spektrum der PC 1 (54.60%) ein Faktor. Für die Positionierung von *C. peltata* im oberen Bereich der PC 3 (9.77%)-Achse zeigen sich u.a. Galactose, Spermidine und Not_annotated_Polysaccharid_RI_2846 verantwortlich.



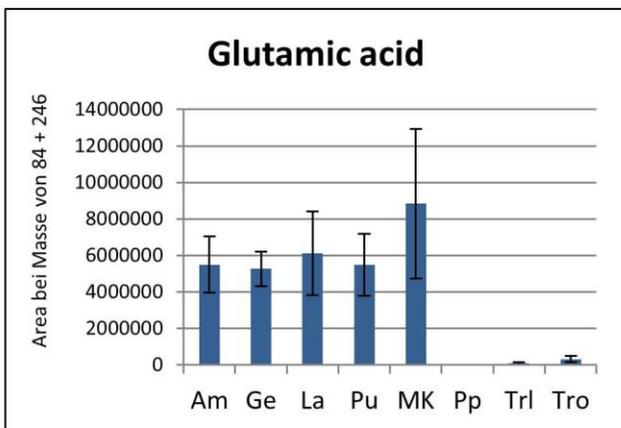
Alanine

| | |
|----------------------------|---------------------|
| Ameisen – MKs | Ameisen - Pilzpatch |
| Ameisen – Trichilium | Ameisen - Trichome |
| Geschlechtst. - MKs | Larven - Pilzpatch |
| Geschlechtst. – Pilzpatch | MKs - Pilzpatch |
| Geschlechtst. - Trichilium | Pilz - Trichilium |
| Geschlechtst. - Trichome | |



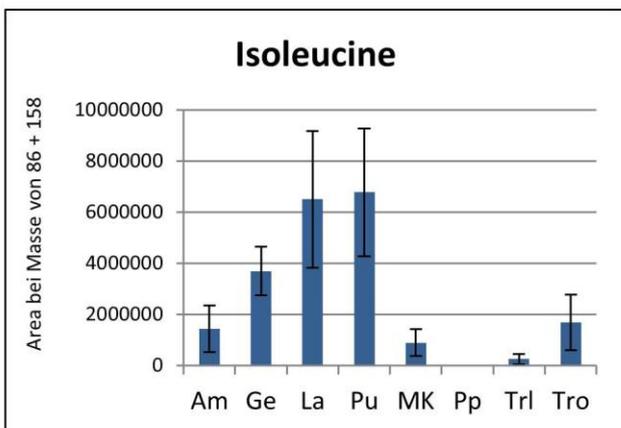
Tyrosine

| | |
|----------------------------|----------------------|
| Ameise – Geschlechtst. | Ameisen - MKs |
| Ameisen – Pilzpatch | Ameisen - Trichilium |
| Geschlechtst. - MKs | Ameisen – Trichome |
| Geschlechtst. – Pilzpatch | Larven – Pilzpatch |
| Geschlechtst. - Trichilium | MKs – Pilzpatch |
| Geschlechtst. – Trichome | Pilzpatch – Puppen |
| Pilzpatch – Trichome | |



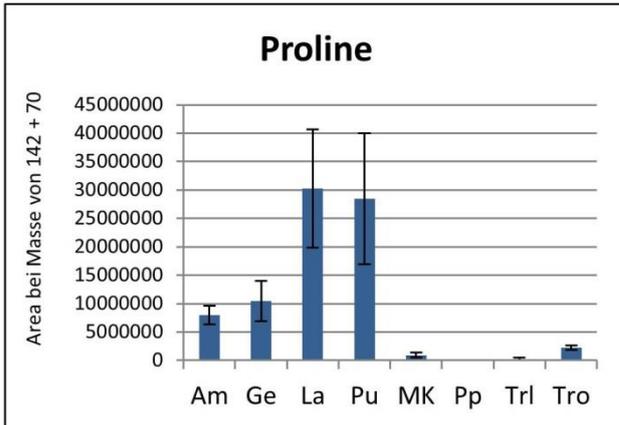
Glutamic acid

| | |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Ameisen – Pilzpatch | |
| Geschlechtstiere – Pilzpatch | |
| Geschlechtstiere - Trichilium | Geschlechtstiere – Trichome |
| Larven – Pilzpatch | |
| MKs – Pilzpatch | |
| Pilzpatch – Puppen | |
| Pilzpatch - Trichome | |



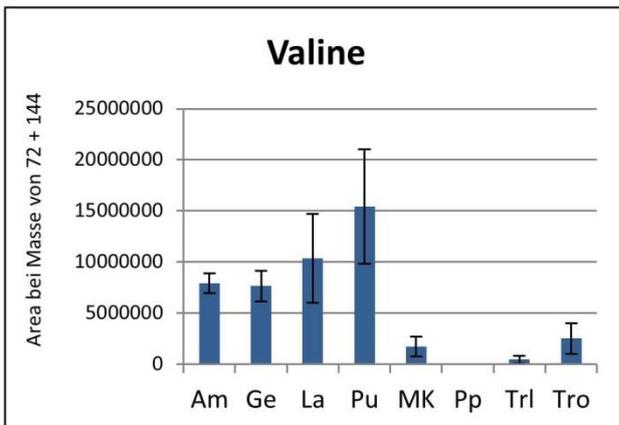
Isoleucine

| |
|------------------------------|
| Geschlechtstiere - Pilzpatch |
| Pilzpatch - Puppen |



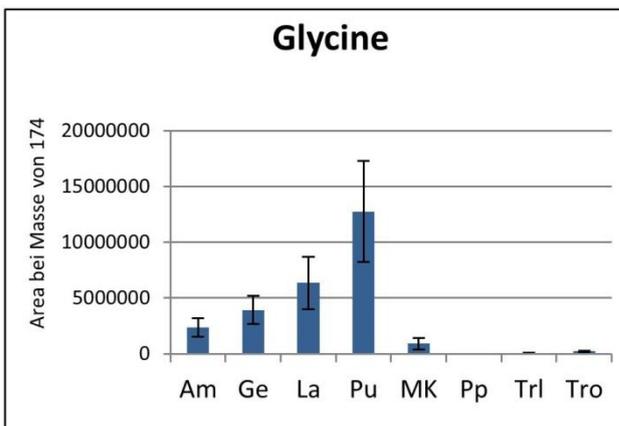
Proline

- Ameisen - MKs
- Ameisen - Pilzpatch
- Ameisen - Trichilium
- Geschlechtstiere - Pilzpatch
- Larven - Pilzpatch
- MKs - Pilzpatch
- Pilzpatch - Puppen
- Pilzpatch - Trichome
- Trichilium - Trichome



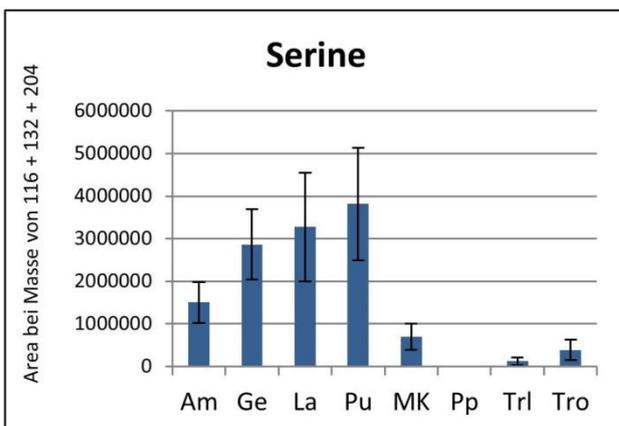
Valine

- Ameisen - MKs
- Ameisen - Pilzpatch
- Ameisen - Trichilium
- Ameisen - Trichome
- Geschlechtstiere - MKs
- Geschlechtstiere - Pilzpatch
- Geschlechtstiere - Trichilium
- Pilzpatch - Puppen
- Pilzpatch - Trichome



