

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Myrmekochorie - evoluční a ekologické souvislosti

Diplomová práce

Bc. Marie Konečná

Školitel: Prof. RNDr. Jan Lepš, CSc.

České Budějovice 2015

Konečná M. (2015): Myrmekochorie - evoluční a ekologické souvislosti [Myrmecochory – evolutionary and ecological context. Mgr. Thesis, in English and Czech] – 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Various aspects of myrmecochory were investigated. Effect of different storage methods on attractiveness of seeds with elaiosomes for ants was examined. Viable seed bank of refuse piles (places where ants deposit unused objects from ant nests, e.g. seeds after the elaiosome was eaten) and places outside them were compared. Chemical content of five major chemical groups, specifically amino acids, free fatty acids, organic acids, polyols and sugars, of elaiosomes and seeds of selected species was determined, and compared with respect to their taxonomic relatedness.

Práce byla podporována GAJU 04-107/2013/P a SGA.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 20. 4. 2015

.....

Marie Konečná

Děkuji ...

- ... Šuspovi za obří trpělivost při mém soustavném zmatkování a při čtení magisterky, podle jeho slov barevné jako kraslice, (což doufám nezpůsobilo nikomu trauma) a za zásoby čerstvých vtipů ve chvílích statistické beznaděje a dvousemestrové trudomyslnosti,
- ... chemikům (jmenovitě Martin Moos, Petr Šimek a Helena Zahradníčková) za zpracování vzorků a velkou trpělivost s mým analfabetismem v oblasti chemických analýz,
- ... Pavlu Pechovi za konzultaci z pohledu mravenčího,
- ... Alešovi Tomčalovi za konzultaci z pohledu chemicko-biologického,
- ... Peťovi Blažkovi za konzultaci statistiky,
- ... Áje Vítové za morální podporu, opravu a konzultaci barevného textu,
- ... Jirkovi Tůmovi za nápad s „cvrčkovou metodou“ při odhalování smet'áčků, po té co všechny ostatní návnady na mravence selhaly,
- ... mamce nejen za morální podporu, ale i za pomoc při zakládání pokusů a hrdinné stříhání živých cvrčků s omluvou za trvalé trauma,
- ... Dendimu a Ádovi za pomoc při terénních experimentech – časomíru při odnosech, hledání smet'áčků,
- ... citronovým sušenkám, že jsem přežila nejméně 50 hodin řezání elaiosomů,
- ... všem, co přežili mé panikaření při vzniku této práce, či mi jakkoli pomohli (hlavně Jítce, Jítě a Terce).

Obsah

Předmluva.....	1
I Terénní experimenty	2
1. Úvod.....	2
1.1 Průběh myrmekochorie.....	2
1.2 Zachování atraktivity semen pro mravence.....	4
1.3 Odkladiště jako možná vhodná místa pro klíčení semenáčů.....	5
2. Cíle práce.....	7
3. Metodika.....	8
3.1 Uspořádání pokusů.....	8
3.1.1 Zachování atraktivity semen pro mravence.....	8
3.1.2 Odkladiště jako možná vhodná místa pro klíčení semenáčů.....	8
3.2 Statistické zpracování.....	9
3.2.1 Použitý statistický software.....	9
3.2.2 Zachování atraktivity semen pro mravence.....	9
3.2.3 Odkladiště jako možná vhodná místa pro klíčení semenáčů.....	9
4. Výsledky.....	10
4.1 Zachování atraktivity semen pro mravence.....	10
4.2 Odkladiště jako možná vhodná místa pro klíčení semenáčů.....	10
5. Diskuse.....	13
5.1 Zachování atraktivity semen pro mravence.....	13
5.2 Odkladiště jako možná vhodná místa pro klíčení semenáčů.....	14
6. Závěr.....	18
7. Literatura.....	19
8. Přílohy.....	22
II Attractivity of elaiosomes for ants, their chemical composition and phylogenetic differences	25
1. Introduction.....	26
2. Materials and methods.....	29
2.1 Selected species, diaspore collection and storage.....	29
2.2 Chemical analysis.....	33
2.3 Statistical analysis.....	34
2.3.1 Composition of major chemical groups.....	34
2.3.2 Interaction genus*part.....	35
2.3.3 Individual chemical compounds – hierarchical decomposition.....	35
2.3.3.1 Diaspore.....	35

2.3.3.2	Elaiosome	35
3.	Results	37
3.1	Composition of major chemical groups.....	37
3.1.1	Amino acids	38
3.1.2	Free fatty acids.....	39
3.1.3	Organic acids	40
3.1.4	Polyols	40
3.1.5	Sugars	41
3.2	Interaction genus*part	42
3.3	Individual chemical compounds – hierarchical decomposition	43
3.3.1	Diaspore.....	43
3.3.2	Elaiosome	45
3.3.3	Diaspore parts	46
3.	Discussion	48
4.1	Composition of major chemical groups.....	48
4.2	Interaction genus*part	49
4.3	Individual chemical compounds – hierarchical decomposition	49
4.3.1	Diaspore.....	49
4.3.2	Elaiosome	50
4.3.3	Family	50
4.3.4	Genus	50
4.3.5	Populations	51
4.3.5	Diaspore parts	51
4.3.5.1	Amino acids	52
4.3.5.2	Free fatty acids	52
4.3.5.3	Organic acids.....	53
4.3.5.4	Polyols.....	53
4.3.5.5	Sacharids	53
	References	55
	Appendix	58

Předmluva

Tato magisterská práce je tvořena dvěma samostatnými částmi. První kapitola je zaměřena na dva terénní experimenty. V prvním jsem se věnovala počáteční fázi myrmekochorie, tedy interakci mravenců se semeny, kdy zjišťují jejich atraktivitu. V tomto odnosovém pokusu byla mravencům nabízena různými způsoby skladovaná semena a poté porovnávána jejich atraktivita. Ve druhém terénním experimentu jsem se zaměřila na poslední fázi roznosu semen mravenci, tedy umístění semen na konečné odkladiště, místo, kde myrmekochorní rostliny také pravděpodobně vyklíčí, a jeho semennou banku. Druhá část této diplomové práce pojednává o chemickém složení elaiosomů a semen vybraných druhů myrmekochorních rostlin. Tato část je manuskriptem připravovaného vědeckého článku, proto je psána anglicky. Text nebyl dosud revidován budoucími spoluautory z Laboratoře analytické biochemie a metaboliky Biologického centra AV ČR, kteří vzorky analyzovali; jsou to Martin Moos, Petr Šimek a Helena Zahradníčková.

I Terénní experimenty

1. Úvod

1.1 Průběh myrmekochorie

Myrmekochorie je typ šíření rostlin zprostředkovaný mravenci a zároveň typ mutualismu. Mravenci za roznoš semen myrmekochorních rostlin získají výživný elaiosom (Sernander 1906), což je atraktivní část diaspory tzv. specializovaných myrmekochorních rostlin (Gorb & Gorb 2003). Tyto rostliny mohou používat k šíření výlučně myrmekochorii či být specializovány ještě na některý další typ šíření semen. Rostliny, které využívají více typů šíření semen, můžeme také nazývat diplochorní; myrmekochorie se může vyskytovat v kombinaci s anemochorií, endozochorií či balochorií. (Sernander 1906, Vander Wall & Longland 2004).