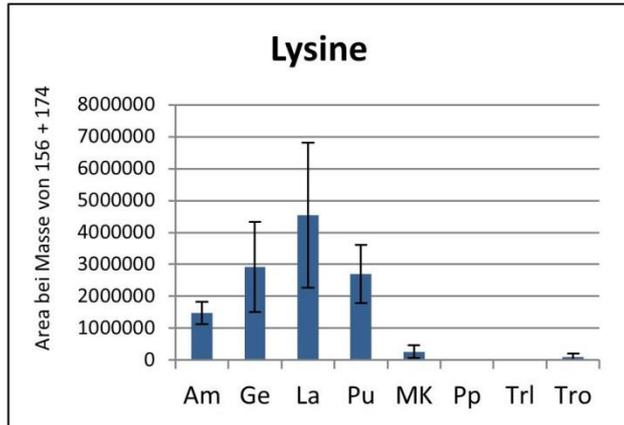
Glycine

- Ameisen - Pilzpatch
- Geschlechtstiere - Pilzpatch
- Larven - Pilzpatch
- Pilzpatch - Puppen
- Pilzpatch - Trichome



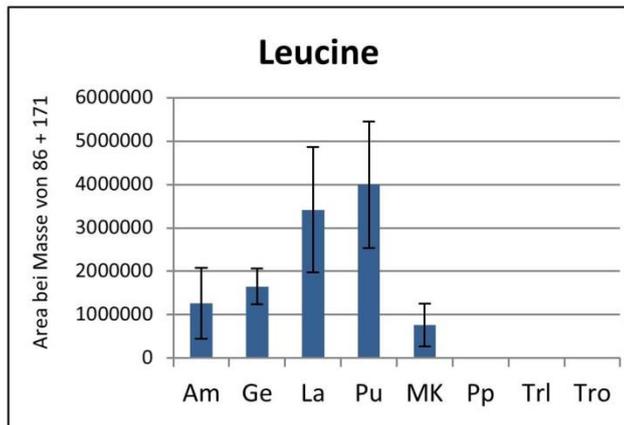
Serine

- Ameisen - Pilzpatch
- Geschlechtstiere - Pilzpatch
- Larven - Pilzpatch
- MKs - Pilzpatch
- Pilzpatch - Puppen



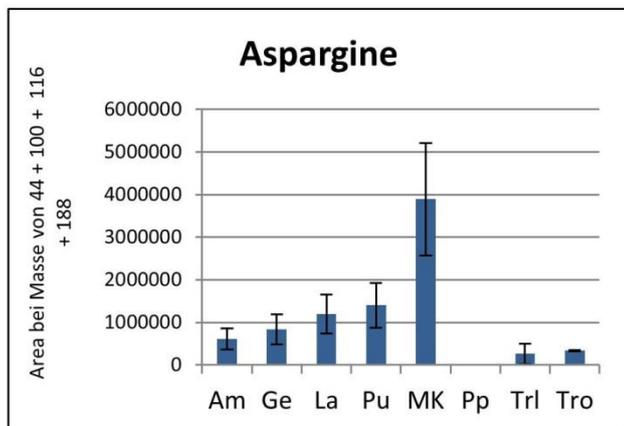
Lysine

Ameisen - MKs
Ameisen - Pilzpatch
Ameisen - Trichilium
Pilzpatch - Puppen



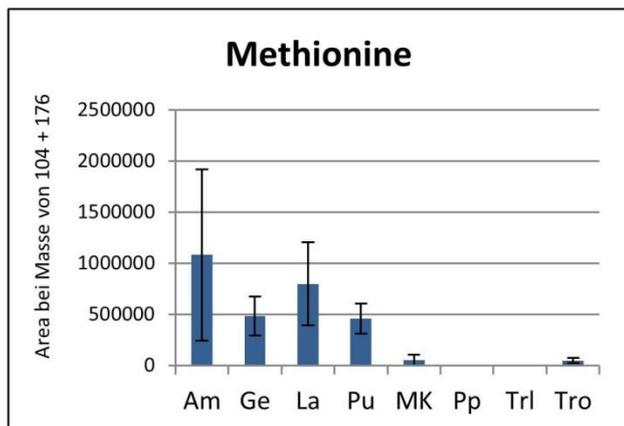
Leucine

Geschlechtstiere - Pilzpatch
Pilzpatch - Puppen



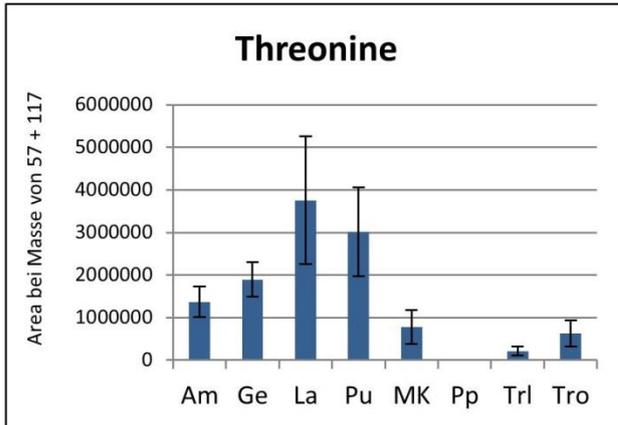
Asparagine

Ameisen - MKs
Ameisen - Pilzpatch
Geschlechtstiere - Pilzpatch
Larven - Pilzpatch
MKs - Pilzpatch
Pilzpatch - Puppen
Pilzpatch - Trichome



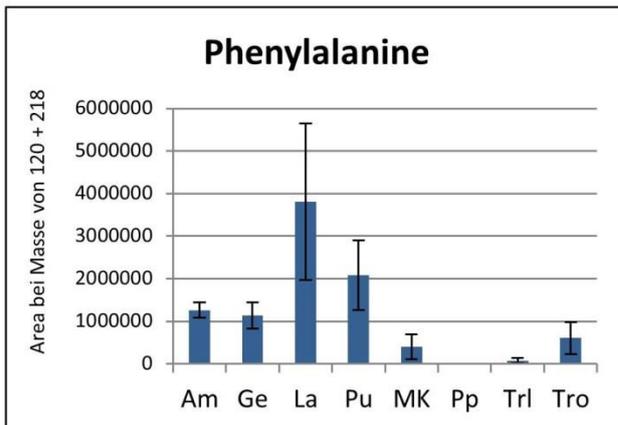
Methionine

Geschlechtstiere - Pilzpatch
Pilzpatch - Puppen
Pilzpatch - Trichome



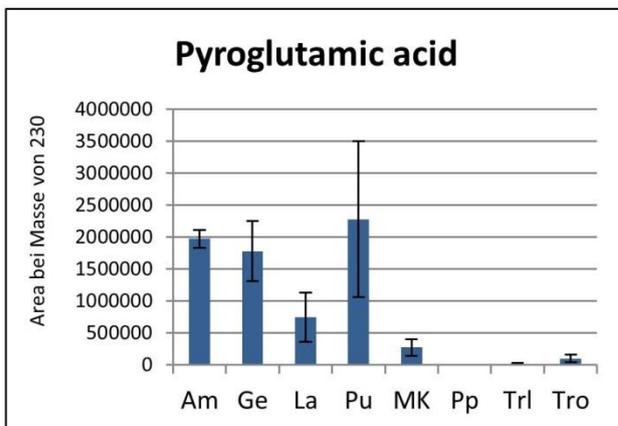
Threonine

Ameisen - Pilzpatch
 Geschlechtstiere - Pilzpatch
 Geschlechtstiere - Trichilium
 Larven - Pilzpatch
 Pilzpatch - Puppen
 Pilzpatch - Trichilium
 Pilzpatch - Trichome



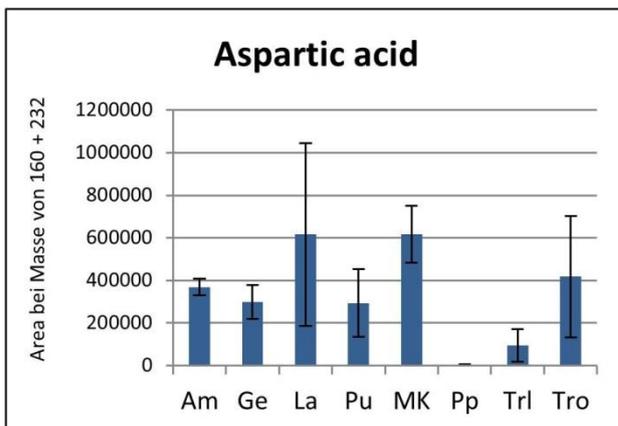
Phenylalanine

Ameisen - MKs
 Ameisen - Pilzpatch
 Ameisen - Trichilium
 Geschlechtstiere - Pilzpatch
 Pilzpatch - Puppen



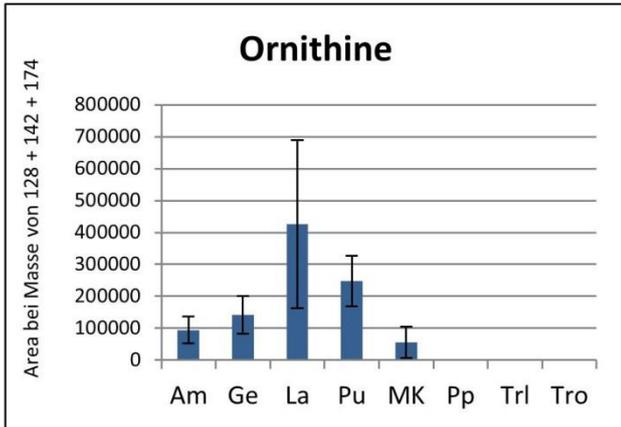
Pyroglutamic acid

Ameise - Larven
 Ameisen - MKs
 Ameisen - Pilzpatch
 Ameisen - Trichilium
 Ameisen - Trichome
 Geschlechtstiere - MKs
 Geschlechtstiere - Pilzpatch
 Pilzpatch - Trichome



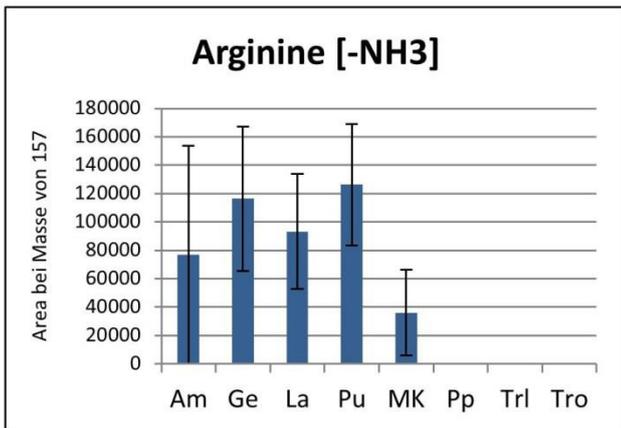
Aspartic acid

Ameisen - Pilzpatch
 Ameisen - Trichilium
 Geschlechtstiere - Pilzpatch
 MKs - Pilzpatch



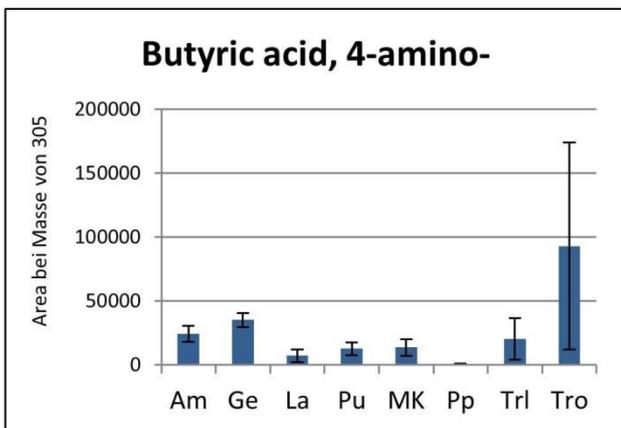
Ornithine

Geschlechtstiere - Pilzpatch
Pilzpatch - Puppen



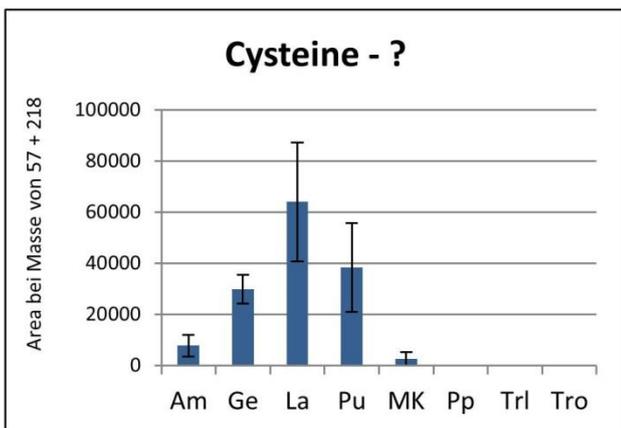
Asparagine [-NH3]

Geschlechtstiere - Pilzpatch
Pilzpatch - Puppen



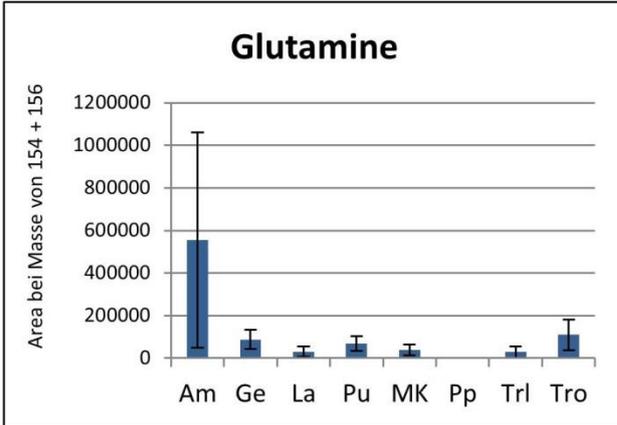
Butyric acid, 4-amino

Ameisen - Pilzpatch
Geschlechtstiere - Larven
Geschlechtstiere - Pilzpatch
Geschlechtstiere - Puppen



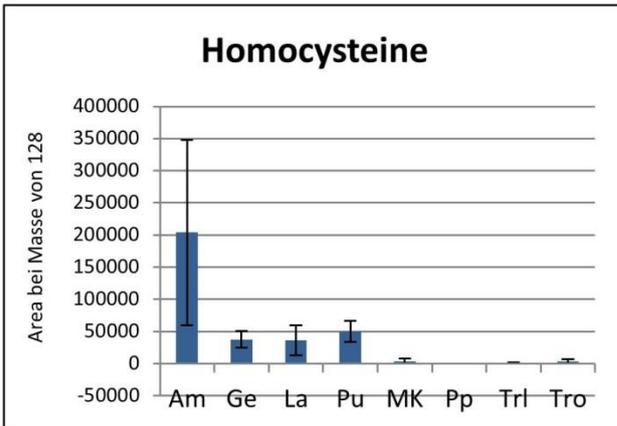
Cysteine_?

Ameise - Geschlechtstiere
Geschlechtstiere - MKs
Geschlechtstiere - Pilzpatch
Geschlechtstiere - Trichilium
Geschlechtstiere - Trichome
Larven - Pilzpatch



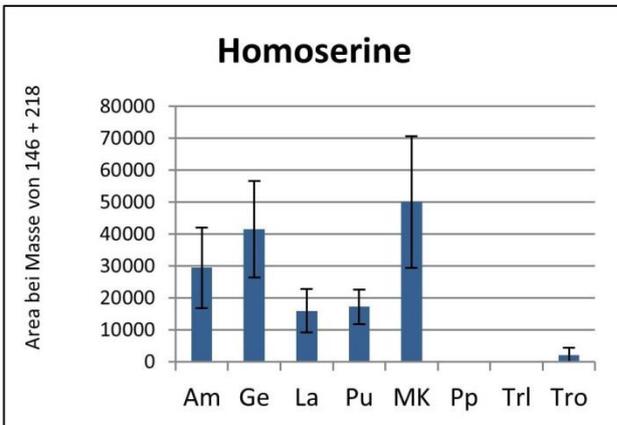
Glutamine

-



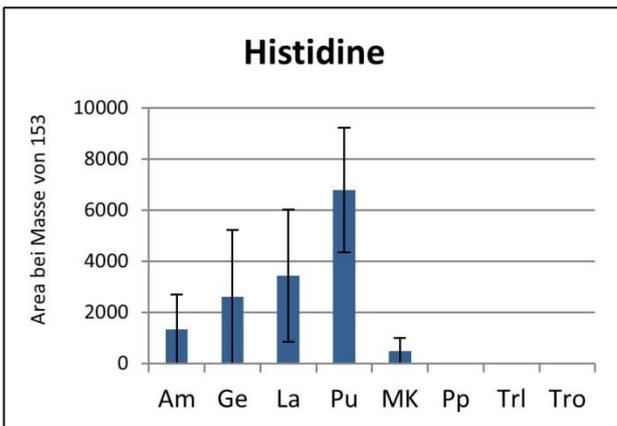
Homocysteine

Geschlechtstiere - Pilzpatch
Pilzpatch - Puppen



Homoserine

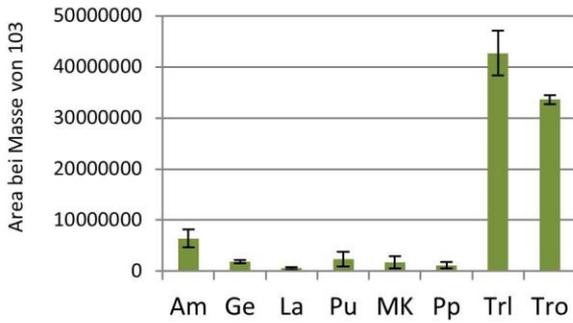
Geschlechtstiere - Pilzpatch
MKs - Pilzpatch
Pilzpatch - Puppen