Celou diasporu specializovaných myrmekochorních rostlin přenesou dělnice mutualistických mravenců do mraveniště, kde elaiosom slouží jako potrava přednostně larvám (Gammans & Bullock 2005, Fischer et al. 2005, Fokuhl et al. 2012). Poté je manipulací neporušené semeno (už bez elaiosomu) odloženo společně s dalším nepotřebným materiálem na odkladiště v mraveništi či mimo ně, kde pravděpodobně také vyklíčí (Gómez & Espadaler 1998). Takto vypadá průběh odnosu u mutualistických dvojic druhů myrmekochorních rostlin se semeny, na nichž jsou přítomny elaiosomy a všežravých, dravých či fungivorních mravenců (Gammans et al. 2006, Hughes et al. 1994, Christianini et al. 2012). Autoři Carroll & Janzen (1973) navrhuje, že jsou elaiosomy z hlediska vyhledávání potravy mravenci analogií mrtvého hmyzu. Navíc některé látky v elaiosomech obsažené, např. kyselina olejová, je hlavní složkou hemolymfy hmyzu (Hughes et al. 1994), a současně je nejčastěji zmiňovaná jako spouštěč odnosu semen mravenci (Boulay et al. 2006, Pfeiffer et al. 2010). Elaiosomy by měly být tedy pro mravence důležité především v době nedostatku hmyzu, mnoho myrmekochorních rostlin plodí brzy na jaře – kvetou v průměru o 7,1 týdne dříve než nemymekochorní rostliny (Oberrath & Böhning-Gaese 2002). Elaiosomy pravděpodobně hrají důležitou roli v životním cyklu mravenců, a to hlavně během růstu larev. Pro larvy jsou více atraktivní elaiosomy než výživově optimalizovaná umělá strava Bhatkar (Fischer et al. 2005).

Mravenci i rostliny se však mohou chovat také jako „vykořisťovatelé“. Mezi ně patří na jedné straně semenožraví mravenci, na druhé straně např. rostliny bez vyvinutého

elaiosomu, pouze s chemickými atraktanty např. *Anemone nemorosa*¹ (Pfeiffer et al. 2010, Bresinsky 2014). Podíl semen úspěšně rozšířených od mateřské rostliny závisí podle studie Gorb et al. (2000) na každé ze tří fází myrmekochorie – (1) výběr atraktivních semen mravenci a následný odnos (*removal*), (2) vlastní přenos semen (*transport*) a (3) sekundární odnos, tedy odnos na konečné odkladiště (*secondary relocation*). Autoři studie Prior et al. (2014) dodávají, že další důležitou fází je ta nejméně prostudovaná – manipulace se semenem v mraveništi (*handling*).

(1) Semena různých druhů myrmekochorních rostlin jsou pro mravence různou měrou atraktivní (Sernander 1906, Oostermeijer 1989, Chlumský et al. 2013). Není ale dosud jasné, jakým způsobem mravenci získávají informaci o atraktivitě semen, a tento způsob se pravděpodobně liší i mezi jednotlivými druhy. Někteří mravenci se orientují v prostoru spíše zrakem (Carroll & Janzen 1973), některé druhy především pomocí čichu, ale bez použití zraku (Bresinsky 2014). Kjellsson (1985) však uvádí, že ani zrak ani čich nebyly u mravenců druhu *Myrmica ruginodis* dostačující a k lokalizaci diaspor potřebovali přímý kontakt tykadla se semenem.

(2) Semena myrmekochorních rostlin jsou při přenosu do mraveniště také s rozdílnou četností mravenci upouštěna (Gorb & Gorb 1999), opětovný odnos zvláště malých semen se odehrává s nízkou frekvencí. Tím se sice zmenšuje vzdálenost od mateřské rostliny, na druhé straně je tímto způsobem zamezováno shlukování semen na odkladištích (Gorb et al. 2000). Častěji dochází např. ke ztrátě malých semen diplochorních rostlin (v 20% – 100% případů) naopak semena obligátních myrmekochorních rostlin jsou ztracena méně (8 – 10 %) a jsou často donesena až do mraveniště (Gorb & Gorb 1999). Autoři studie Leal et al. (2014) definovali dvě kategorie mravenců, a to „kvalitní roznašeč“ (v jejich studii druhy rodu *Camponotus*, *Dinoponera* a *Ectatomma*) a „nekvalitní roznašeč“ (druhy rodu *Dorymyrmex*, *Pheidole* a *Solenopsis*). „Kvalitní roznašeči“ se nekrmili na elaiosomech přímo na místě nalezení semena, semena odnášeli rychle do mraveniště a urazili se semeny téměř 20 krát delší vzdálenost než „nekvalitní roznašeči“. Četnost úspěšného přenosu diaspor do mraveniště se mezi těmito dvěma skupinami velmi lišila, „kvalitní roznašeči“ přenesli 78 % z nabízených semen přímo do mraveniště, naproti tomu nekvalitní roznašeči pouze 12 %.

¹ Nomenklatura druhů rostlin byla sjednocena podle Seznamu cévnatých rostlin květeny České republiky (Daníhelka et al. 2012).

(3) Diaspory bývají odneseny do chodeb k larvám, např. u druhu *Temnothorax crassispinus* tomu bylo v 50 % případů, či jiných částí mraveniště (Fokuhl et al. 2012). Chodbičky larev se nacházejí v hlubších částech mraveniště, např. u druhu *Ectatomma brunneum* v hloubce mezi 14 – 40 cm (Renard et al. 2010, Francie). Doba, která uběhne od přinesení semene do mraveniště do odstranění elaiiosomu se u různých druhů mravenců liší. Kratší doba byla pozorována u masožravých mravenců *Myrmica rubra*, kdy byly všechny elaiiosomy odstraněny do 2 hodin. Oproti tomu druh *Lasius niger*, který chová mšice, oddělil za 6 hodin pouze 3,3 % elaiiosomů ze stejného množství semen (Servigne & Detrain 2010). Část elaiiosomů však zkonzumují i dospělci – dělnice, ty poté semeno odnesou na konečné odkladiště (Gammans & Bullock 2005). Dále se liší mezi druhy mravenců též doba, po kterou je diaspora přítomna v mraveništi, pokud se konečné odkladiště nachází mimo mraveniště. Doba od dopravení diaspor do hnízda, přes odstranění elaiiosomu a k jejich vynesení z mraveniště na povrch byla změřena např. u druhu *Viola odorata* (132 min), *Chelidonium majus* (22 min) (Fischer et al. 2005, Servigne & Detrain 2010, Prior et al. 2014).

1.2 Zachování atraktivity semen pro mravence

Odnosové experimenty jsou prováděny převážně za účelem porovnání atraktivity semen různých druhů (Sernander 1906, Martins et al. 2006, Chlumský et al. 2013) či dokázání, že elaiiosom je pro mravence atraktivní částí diaspory myrmekochorních rostlin – nabízení celých diaspor a semen s oddělenými elaiiosomy (Sernander 1906, Konečná 2012). Atraktivitu elaiiosomů dokazují též autoři Espadaler & Gómez (1997). Uvádějí, že 67,6 % mravenců, kteří objevili semeno druhu *Euphorbia characias* ho také odnesli. Nicméně u semen bez elaiiosomu byla četnost odnosu pouze 9 %. Kjellsson (1985) navrhuje, že je četnost odnosu (*removal rate*) může být ovlivněna např. akutní potřebou potravy, stádiem životního cyklu, vzdáleností od zdroje potravy či atraktivitou diaspor. Atraktivita semen se po uvolnění rostlinou u tzv. měkkých elaiiosomů častých v mezických biotopech teploty rychle snižuje (Mark & Olesen 1996, Servigne & Detrain 2009). Autoři Mark & Olesen (1996) porovnávali odnos semen čerstvých a těch, která byla po 2 dny ponechaná samovolně vysychat, ve většině případů byla odnášena rychleji semena čerstvá. Je otázkou, zda atraktivita semen souvisí přímo s množstvím obsažené vody v elaiiosomech či ne. Servigne & Detrain (2009) pozorovali snižující se atraktivitu semen druhu *Chelidonium majus* i po stabilizování jejich váhy. Rychlost vysychání se liší mezi druhy myrmekochorních rostlin (Servigne & Detrain 2009) a různými habitaty – rychlejší vysychání bylo pozorováno na