Histidine

Pilzpatch - Puppen

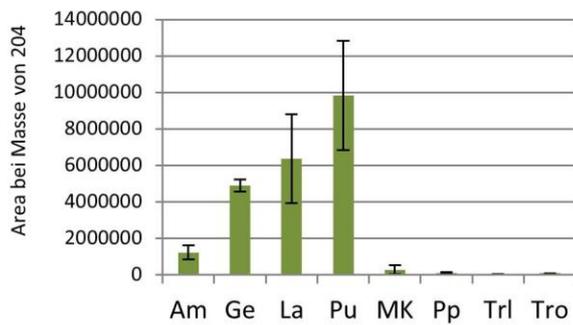
Fructose



Fructose (1MEOX)

Ameise - Larven
 Ameisen - Trichilium
 Geschlechtst. - Larven
 Geschlechtst. - Trichilium
 Geschlechtst. - Trichome
 MKs - Trichome
 Pilzpatch - Trichome
 Puppen - Trichome
 Ameisen - Pilzpatch
 Ameisen - Trichome
 Larven - Trichilium
 Larven - Trichome
 MKs - Trichilium
 Pilzpatch - Trichilium
 Puppen - Trichilium

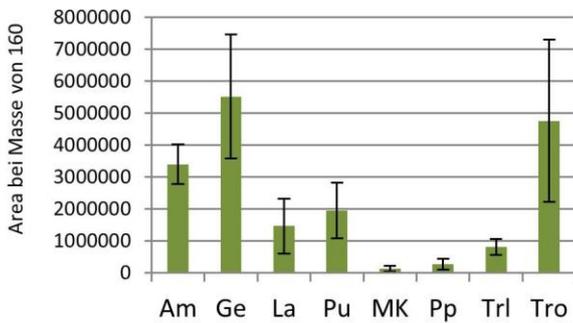
Maltose



Maltose (1MEOX)

Ameise - Geschlechtstiere
 Ameisen - Pilzpatch
 Ameisen - Puppen
 Geschlechtstiere - MKs
 Geschlechtstiere - Pilzpatch
 Geschlechtstiere - Trichilium
 Geschlechtstiere - Trichome
 Larven - Pilzpatch
 MKs - Puppen
 Pilzpatch - Puppen

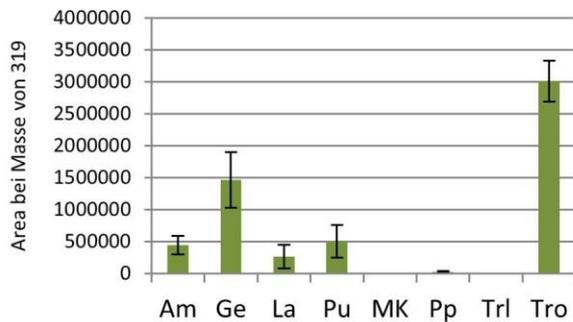
Hexose_C



Hexoce_C

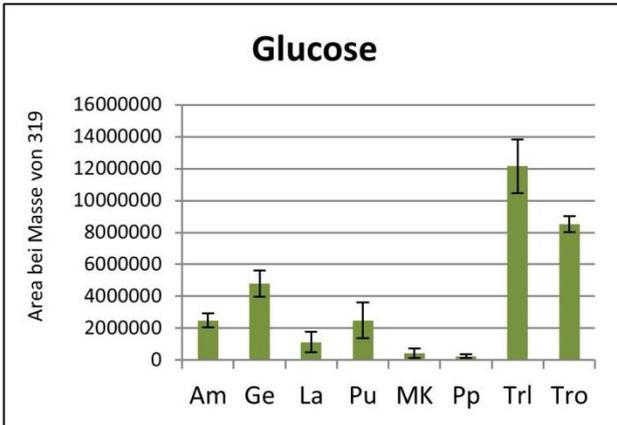
Ameisen - MKs
 Ameisen - Pilzpatch
 Geschlechtstiere - MKs
 Geschlechtstiere - Pilzpatch
 Pilzpatch - Trichome

Hexose_D



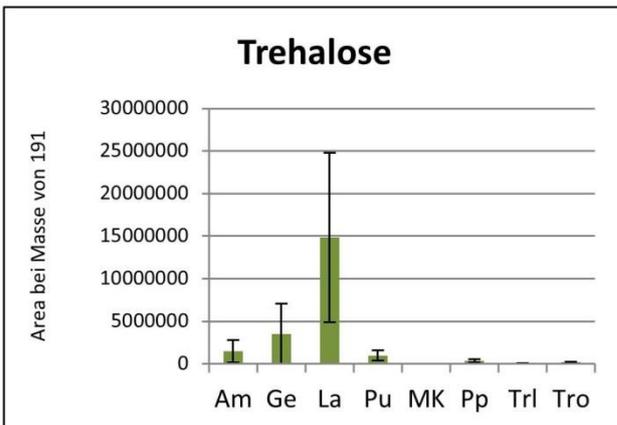
Hexose_D

Ameisen - MKs
 Geschlechtst. - Larven
 Geschlechtst. - MKs
 Geschlechtst. - Pilzpatch
 Pilzpatch - Trichome
 Trichilium - Trichome
 Ameisen - Pilzpatch
 Ameisen - Trichome
 Larven - Trichome
 MKs - Trichome
 Puppen - Trichome



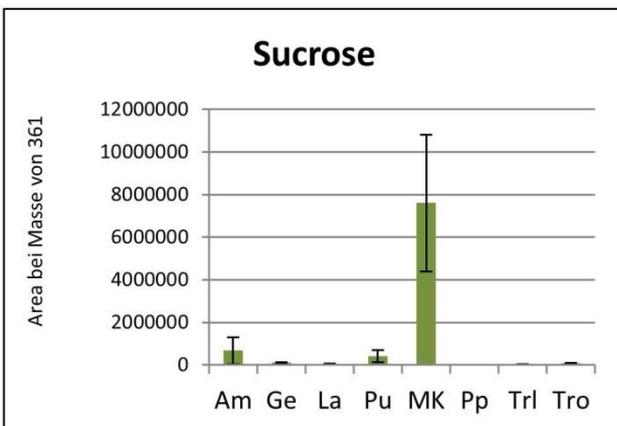
Glucose (1MEOX)

| | |
|-----------------------------|----------------------|
| Ameise – Geschlechtst. | Ameisen - MKs |
| Ameisen – Pilzpatch | Ameisen - Trichilium |
| Geschlechtsti. – Larven | Ameisen - Trichome |
| Geschlechtsti. – MKs | Larven – Trichilium |
| Geschlechtst. – Pilzpatch | Larven - Trichome |
| Geschlechtsti. – Trichilium | MKs – Trichilium |
| Geschlechtsti. – Trichome | MKs - Trichome |
| Pilzpatch – Trichilium | Pilzpatch – Trichome |
| Puppen - Trichilium | Puppen - Trichome |