louce než v lese (Guitián et al. 2003). Autoři Servigne & Detrain (2009) uvádějí, že ztráta vody dosáhla přibližně jedné třetiny váhy semen během 24 hodin u obou studovaných druhů *Viola odorata* a *Chelidonium majus*. Nicméně pouze u druhu *Chelidonium majus* vysychání pokračovalo dále a váha se stabilizovala po dalších 24 hodinách vysychání. Ačkoliv jsou pro mravence nejatraktivnější semena čerstvá, pro odnosové pokusy či jiné další analýzy je potřeba semena skladovat. Je tedy potřeba brát v potaz, že tzv. měkké elaiosomy, které se v mírném pásu vyskytují nejčastěji (Mayer et al. 2005), vysychají a mění strukturu (Servigne & Detrain 2009). Způsoby uchovávání těchto semen před pokusy mohou být např. mražení, uchování v lednici, usušení a případná opětovná rehydratace. Poslední zmiňovaná metoda by se mohla jevit jako ideální vzhledem k výsledkům studie Servigne & Detrain (2009). Autoři porovnávali atraktivitu čerstvých semen a těch ponechaných před pokusem vyschnout a poté po dobu 18 hodin rehydratovat. U druhu *Chelidonium majus*, byla atraktivita semen po rehydrataci zcela obnovena a u druhu *Viola odorata* z velké části také. Pilotní pokus však naznačoval, že tomu tak nemusí být u všech druhů, např. u *Potentilla erecta*, vyskytujícího se na zkoumané lokalitě Ohrazení² (vlastní pozorování 2013). Semena rehydratovaná byla odnášena s výrazně menší četností než semena čerstvá. Dalším důvodem pro zkoumání vlivu různých typů skladování na atraktivitu semen bylo zjišťování chemického obsahu diaspor, které bylo prováděno v rámci této magisterské práce. Diaspory myrmekochorních rostlin byly pro tuto analýzu skladovány pomocí mražení. Zjišťovali jsme tedy, zda takto uskladněná semena budou nadále mravenci odnášena a neztrácí pro ně atraktivní látky.

1.3 Odkladiště jako možná vhodná místa pro klíčení semenáčů

Poté, co je elaiosom odstraněn a zužitkován mravenci, může docházet k tzv. sekundárnímu odnosu, tedy k vynesení semen na konečné odkladiště. Pokud k němu nedojde, nemusí být semeno v hloubce mraveniště, kde se nacházejí larvy, schopné vyklíčit. Semena manioku (*Manihot esculenta*) byla schopná klíčit pouze do 13,8 cm hloubky, což bylo nad úroveň chodeb s larvami (Renard et al. 2010). Umístění tohoto konečného odkladiště („garbage dumps, refuse piles“) se mezi druhy mravenců liší. Může se nacházet uvnitř mraveniště, blíže k povrchu než jsou komůrky s larvami (Renard et al. 2010), mimo mraveniště při jeho okraji (Mark & Olesen 1996), či na okraji teritoria (Gorb et al. 2000). Proces sekundárního odnosu byl detailně sledován například u mravenců druhu *Aphaenogaster rudis* v Severní Americe, jimiž bylo zpět na povrch z mraveniště odneseno v různých mraveništích od 26.5 % do 98 %

² Ohrazení je vlhká oligotrofní louka patřící do svazu *Molinion* s prvky svazu *Violion*. Lokalita leží 10 km jihovýchodně od Českých Budějovic v blízkosti obce Ohrazení (48°57' s. š. 14°36' v. d.; 510 m n. m). Na lokalitě probíhá řada souvisejících pokusů zkoumajících ekologii lučních společenstev.

celkového počtu sesbíraných semen s průměrnou vzdáleností 51.5 cm od mraveniště (Canner et al. 2012; *Hexastylis arifolia* a *Asarum canadense*). Naproti tomu Kjellsson (1985) zaznamenal pouze 16 – 20 % semen druhu *Carex pilulifera* opětovně vynesných z mraveniště převážně mravencem *Myrmica ruginodis*.

Konečná odkladiště jsou uváděna jako místa vhodná pro klíčení (Levey et al. 1993). Výhody těchto míst, jsou především následující: lepší světelné podmínky (Dean et al. 1997) a živinami bohatší substrát (Culver & Beattie 1987). Další výhodou má být snížení kompetice, a to jak s nemyrmekochorními rostlinami (Handel 1978), tak kompetici vnitrodruhovou (Beattie 1985), a to s vlastní mateřskou rostlinou (*parent-offspring competition*) (Andersen 1988, Prior et al. 2014) i mezi „sourozeneckými“ semenáčky (Canner et al. 2012). Oproti mnoha jiným typům šíření semen jsou semena myrmekochorních rostlin přemístěna přesně na vhodná místa ke klíčení (*direct dispersal*) (Hanzawa et al. 1988). Klíčivost semen navíc může být u některých druhů rostlin odstraněním elaiosomu mravenci zvýšena (Lobstein & Rockwood 1993; *Sanguinaria canadensis*, Martins et al. 2006; *Ricinus communis*). Na druhou stranu Lisci et al. (1996) uvádí, že přítomnost elaiosomu umožnila klíčení za sucha, které by semena bez elaiosomu nepřekonalala. Dále Prior et al. (2014) navrhuje, že odstranění elaiosomu klíčení neovlivňuje, pozorovali spíše pozitivní vliv příznivých podmínek mraveniště, rozdílný u různých druhů mravenců. Pokud jsou zde semena ponechána déle, vyklíčí častěji a dříve.

Studie, které se průběhem odnosů zabývají, byly převážně provedeny na trvalých mraveništích, kolonie takových druhů mohou vytrvat beze změny stanoviště i několik desítek let (King 1981; *Lasius flavus*). Některé druhy mravenců tvoří ale v lučném porostu nenápadná hnízda. Tyto kolonie jsou tvořeny centrálními mraveništi, vytrvávajícími pouze několik let a jsou místem zimování. Po dobu aktivních měsíců kolonie vytvoří ještě sezónní mraveniště pro pokrytí větší oblasti ke hledání potravy. Pouze mraveniště tohoto druhého typu se vyskytují na námi zvolené pokusné lokalitě Ohrazení, a patří především dominantnímu druhu *Myrmica scabrinodis*.

V roce 2011 byla na této lokalitě v rámci mé bakalářské práce zjištěna přítomnost odkladišť – míst v porostu vzdálených od mraveniště 5 – 30 cm (Příloha II a III). V této práci jsem se chtěla více zaměřit na zjištění přítomnosti těchto odkladišť a na jejich funkci, tj. do jaké míry jsou na ně skutečně odkládána semena myrmekochorních rostlin.

2. Cíle práce

- Porovnat atraktivitu semen s různým způsobem uskladnění pro mravence. Zjistit, který způsob skladování semen je vhodný pro zachování atraktivity diaspor. myrmekochorních rostlin s tzv. měkkými elaiosomy pro mravence?
- Liší se životaschopná semenná banka odkladišť a kontrolních plošek? Nachází se zde více životaschopných semen myrmekochorních rostlin?