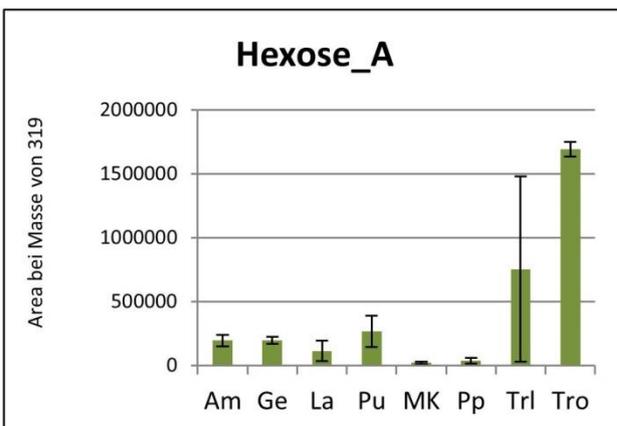
Trehalose

MKs - Trichome
Trichilium - Trichome



Sucrose

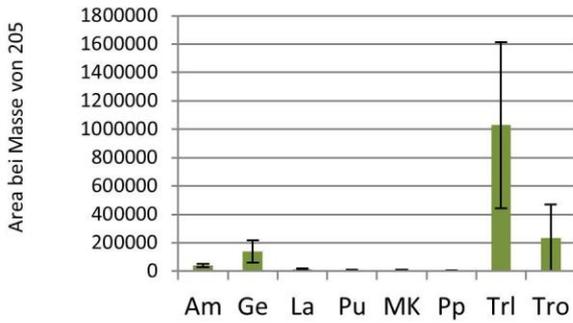
Geschlechtstiere - Larven
Geschlechtstiere - Pilzpatch
Larven - MKs
MKs – Pilzpatch
MKs – Puppen
Pilzpatch – Trichilium
Pilzpatch - Trichome



Hexose_A

Ameisen - MKs
Ameisen - Pilzpatch
Ameisen - Trichome
Geschlechtstiere - MKs
Geschlechtstiere - Pilzpatch
Geschlechtstiere - Trichome
Larven - Trichome
MKs - Trichome
Pilzpatch - Trichome
Puppen - Trichome

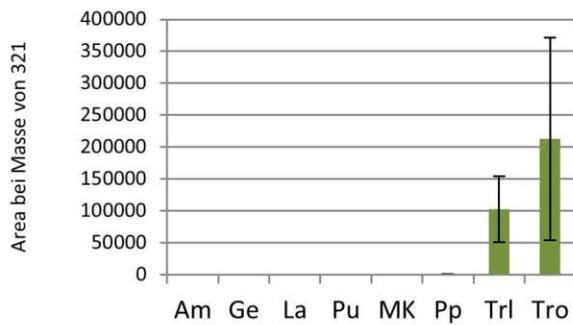
Galactose



Galactose (1MEOX)

Ameisen - MKs
 Ameisen - Pilzpatch
 Ameisen - Puppen
 Larven - Trichilium
 Pilzpatch - Trichilium
 Puppen - Trichilium

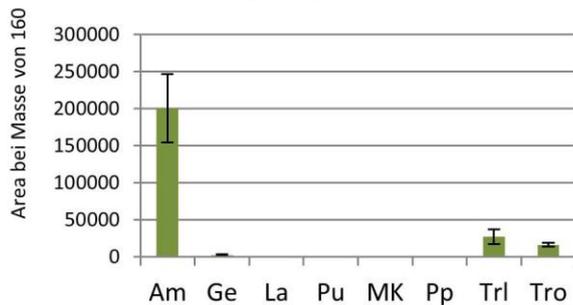
Hexose_B



Hexose_B

Ameisen - Trichilium
 Larven - Trichilium
 Pilzpatch - Trichilium
 Puppen - Trichilium

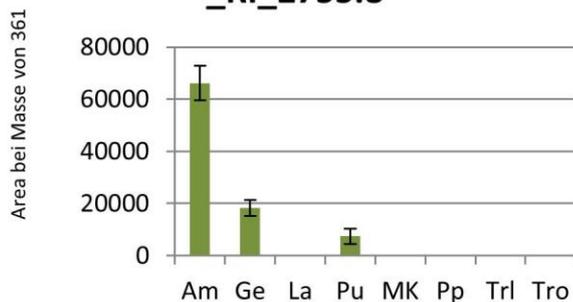
Not_annotated_Polysaccharid mglw_Nigerose_?



Not_annotated_Polysaccharid_mglw._Nigerose

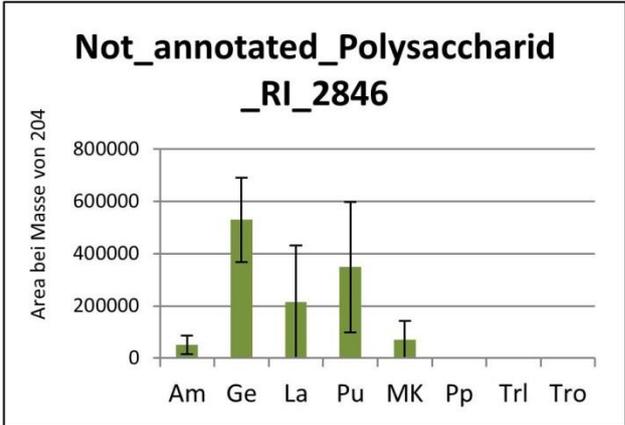
| | |
|----------------------------|------------------------|
| Ameise - Geschlechtst. | Ameise - Larven |
| Ameisen - MKs | Ameisen - Pilzpatch |
| Geschlechtst. - Trichilium | Ameisen - Puppen |
| Geschlechtsti. - Trichome | Larven - Trichilium |
| Larven - Trichome | MKs - Trichilium |
| MKs - Trichome | Pilzpatch - Trichilium |
| Pilzpatch - Trichome | Puppen - Trichilium |
| Puppen - Trichome | |

Not_annotated_Polysaccharid _RI_2755.8



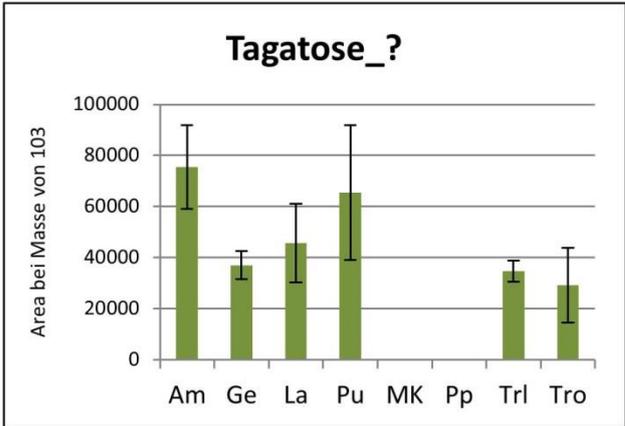
Not_annotated_Polysaccharid_RI_2755.8

| | |
|----------------------------|----------------------|
| Ameise - Geschlechtst. | Ameise - Larven |
| Ameisen - MKs | Ameisen - Pilzpatch |
| Ameisen - Puppen | Ameisen - Trichilium |
| Geschlechtst. - Larven | Ameisen - Trichome |
| Geschlechtst. - MKs | Larven - Puppen |
| Geschlechtst. - Pilzpatch | Pilzpatch - Puppen |
| Geschlechtst. - Trichilium | |
| Geschlechtst. - Trichome | |



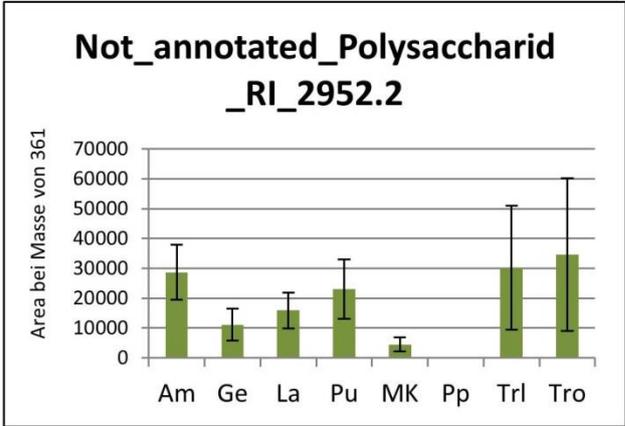
Not_annotated_Polysaccharid_RI_2846

Ameise - Geschlechtstiere
Geschlechtstiere - Pilzpatch



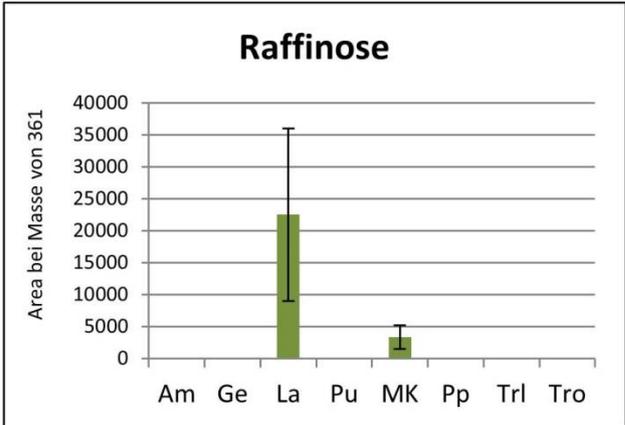
Tagatose (1MEOX)_?