3. Metodika

3.1 Uspořádání pokusů

3.1.1 Zachování atraktivity semen pro mravence

Dne 12. 7. 2014 byl na lokalitě Ohrazení proveden odnosový pokus, při kterém byl zjišťován vliv typu uskladnění semen na jejich atraktivitu pro mravence. Mravencům byla nabízena čerstvá, mražená a rehydratovaná semena druhu *Pedicularis sylvatica*. Část semen všivce byla sesbírána dne 16. 6. Jedna polovina z nich byla poté zamražena při -35°C . Druhá polovina byla ponechána samovolnému vysušení při pokojové teplotě do provedení experimentu (téměř měsíc) a před pokusem opětovně rehydratována po dobu čtrnácti hodin. Posledním typem byla čerstvá semena, která byla získána z tobolek přímo na lokalitě těsně před pokusem. Experiment sestával z třiceti korkových kartiček (6 x 6 cm) umístěných v pravidelné čtvercové síti, nejbližší kartičky byly vzdáleny od sebe 3 m. Na každé kartičce bylo shlukovitě umístěno po 10 semenech od každého ze tří typů uskladnění v pevně stanoveném prostorovém uspořádání (Příloha I). Pokus byl započat v 10:30 a po 7 minutách přítomnosti na kartičkách byla spočítána zbylá semena.

3.1.2 Odkladiště jako možná vhodná místa pro klíčení semenáčů

V tomto pokuse byl zjišťován případný rozdíl v semenné bance mravenčích odkladišť, nacházejících se mimo mraveniště a kontrolních plošek. Mravenčí odkladiště byla pro tento pokus na lokalitě Ohrazení vyhledána v roce 2013. Jejich hledání probíhalo pomocí částí cvrčků nabarvených oranžově (lakem na nehty), které byly mravencům nabízeny na kartičkách (Příloha IV). Místa v porostu, kam byly nestravitelné části cvrčků mravenci odloženy, byla stanovena jako odkladiště. Dne 4. 10. 2013 bylo odebráno 25 párově umístěných půdních vzorků odkladišť a odpovídajících kontrolních plošek 10 cm vzdálených od okraje odkladiště. Vzorky půdy byly odebrány do hloubky 1,5 cm půdní sondou o vnitřním průměru 5 cm (objem vzorku $29,4\text{ cm}^3$). Vzorky půdy byly nejprve vysušeny při pokojové teplotě a poté dány do mrazicího boxu, kde proběhl chilling při -21°C po dobu šesti týdnů.

Po skončení mrazové stratifikace (4. 2. 2014) byl za účelem zjištění životaschopné semenné banky založen pokus v klimaboxu se stálou teplotou 19°C . Při pokusu se postupovalo dle instrukcí pro zjištění životaschopné semenné banky *Leda TraitBase* (Knevel et al. 2003). Půdní vzorky byly homogenizovány v kádince s vodou a poté rovnoměrně rozprostřeny na sterilní písek (sušárna – 2 hod, 100°C) v pěstebních nádobách. Semenáčky byly průběžně určovány a vytrhávány, aby nebraly živiny dalším rostlinám a nestínily jim, při vytrhávání

nedocházelo k odstraňování půdního vzorku z misek. Pokus byl ukončen dne 12. 9., trávy a ostřice, které nebylo možné do té doby určit, byly přesazeny a dopěstovány do určitého stádia. Determinace ostřic probíhala pomocí řezů listů podle diplomové práce Tadeáše Štěrbý (2012) a byla jím revidována.

3.2 Statistické zpracování

3.2.1 Použitý statistický software

Jednorozměrné metody byly provedeny v programu Statistica 12 (StatSoft 2013). Použité mnohorozměrné gradientové analýzy byly provedeny v programu Canoco for Windows 5.0 (ter Braak & Šmilauer 2012).

3.2.2 Zachování atraktivity semen pro mravence

Pokus zkoumající vliv uskladnění semen na atraktivitu pro mravence byl vyhodnocen pomocí dvoucestné ANOVy. Závislá proměnná byly počty odnesených semen, kategoriální prediktory pak bylo číslo kartičky (1 – 30) a typ uskladnění semen – čerstvá, mražená či rehydratovaná. Proměnná číslo kartičky byla použita jako faktor s náhodným efektem. Původní počet semen od každého skladovacího typu na kartičkách byl roven 10. Na konci pokusu se počet odnesených semen pohyboval mezi 0 – 10, krajní hodnoty byly poměrně časté, rozdělení není tedy blízké normálnímu. Proto byla použita arcsinová transformace podle vzorce $P' = \text{Arcsin}(\sqrt{n/10})$, kdy n je počet odnesených semen mravenci. Dále byl použit na ANOVu navazující post-hoc test Tukey, díky němuž bylo zjištěno, které typy uskladnění se od sebe průkazně liší počtem odnesených semen mravenci.

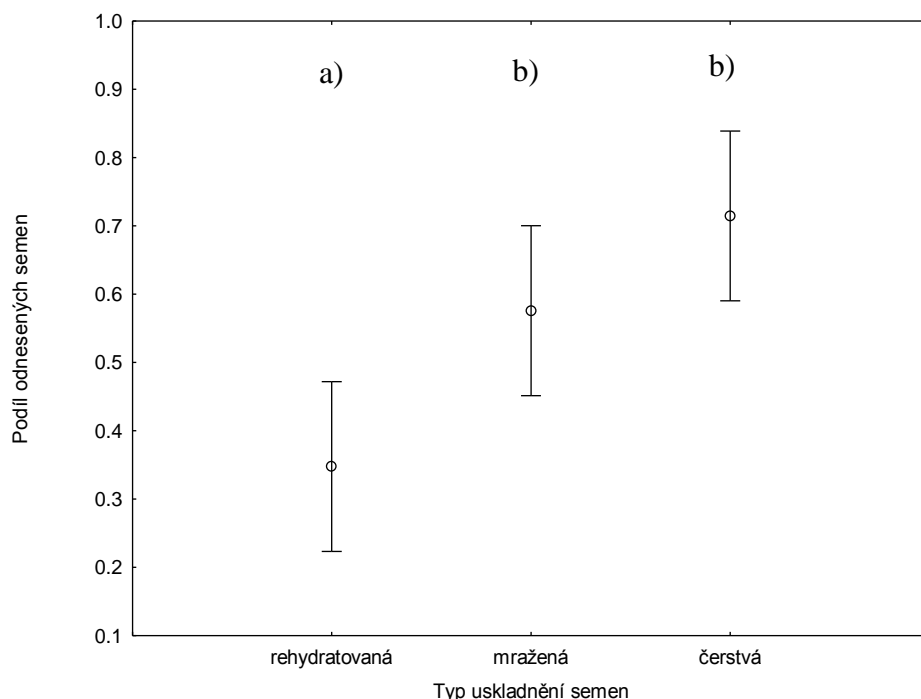
3.2.3 Odkladiště jako možná vhodná místa pro klíčení semenáčů

Rozdíly v druhovém složení mezi životaschopnou semennou bankou odkladišť a odpovídajících kontrolních půdních vzorků byly testovány přímou gradientovou analýzou RDA (Šmilauer & Lepš 2014). Jako kategoriální vysvětlující proměnná byla použita příslušnost k umístění půdního vzorku na odkladišti (O) či mimo něj – kontrola (K) a jako kovariáta číslo páru vzorků (1 – 25). Proběhla logaritmická transformace počtů vyklíčených semenáčků podle vzorce $Y' = \log(Y+1)$ a dále centrování po druzích. Permutace byly omezeny kovariátou, tedy číslem páru vzorků. Tímto způsobem proběhly dvě oddělené analýzy, jedna pro celkové druhové složení, druhá pro myrmekochorní druhy rostlin.

4. Výsledky

4.1 Zachování atraktivity semen pro mravence

Nejčastěji byla odnášena semena čerstvá, s menší četností mražená a nejméně rehydratovaná. Mezi typy uskladnění byl zjištěn průkazný rozdíl ($F_{2,58} = 8,89$, $p = 0,0004$) (Tabulka 1) (Obr. 1). Avšak jak Tukeyho test ukázal, že rozdíl byl dán především rehydratovanými semeny, která se lišila průkazně od obou zbylých typů uskladnění, ty se ale mezi sebou průkazně nelišily (Obr. 1).



Obr. 1 Rozdíly v počtech odnesených semen transformovaných podle vzorce [$P' = \text{Arcsin}(\sqrt{n/10})$] v závislosti na typu uskladnění semen ($F_{2,58} = 8,89$, $p = 0,0004$), zobrazen LS means – least square, chybové úsečky zobrazují 95 % konfidenční interval. Písmena nad průměry jsou výsledkem Tukeyho testu – průměry, které nemají stejné písmeno, se statisticky průkazně liší ($P < 0,05$).

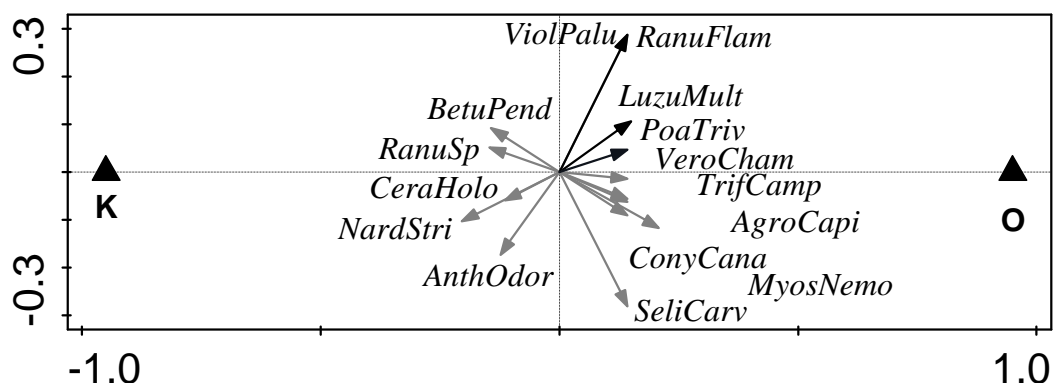
Tabulka 1. Výsledky ANOVy s Arcsinovou transformací testující rozdíl četností odnosu semen s různými způsoby uskladnění.

	SS	DF	MS	F	p
způsob uskladnění	2.05910	2	1.02955	8.89188	0.000428
kartička	8.27476	29	0.28534	2.46436	0.001743
chyba	6.71554	58	0.11579		

4.2 Odkladiště jako možná vhodná místa pro klíčení semenáčů

Životaschopnou semennou banku půdy odebrané z odkladišť a kontrolních plošek tvořilo 25 druhů rostlin (Tabulka 2). Celkem vyklíčilo 1560 jedinců rostlin, z nichž 834 z půdy odebrané z odkladišť a 726 z kontrolních plošek. Analýza RDA neprokázala rozdíl

mezi četnostmi životaschopných semen v semenné bance půdy odkladišť a okolní půdy ($F = 1,0$; $p = 0,408$; kanonická osa vysvětluje 4 % variability) (Obr. 2), obrázek tedy uvádím jen jako ilustraci trendů. V životaschopné semenné bance byly mimo jiné zastoupeny i 4 myrmekochorní druhy (*Luzula multiflora*, *Potentilla erecta*, *Viola palustre* a *Carex pilulifera*) z celkových 8 přítomných na Ohrazení. Rozdíl jejich výskytu v odkladištích a kontrolních ploškách nebyl rovněž průkazný ($F = 1,1$; $p = 0,288$; kanonická osa vysvětluje 4,47 %) (Obr. 3).

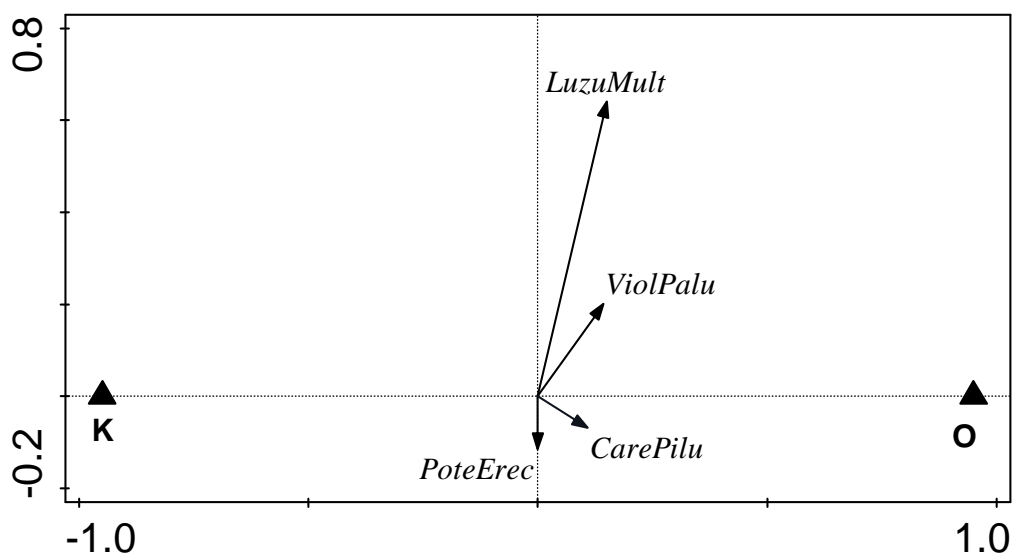


Obr. 2 Ordinační diagram RDA počtů semenáčků v závislosti na kategorii odkladiště (O) a kontrolní plošky (K). Rozdíl není průkazný ($F = 1,0$, $p = 0,408$; kanonická osa vysvětluje 4,002 % celkové variability). V grafu je znázorněno pouze 15 druhů nejlépe fitujících kanonickou osou.