Ameisen - MKs
Ameisen - Pilzpatch
Geschlechtstiere - MKs
Geschlechtstiere - Pilzpatch
Larven - Pilzpatch
MKs - Trichilium
Pilzpatch - Puppen
Pilzpatch - Trichilium
Pilzpatch - Trichome



Not_annotated_Polysaccharid_RI_2952.2

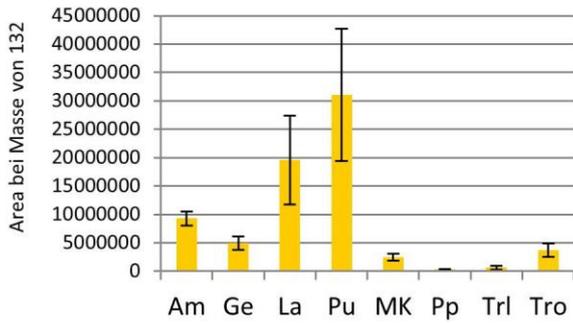
Ameisen - Pilzpatch
Larven - Pilzpatch



Raffinose

-

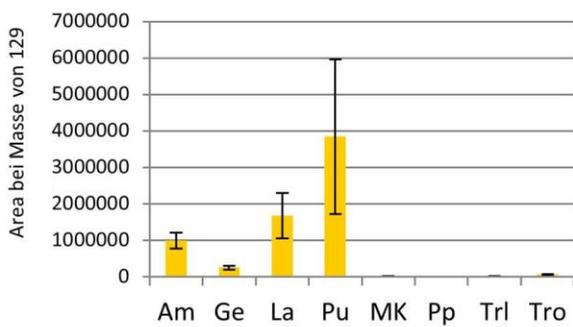
Hexadecanoic acid



Hexadecanoic acid

Ameisen - MKs
 Ameisen – Pilzpatch
 Ameisen – Trichilium
 Ameisen – Trichome
 Geschlechtstiere – Pilzpatch
 Larven – Pilzpatch
 MKs – Pilzpatch
 Pilzpatch – Puppen
 Pilzpatch - Trichome

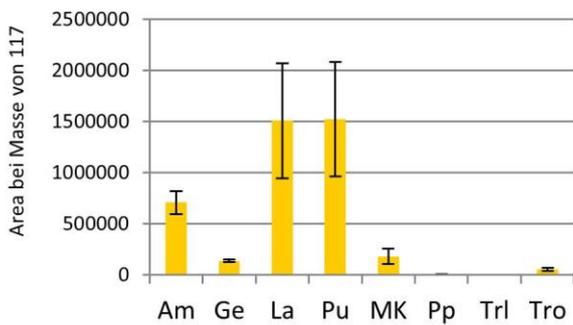
Hexadecenoic acid, 9-(Z)-



Hexadecenoic acid, 9-(Z)-

| | |
|---------------------------|------------------------|
| Ameise – Geschlechtst. | Ameisen - MKs |
| Ameisen – Pilzpatch | Ameisen - Trichilium |
| Geschlechtst. - MKs | Ameisen – Trichome |
| Geschlechtst. – Pilzpatch | Larven – Pilzpatch |
| MKs – Pilzpatch | Pilzpatch - Trichilium |
| Pilzpatch - Trichome | |

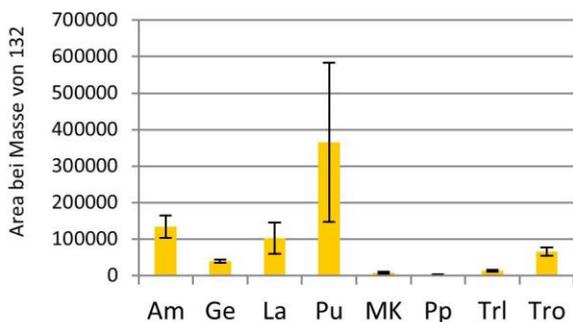
Dodecanoic acid_?



Dodecanoic acid_?

| | |
|----------------------------|------------------------|
| Ameise – Geschlechtst. | Ameisen - MKs |
| Ameisen - Pilzpatch | Ameisen - Trichilium |
| Geschlechtst. - Pilzpatch | Ameisen - Trichome |
| Geschlechtst. - Trichilium | Larven - Pilzpatch |
| Geschlechtst. – Trichome | MKs - Pilzpatch |
| Pilzpatch - Puppen | Pilzpatch - Trichilium |
| Pilzpatch - Trichome | |

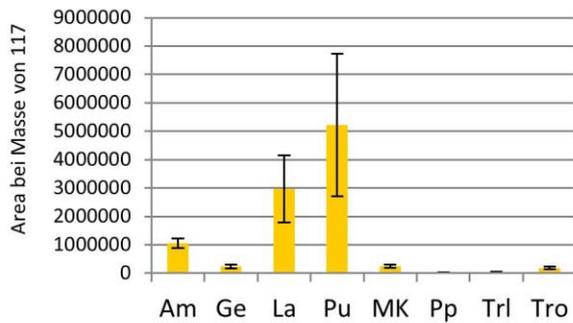
Heptadecanoic acic



Heptadecanoic acic

Ameise - Geschlechtstiere
 Ameisen - MKs
 Ameisen – Pilzpatch
 Geschlechtstiere – MKs
 Geschlechtstiere – Pilzpatch
 Geschlechtstiere – Trichilium
 MKs – Trichome
 Pilzpatch – Trichilium
 Pilzpatch - Trichome
 Trichilium - Trichome

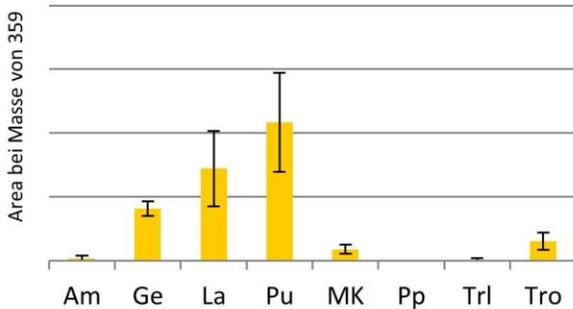
Tetradecanoic acid_?



Tetradecanoic aci_?

Ameise – Geschlechtstiere
 Ameisen - MKs
 Ameisen – Pilzpatch
 Ameisen – Trichilium
 Ameisen – Trichome
 Geschlechtstiere – Pilzpatch
 Larven – Pilzpatch
 MKs – Pilzpatch
 Pilzpatch – Trichilium
 Pilzpatch - Trichome

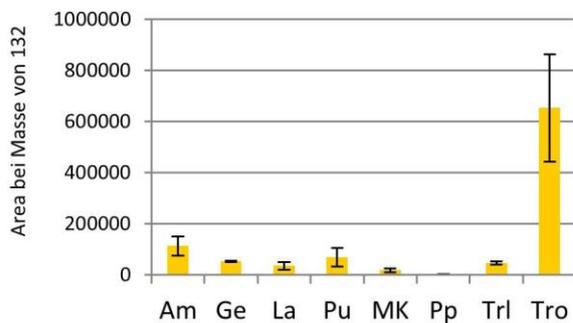
Octadecenoic acid



Octadecenoic acid

Ameise – Geschlechtstiere
 Ameisen – Puppen
 Geschlechtstiere - MKs
 Geschlechtstiere – Pilzpatch
 Geschlechtstiere - Trichilium
 MKs – Pilzpatch
 Pilzpatch – Puppen
 Pilzpatch - Trichome

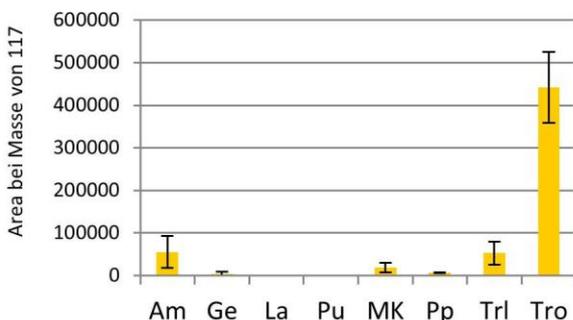
Docosanoic acid



Docosanoic acid

| | |
|---------------------------|----------------------|
| Ameisen – Pilzpatch | Ameisen – Trichome |
| Geschlechtst. - MKs | Larven - Trichome |
| Geschlechtst. – Pilzpatch | MKs – Pilzpatch |
| Geschlechtst. – Trichome | MKs – Trichome |
| Pilzpatch - Trichilium | Pilzpatch – Trichome |
| Puppen - Trichome | |

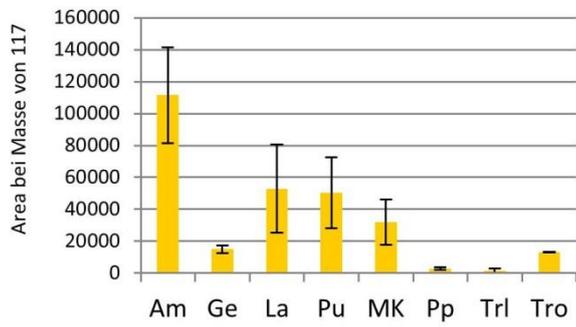
Tetracosanoic acid_?



Tetracosanoic acid_?

| | |
|----------------------|--------------------------|
| Ameisen - Trichome | Geschlechtst. - Trichome |
| Larven – Pilzpatch | Larven - Trichilium |
| Larven – Trichome | MKs - Trichome |
| Pilzpatch - Puppen | Pilzpatch - Trichilium |
| Pilzpatch - Trichome | Puppen - Trichilium |
| Puppen - Trichome | Trichilium - Trichome |

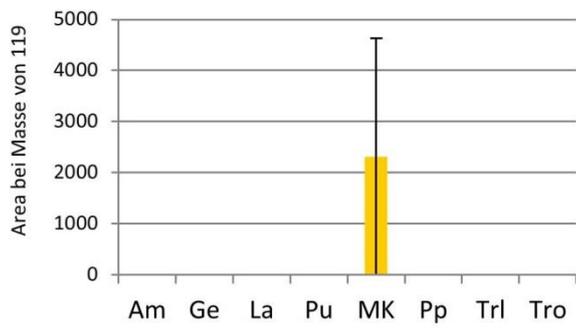
Decanoic acid



Decanoic acid

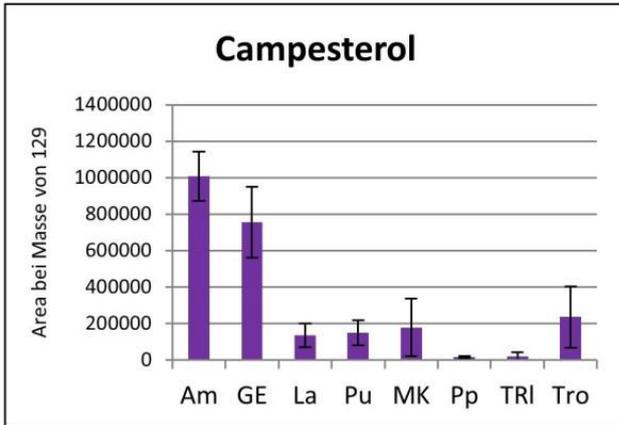
Ameise - Geschlechtstiere
Ameisen – Pilzpatch
Geschlechtstiere – Pilzpatch
Geschlechtstiere – Trichilium
Pilzpatch – Trichome
Trichilium - Trichome

Hexanoic acid

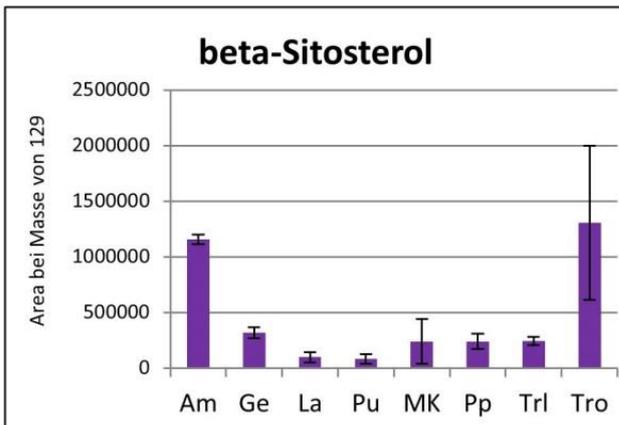


Hexanoic acid

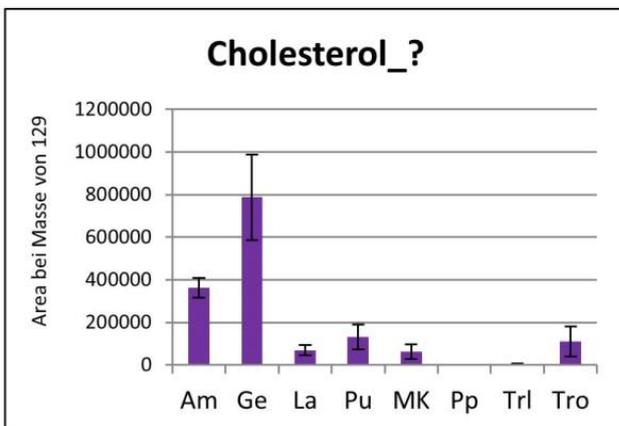
-



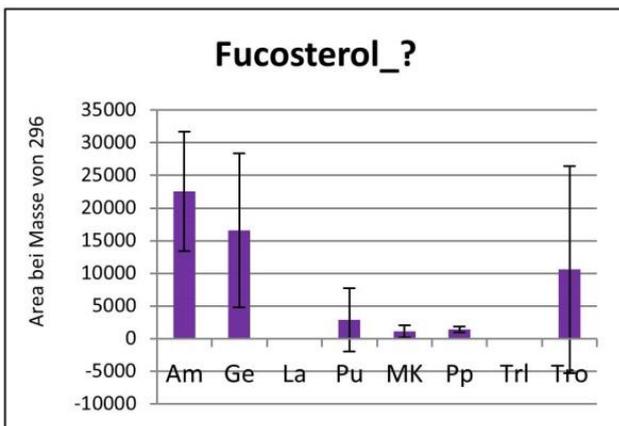
- ### Campesterol
- Ameisen-Larven
 - Ameisen-MKs
 - Ameisen-Pilzpatch
 - Ameisen-Puppen
 - Ameisen-Trichilium
 - Ameisen-Trichome
 - Geschlechtstiere-Larven
 - Geschlechtstiere-Pilzpatch
 - Geschlechtstiere-Puppen



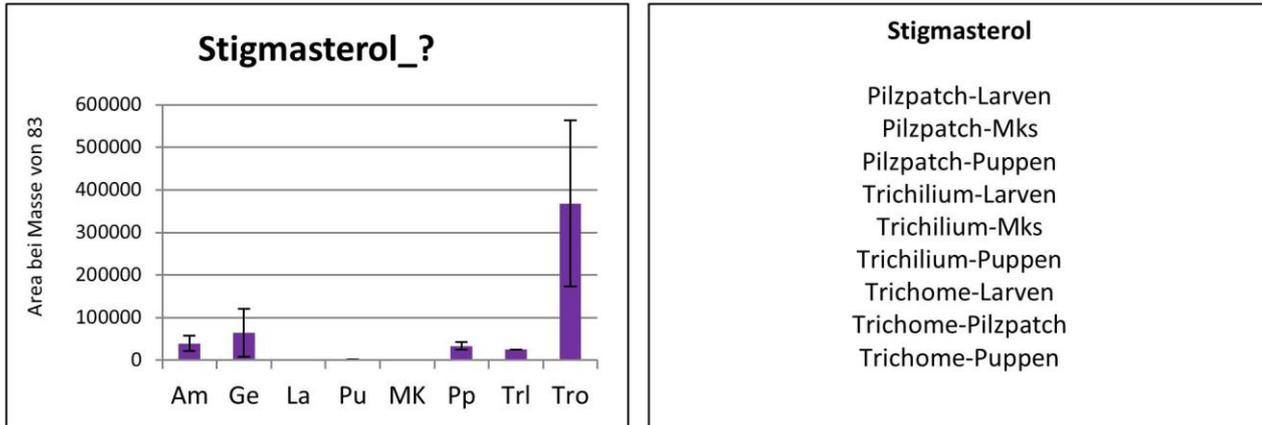
- ### beta-Stiosterol
- Ameisen-Geschlechtstiere
 - Ameisen-Larven
 - Ameisen-MKs
 - Ameisen-Pilzpatch
 - Ameisen-Trichilium
 - Geschlechtstiere-Larven
 - Geschlechtstiere-Puppen
 - Larven-Trichome
 - Puppen-Trichome