Tabulka 2. Seznam druhů rostlin přítomných v životaschopné semenné bance odkladišť a kontrolních plošek se zkratkami druhů, které byly použité v grafu Obr. 2. a Obr. 3. Tučným písmem jsou znázorněny druhy myrmekochorní. Součty vyklíčených jedinců jednotlivých druhů rostlin přítomných v životaschopné.

druh rostliny	zkratka	počet životaschopných semen		
		odkladiště	kontrolní plošky	celkem
<i>Agrostis capillaris</i>	AgroCapi	1	0	1
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	AnthOdor	7	11	18
<i>Betula pendula</i>	BetuPend	0	1	1
<i>Carex ovalis</i>	CareOval	2	2	4
<i>Carex pilulifera</i>	CarePilu	3	1	4
<i>Cerastium holosteoides</i>	CeraHolo	2	5	7
<i>Conyza canadensis</i>	ConyCana	1	0	1
<i>Epilobium adenocaulon</i>	EpilAden	3	3	6
<i>Holcus lanatus</i>	HolcLana	3	3	6
<i>Juncus</i> sp.	Junc sp.	771	672	1443
<i>Luzula multiflora</i>	LuzuMulti	23	14	37
<i>Lychnis flos-cuculi</i>	LychFlos	1	2	3
<i>Molinia caerulea</i> agg.	MoliCaer	1	2	3

<i>Myosotis nemorosa</i>	MyosNemo	5	1	6
<i>Nardus stricta</i>	NardStri	0	2	2
<i>Poa pratensis</i>	PoaPrat	1	1	2
<i>Poa trivialis</i>	PoaTriv	1	0	1
<i>Potentilla erecta</i>	PoteErec	1	1	2
<i>Prunella vulgaris</i>	PrunVulg	2	2	4
<i>Ranunculus flammula</i>	RanuFlam	1	0	1
<i>Ranunculus sp.</i>	Ranu sp.	1	3	4
<i>Selinum carvifolia</i>	SeliCarv	1	0	1
<i>Trifolium campestre</i>	TrifCamp	1	0	1
<i>Veronica chamaedrys</i>	VeroChama	1	0	1
<i>Viola palustris</i>	ViolPalu	1	0	1



Obr. 3. Ordinační diagram RDA počtů semenáčků myrmekochorních rostlin v závislosti na kategorii odkladiště (O) a kontrolní plošky (K). Rozdíl není průkazný ($F = 1,1$; $p = 0,288$; kanonická osa vysvětluje 4,47 % celkové variability).

5. Diskuse

5.1 Zachování atraktivity semen pro mravence

Elaiosomy mezických habitatů temperátu jsou citlivější na ztrátu vody než elaiosomy rostlin z xerothermních biotopů, které jsou pevné a vytrvalé (Berg 1975) a současně i než semena k nim patřící (Servigne & Detrain 2009). Čerstvá semena většiny temperátních druhů jsou pro mravence atraktivnější než starší semena (Smith et al. 1986, Mark & Olesen 1996, Servigne & Detrain 2009). Servigne & Detrain (2009) dokumentovali průběh atraktivity elaiosomů v závislosti na čase od dozrání semene. Během prvních 24 hodin jejich atraktivita i úbytek váhy klesaly prudce, poté se pokles zmírnil. Autoři dále navrhuji ke na zdůvodnění důležitosti přítomnosti vody pro atraktivitu diaspor dvě nevylučující se hypotézy: (1) voda je rozpouštědlem pro látky spouštějící odnos mravenci, (2) voda dodává elaiosomu lepší konzistenci, která umožňuje dělnicím lepší manipulaci se semeny. Autoři dále uvádějí, že rehydratace (např. deštěm) může atraktivitu elaiosomů navracet.

Toto řešení však zřejmě nemůže fungovat zcela univerzálně. V mém odnosovém pokusu byla atraktivita semen *Pedicularis sylvatica* rehydratovaných po měsíci vysychání nejnižší (pouze $\frac{1}{5}$ odnesena) ze tří zvolených typů skladování a současně průkazně odlišná od čerstvých i mražených semen. Naopak mražená semena nebylo možné statisticky od čerstvých odlišit, přestože rozdíl byl poměrně velký, odnesena byla pouze přibližně $\frac{1}{3}$ rehydratovaných a $\frac{1}{2}$ čerstvých. Také v práci Servigne & Detrain (2010) byla pro mravence semena obou zkoumaných druhů (*Viola odorata* a *Chelidonium majus*) různě atraktivní i přes přibližně stejnou ztrátu vody. Zatímco u druhu *Chelidonium majus* nebyl zjištěn průkazný rozdíl v četnosti odnosu semen čerstvých a rehydratovaných po jednom měsíci vysychání, u druhu *Viola odorata* byla, podobně jako v našem experimentu, takto rehydratovaná semena nošena méně. Autoři se domnívají, že důvodem rozdílného odnášení po rehydrataci by mohl být různý obsah lipofilních látek v elaiosomech, které jsou méně náchylné k vysychání.

Tuto domněnku podporuje i chemického složení elaiosomů, neboť ty obsahují větší podíl méně stálých látek než semena, např. cukrů či polyolů (Fischer et al. 2008, druhá část této práce). Tyto nestabilní látky jsou meziprodukty, které se následnou katabolickou reakcí na vzduchu mění a způsobují to, že elaiosomy voní, čímž lákají tak mravence. Elaiosom tedy obsahuje větší množství látek více náchylných k oxidaci (Aleš Tomčala úst. sděl.). Skladováním mrazem tedy tyto složky nedegradují, naopak sušením se nezachovávají. Rehydratací je sice obnoven „čerstvý vzhled“ elaiosomu (Servigne & Detrain 2009), ale

těkavé látky postupem času „vyprchají“ a nemohou být namočením obnoveny (Aleš Tomčala úst. sděl.). Mravenci se orientují různými způsoby, které se liší i mezi druhy v rámci jednoho rodu. U většiny druhů mravenců je však při vyhledávání kořisti pravděpodobně používán především čich (Pavel Pech úst. sděl.). Rehydratace elaiosomů by tedy mohla obnovit atraktivitu semen pouze pro mravence, kteří se orientují spíše zrakem.

Kjellsson (1985) uvádí, že mravenci vždy nejvíce odnášeli semena ze zdroje, se kterým se setkali jako s prvním. Příčina toho může být, jak autoři navrhují, pachová stopa, kterou zanechají „prvotní vyhledávači“ pro ostatní mravence. V našem experimentu byly typy uskladnění semen na kartičkách rozmístěny vždy stejným způsobem, mravenci však neodnášeli semena náhodně. Byli pozorováni mravenci, kteří zkoumali semena z více hromádek, než se pro některé rozhodli. Neodnášeli tedy ta semínka, na která narazili jako na první.

Odnos semen z kartiček proběhl velice rychle, do 7 min byla vždy odnesena téměř všechna čerstvá semena, odnosy tedy probíhaly daleko rychleji než ty, které jsem na Ohrazení dříve prováděla (více než jedna hodina). Nicméně, jak uvádí Mark & Olesen (1996), existuje velká variabilita v čase, za který mravenci semena odnesou, a to v rámci druhu mezi jednotlivými mravenčími koloniemi i jednotlivými odnosovými experimenty. Právě čas nalezení semen mravenci hraje důležitou roli u elaiosomů většiny myrmekochorních druhů vyskytujících se v temperátu, jelikož jejich atraktivita prudce klesá (Servigne & Detrain 2009). Jak ale autoři Servigne & Detrain (2010) uvádějí, pro rostlinu je důležité, aby byla semena brzy mravenci nalezena, proto na místech s velkou pravděpodobností nálezů a odnosu rychlé vysychání nevádí (např. v blízkosti mravenišť).

5.2 Odkladiště jako možná vhodná místa pro klíčení semenáčů

Životaschopnou semennou banku půdy odebrané z odkladišť a kontrolních plošek tvořilo pouze 25 druhů rostlin, z celkového počtu 101 druhů vyskytujících se na Ohrazení (Koutecký 2006, nepublikovaná data). Vyskytoval se zde ale i druh *Conyza canadensis*, který se ve vegetaci nevykultuje (jedná se o invazní druh, jehož semena jsou šířena na velké vzdálenosti větrem). Vyklíčily i 4 myrmekochorní druhy rostlin z celkově 8 přítomných na Ohrazení. Velkou část životaschopné semenné banky tvořily zástupci rodu *Juncus*, stejně jako tomu bylo v předchozích pracích ze stejné lokality (Zelený 1999, Konečná 2012). Mírně více semen bylo nalezeno v půdě z odkladišť. Stejný trend vyššího zastoupení životaschopných semen byl zjištěn též v mravenišťích (Gorb et al. 1997, Konečná 2012). V mé pilotní studii v bakalářské práci jsem podobný experiment provedla s tím rozdílem, že

půdní vzorky byly stratifikovány v přirozených podmínkách během zimy venku a klíčení probíhalo ve skleníkovém pokusu. V tomto pilotním pokusu však klíčil větší počet druhů (47) než v této práci. Dalším rozdílem bylo množství zjištěných semen v obou pokusech, na 1 cm³ odebrané půdy bylo v odkladištích téměř dvakrát menší (1,14 semene) než v mraveništích (2,12). Tento trend ale platil i pro kontrolní plošky (0,99 a 1,89). Toto může být způsobeno jednak rozdílností sezón, ve kterých oba pokusy probíhaly či rozdílnou mrazovou stratifikací (mrazicí boxu při -21 °C oproti vystavení vnějším podmínkám přes zimu). Další příčinou mohou být rozdílné podmínky pro klíčení v klimaboxu se stálou teplotou (19 °C), která nemusela být optimální pro klíčení některých druhů, oproti skleníku s kolísající teplotou. Místo odběrů se v obou pracích nacházelo přibližně ve stejné části lokality, v této práci byl však objem každého vzorku menší (29,4 cm³ oproti 78,5 cm³). Nicméně, tento odebraný objem půdy z odkladišť o mocnosti 1,5 cm by měl být dostačující k zachycení semen, která mravenci umištějí na povrch.

Rozdíl mezi semennou bankou odkladišť a kontrolních plošek nebyl prokázán, navíc byly počty zjištěných životaschopných semen jednotlivých druhů nízké. Zkoumán byl relativně malý počet vzorků i v porovnání s mou bakalářskou prací, proto je pravděpodobné, že z tohoto důvodu nebyly vzácné druhy v životaschopné semenné bance zaznamenány. Přesto byl přítomen např. myrmekochorní druh *Viola palustris*, který patří k méně častým na lokalitě. Samotná analýza myrmekochorních druhů také neodhalila průkazný rozdíl mezi kategorií odkladiště a kontrolní ploška. V odkladištích se však nacházelo mírně více životaschopných semen tří myrmekochorních druhů, a to *Luzula multiflora*, *Viola palustris* a *Carex pilulifera*, pouze výskyt druhu *Potentilla erecta* se zdá být na této kategorii nezávislý. Ve skleníkovém pokusu mé bakalářské práce klíčily tyto myrmekochorní druhy: *Luzula multiflora*, *Carex pallescens*, *Potentilla erecta* a *Danthonia decumbens*. *Luzula multiflora* je druhem častěji se vyskytujícím jak v mraveništích, tak v odkladištích než v kontrolních ploškách. Druhu *Carex pilulifera* tedy pro klíčení spíše svědčily podmínky, které se vyskytovaly během magisterské práce (např. stálější podmínky klimaboxu), oproti druhům *Carex pallescens* a *Danthonia decumbens*, které klíčily pouze ve skleníkovém pokusu.

Důvodů, proč nebyl prokázán rozdíl v semenné bance odkladišť a kontrolních plošek, může být několik. Prvním důvodem by mohlo být to, že se některá semínka nedostanou ani do mraveniště, protože jsou při přenosu mravenci upuštěna (Gorb & Gorb 1999). Jak zjistil Kjellsson (1985), mnoho semenáčků *Carex pilulifera* se nenacházelo v blízkosti mraveniště na odkladištích, ale naopak podél mravenčí stezky, kudy semena do mraveniště odnášeli a

cestou je upustili. Vzhledem k době odběru půdních vzorků (4. 10.) již není pravděpodobné, že by nějaká semena byla ještě ve fázi před vynesemím z mraveniště na konečné odkladiště, protože v této době již mravenci nebývají aktivní. Avšak značná část semen mohla zůstat v mraveništi, jelikož jak Kjellsson 1985) uvádí, 80 – 84 % semen není sekundárním odnosem přeneseno na konečné odkladiště. Nevynesení nepotřebného organického materiálu z mraveniště v mém pokusu by také nasvědčovalo to, že velká část nabarvených cvrčících částí se neobjevila na odkladištích.

Důvodem pro nerealizaci sekundárního odnosu může být například i to, že po odstranění elaiosomu, který slouží jako přirozený úchyt pro menší mravence, může být sekundární odnos znemožněn, pouze větším druhům mravenců toto umožňuje dostatečná mezera mezi kusadly (Gómez et al. 2005). Na Ohrazení dominuje druh *Myrmica scabrinodis*, který patří spíše mezi menší mravence.

Práce zkoumající průběh myrmekochorie se většinou zabývají umístěním semen uvnitř velkých trvalých mravenišť (Gorb et al. 1997, Dauber et al. 2006) popřípadě na odkladištích v lesních biotopech (Farji-Brener & Medina 2000, Gorb et al. 2000, Lobo et al. 2011). V této práci jsem se zabývala nenápadnými lučními mraveništi, která nemají až na ta centrální, stálé umístění (setrvávající pouze po několik málo let). Protože se na pokusné lokalitě vyskytují mraveniště sezónního charakteru, zřejmě ani odkladiště nebudou mít dlouhého setrvání na místě. Průměrná vzdálenost odkladišť od nejbližšího mraveniště činila 10,5 cm, což tedy okraji hnízda ani teritoria neodpovídá. Kjellsson (1985) uvádí, u příbuzného druhu *M. ruginodis* vzdálenost 1,3 – 3 m, po kterou propátrávají terén při shánění potravy. V některých případech se dokonce zdá, že mravenci upouštějí semena bez specifického umístění (Giladi úst. sděl.).

Odkladiště se mohou nacházet jak pod zemí, tak i na povrchu. Podzemní odkladiště mají tu výhodu, že je malí hlodavci nenaleznou (Hanzawa et al. 1985), což v případě pozemních odkladišť neplatí. Na odkladištích nacházejících se mimo mraveniště by měla být zvýšená dostupnost živin pro klíčící semenáčky oproti okolní půdě (Farji-Brener & Medina 2000). Tato místa byla ale také méně druhově bohatá, především protože existovala silná preference mravenců pro semena druhu *Miconia argentea*. Podobný trend jsem ve svém pokusu nezaznamenala.

Vyšší zastoupení semen na odkladišti, podobně jako v této práci, zjistili také práce prováděné v tropickém lese (Farji-Brener & Medina 2000, Lobo et al. 2011). Na odkladištích jsou mravenci přenesena především semena bez elaiosomů. Někdy ale může dojít k tomu, že

semena vynesena z mraveniště mají stále na sobě elaiosom (vlastní pozorování). K tomuto jevu může pravděpodobně docházet z důvodu čištění teritoria, kdy jsou odnášena všechna přítomná semena (Dauber et al. 2006). Naopak semena bez elaiosomu mohou v hnízdě zůstat (Servigne & Detrain 2010), čímž se semena mohou vyhnout predátorům (Manzaneda et al. 2005) Podle autorů studie Lobo et al. (2011), by odkladiště měla být místa s menší predací semen, konkrétně uvádí třikrát méně četnou oproti jiným místům v okolí mraveniště. Hanzawa et al. (1985) uvádí, že hlodavci průkazně častěji predovali semena bez elaiosomů než ta s elaiosomy. Predace probíhala bez ohledu na to, zda semena měla suchý či vlhký elaiosom – a autoři navrhuji další funkci elaiosomu jako „odpuzovače hlodavců“.