- ### Cholesterol_?
- Ameisen-Larven
 - Ameisen-MKs
 - Ameisen-Pilzpatch
 - Ameisen-Puppen
 - Ameisen-Trichilium
 - Ameisen-Trichome
 - Geschlechtst.-Larven
 - Geschlechtst.-Mks
 - Geschlechtst.-Pilzpatch
 - Geschlechtst.-Puppen
 - Larven-Pilzpatch



- ### Fucosterol_?
- Ameisen-Larven
 - Ameisen-Mks
 - Ameisen-Pilzpatch
 - Ameisen-Puppen
 - Ameisen-Trichilium
 - Larven-Mks
 - Larven-Pilzpatch
 - Larven-Trichome
 - Geschlechtst.-Larven
 - Geschlechtst.-MKs
 - eschlechtst.- Pilzpatch
 - Geschlechtst.- Puppen
 - Pilzpatch-Trichilium



Stigmasterol

- Pilzpatch-Larven
- Pilzpatch-Mks
- Pilzpatch-Puppen
- Trichilium-Larven
- Trichilium-Mks
- Trichilium-Puppen
- Trichome-Larven
- Trichome-Pilzpatch
- Trichome-Puppen

Fig. Anhang. 6: Substanzen in den Geweben

Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweils festgelegten Masse einer Substanz (pro Gewebe). Fehlerbalken wurden aufgrund der hohen Schwankungen durch geringe Probenanzahl mit $\pm \text{STABW}/\text{Wurzel}(\text{Anzahl})$ berechnet. In der y-Achse sind die Areawerte der jeweils berechneten Masse verzeichnet. Hohe Werte sind noch kein Beleg für ein überproportionales Auftreten der Substanz in den Geweben, können aber oft einen Trend verdeutlichen. Im Feld rechts neben der Grafik finden sich sämtliche Gewebe, die sich voneinander signifikant (0.95%) unterscheiden. Dargestellt wurden Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fettsäuren und Sterole.

Am= Ameisen (Arbeiterinnen), **Ge**= Geschlechtstiere, **La**= Larven, **Pu**= Puppen, **MK**= Müllersche Körperchen, **Pp**= Pilzpatch, **Trl**= Trichilium, **Tro**= Trichome.

8 Danksagung

Ich möchte mich besonders bei meiner Diplombetreuerin Dr. Veronika Mayer bedanken, ohne die diese Untersuchung nicht zustande gekommen wäre. Sie hat sich stets meiner Fragen angenommen und durch ihr Fachwissen und ihre Kritik dem Forschungsansatz und der vorliegenden Arbeit die richtige Form gegeben. Zudem hat sie immer den Überblick über das große Ganze gewahrt und mich trotzdem auf detaillierte Unklarheiten oder aufgeworfene Fragen aufmerksam gemacht. Sie hat stets große Bereitschaft gezeigt mich in meiner Forschungstätigkeit zu unterstützen und mich bei der Überarbeitung meiner Diplomarbeit intensiv betreut.

Sehr großer Dank geht aber auch an Mag. Lena Fagner, die mich mit einer unglaublichen Geduld unterstützte und stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatte. Sie hat mich bei der chemischen Analyse über Monate hin betreut und mir mit ihrem großen praktischen Wissen bei unzähligen Arbeitsschritten und auftretenden Schwierigkeiten unter die Arme gegriffen. Ohne diese intensive und herzliche Betreuung wäre ein Großteil dieser Arbeit nicht verwirklicht gewesen.

Ich möchte mich auch beim Institut MOSYS und besonders bei Prof. Wolfram Weckwerth bedanken, der mir ermöglichte, die Infrastruktur dieser Abteilung über Monate hinweg zu nutzen. Mein Dank gebührt aber auch dem gesamten Team dieser Abteilung, die mich oft bei praktischen Angelegenheiten unterstützten und sich für ein angenehmes Arbeitsklima verantwortlich zeigten. Großer Dank gebührt auch Lisa Haberl, die mir nicht nur bei der Statistik geholfen hat, sondern in der gesamten Zeit meiner chemischen Analyse und natürlich darüber hinaus eine großartige Freundin war und ist.

Ich möchte mich aber auch herzlich beim Department für Strukturelle und Funktionelle Botanik bedanken, die mich ebenso freundlich unterstützten. Besonders bedanken möchte ich mich bei Mag. Susanne Pamperl, die für mich die CT-Untersuchung durchgeführt hat und so die fantastischen Aufnahmen ermöglicht hat, bei Mag. Susanne Sontag, die stets versuchte mir zu helfen, und bei Perica Brodaric, der die Beleuchtungsanlage entwickelte, die bei den ethologischen Untersuchungen zum Einsatz kam.

Danke auch an Dr. Axel Mithöfer vom Max Planck Institut für Chemische Ökologie, Jena, der mich bei einigen Fragen mit kompetenter Beratung unterstützte.

Ein großer Dank geht auch an das gesamte Team der Tropenstation La Gamba in Costa Rica, das ermöglichte, dass ich meine Forschung wohlgenährt und umsorgt durchführen konnte. Ich möchte mich für die Möglichkeit, an diesem einmaligen Ort meine Untersuchungen nachgehen zu können,

herzlich bei allen Beteiligten bedanken. Danke auch an Roy Sánchez Jiménez der mir bei der Suche nach ausgewachsenen *Cecropia*-Bäumen behilflich war und mir bei der mühsamen Ernte der Äste zu Seite stand. Danke auch an Simon Tesar, der mir bei den ethologischen Untersuchungen behilflich war und mir teilweise auch beim schweißtreibenden Abschneiden der Äste zur Seite gestanden ist. Ich möchte mich auch bei der Universität Wien für die finanzielle Unterstützung meiner Untersuchung durch ein KWA-Stipendium bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Freund Tom, der mich bei jedem EDV-Problem ebenso grantig wie kompetent unterstützte. Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie. Ohne die Unterstützung meiner Eltern wäre es mir nicht möglich gewesen, meine Ausbildung zu absolvieren. Sie haben mich nicht nur für Literatur und die Natur begeistert, sondern sind für mich ein großes Vorbild in vielen Lebensbereichen. Danke auch an meine wunderbare Schwester, die immer für ihren kleinen Bruder da ist.

Der größte Dank gebührt Katrin Friedl, ohne die diese Untersuchung niemals zustande gekommen wäre. Sie hat unzählige Male mit mir offene Fragen diskutiert, mich beim Erstellen der wunderschönen Schnitte maßgeblich unterstützt und mit mir gemeinsam die vorliegende Arbeit wieder und wieder überarbeitet. Ohne ihren ständigen Beistand und Rückhalt hätte diese Arbeit nicht fertiggestellt werden können. Danke!

9 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Klaus Kaltenbrunner
Geboren am: 15.05.1988, in Wels
Nationalität: Österreich
Email-Adresse: klaus_kaltenbrunner@hotmail.com



Schulbildung

1994-1998: Besuch der Volksschule Lichtenegg in Wels
Sept. 1998- Mai 2006: Besuch des BG/BRG Anton-Brucknerstraße Wels (Naturwissenschaftlicher Schwerpunkt)
Juni 2006: Schulabschluss mit Matura mit gutem Erfolg

Zivildienst

Okt.2006- Juni 2007 Zivildienst in einer betreuten Wohnform (*Jugendfamilie*) im sozialpädagogischen Jugendwohnheim Linz (Wegscheid)

Studium

Okt. 2007 Beginn des Lehramtsstudiums an der Universität Wien (Deutsch und Biologie und Umweltkunde)
April 2010 Abschluss des 1. Studienabschnitts
Mai 2013 Beginn Diplomarbeit (verbunden mit einmonatiger Forschungstätigkeit in Costa Rica)