6. Závěr

U druhu *Pedicularis sylvatica* byl prokázán rozdíl v atraktivitě diaspor čerstvých a mražených oproti sušeným po dobu jednoho měsíce a poté rehydratovaných. Atraktivita semen druhu *Pedicularis sylvatica* nebyla vodou obnovena což může být způsobeno tím, že látky lákající mravence obsažené v elaiosomech nejsou stálé a na vzduchu se rozkládají. Rehydratací není tento proces vratný. Elaiosomy tedy rehydratací nezískají počáteční složení látek, a tedy ani nezískají původní atraktivitu pro mravence.

Životaschopná semenná banka odkladišť a kontrolních plošek se průkazně nelišila. V odkladištích se nacházelo více semen, za významný považuji především vyšší výskyt semen myrmekochorního druhu *Luzula multiflora* (1,6 krát). To poukazuje na skutečnost, že část semen je přenesena na odkladiště sekundárním odnosem. Značná část však z mravenci rozšiřovaných semen zůstává v mraveništi a nepatrná část je upuštěna při přenosu do mraveniště.

7. Literatura

- Andersen A. N. (1988): Dispersal distance as a benefit of myrmecochory. – *Oecologia* 75: 507–511.
- Beattie A. J. (1985): The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms. – Cambridge University Press, Cambridge.
- Berg R. Y. (1975): Myrmecochorous plants in Australia and their dispersal by ants. – *Australian Journal of Ecology* 23: 475–508.
- Boulay R., Coll-Toledano J. & Cerda X. (2006): Geographic variations in *Helleborus foetidus* elaiosome lipid composition: implications for dispersal by ants. – *Chemecology* 16: 1–7.
- Bresinsky A. (2014): Ants, Plants and fungi: a view on some patterns of interaction and diversity. – In: Lüttge U. & Beyschlag W., *Progress in botany* 75, Springer, Dordrecht, p. 3–54
- Carroll C. R. & Janzen D. H. (1973): Ecology of foraging by ants. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 231–257.
- Canner J. E., Dunn R. R., Giladi I. & Gross K. (2012): Redispersal of seeds by a keystone ant augments the spread of common wildflowers. – *Acta oecologica-international journal of ecology* 40: 31–39.
- Culver D. C. & Beattie A. J. (1978): Myrmecochory in *Viola*: dynamics of seed-ant interactions in some West Virginia species. – *Journal of Ecology* 66: 53–72.
- Danihelka J., Chrtek J. & Kaplan Z. (2012): Checklist of vascular plants of the Czech Republic. – *Preslia* 84: 647–811.
- Dauber J., Rommeler A. & Wolters V. (2006): The ant *Lasius flavus* alters the viable seedbank in pastures. – *European Journal of Soil Biology* 42: 157–163.
- Dean W. R. J., Milton S. J. & Klotz S. (1997): The role of ant nest-mounds in maintaining small-scale patchiness in dry grasslands in Central Germany. – *Biodiversity and Conservation* 6: 1293–1307.
- Farji-Brener A. G. & Medina C. A. (2000): The importance of where to dump the refuse: seed banks and fine roots in nests of the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* and *A. colombica*. – *Biotropica* 32: 120–126.
- Fischer R. C., Ölzant S. M., Wanek W. & Mayer V. (2005): The fate of *Corydalis cava* elaiosomes within an ant colony of *Myrmica rubra*: elaiosomes are preferentially fed to larvae. – *Insectes Sociaux* 52: 55–62.
- 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: 539–547.
- Fokuhl G., Heinze J. & Poschlod P. (2012): Myrmecochory by small ants - Beneficial effects through elaiosome nutrition and seed dispersal. – *Acta oecologica-international journal of ecology* 38: 71–76.
- Gammans N. & Bullock J. M. (2005): Ant benefits in a seed dispersal mutualism. – *Oecologia* 146: 43–49.
- Gammans N., Bullock J. M., Gibbons H. & Schönrogge (2006): Reaction of mutualistic and granivorous ants to *Ulex* elaiosome chemicals. – *Journal of chemical ecology* 32: 1935–1947.
- Gómez C. & Espadaler X. (1998): Myrmecochorous dispersal distances: a world survey. – *Journal of Biogeography*. 25: 573–580.
- Gorb E. V. & Gorb S. N. (1997): The increase in seedling density as an adaptive advantage of myrmecochory in *Corydalis solida* (L.) Clairv. (Fumariaceae). *Zhurnal obshchei biologii* – 58: 89–96.

- Gorb E. V. & Gorb S. N. (1999): Dropping rates of elaiosome-bearing seeds during transport by ants (*Formica polyctena* Foerst.): Implications for distance dispersal. – *Acta Oecologica* 20: 509–518.
- Gorb E. V. & Gorb S. N. (2003): Seed dispersal by ants in a deciduous forest ecosystem. – Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Gorb S. N., Gorb E. V. & Puntila P. (2000): Effects of redispersal of seeds by ants on the vegetation pattern in a deciduous forest: A case study. – *Acta Oecologica* 21: 4–5.
- Gutián J., Medrano M. & Gutián J. (2003) Seed dispersal in *Erythronium dens-canis* L. (Liliaceae): variation among habitats in a myrmecochorous plant. – *Plant ecology* 169: 171–177.
- Handel S. N. (1978): The competitive relationship of three woodland sedges and its bearing on the the evolution of ant-dispersal of *Carex pedunculata*. – *Evolution* 32: 151–163.
- Hanzawa F. M., Beattie A. J & Culver D. C. (1988): Directed dispersal: demographic analysis of an ant-seed mutualism. – *The American Naturalist* 131: 1–13.
- Hanzawa F. M., Beattie A. & Holmes A. (1985): Dual function of the elaiosome of *Corydalis aurea* (Fumariaceae) attraction of dispersal agents and repulsion of *Peromyscus maniculatus*, a seed predator. – *American Journal of Botany* 72: 170–171.
- Hughes L., Westoby M. & Jurado E. (1994): Convergence of elaiosomes and insect prey: evidence from ant foraging behaviour and fatty acid composition. – *Functional ecology* 8: 358–365.
- Chlumský J., Koutecký P., Jílková V. & Štech M. (2013): Roles of species-preferential seed dispersal by ants and endozoochory in *Melampyrum* (Orobanchaceae). – *Journal of plant ecology* 6: 232–239.
- Christianini A. V., Mayhe-Nunes A. J. & Oliveira P. S. (2012): Exploitation of Fallen Diaspores by Ants: Are there Ant-Plant Partner Choices? – *Biotropica* 44: 360–367.
- King T. J. (1981): Ant-hill vegetation in acidic grasslands in the Gower peninsula, South Wales. – *New Phytologist* 88: 559–571.
- Kjellsson G. (1985): Seed fate in a population of *Carex pilulifera* L. – *Oecologia* 67: 416–423.
- Knevel I. C., Bekker R. M., Bakker J. P. & Kleyer M. (2003): Life-history traits of the Northwest European flora: The LEDA database. – *Journal of Vegetation Science* 14: 611 – 614, URL: [www.leda-traitbase.org].
- Konečná M. (2012): Mravenci jako roznašeči semen v luční vegetaci. – Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita, České Budějovice, Bc. Thesis.
- Kovář P., Kovářová M., Dostál P. & Herben T. (2000): Vegetation of ant-hills in a mountain grassland: effects of mound history and of dominant ant species. – *Plant Ecology* 00: 1–13.
- Leal L. C., Neto M. C. L., Morais de Oliveira A. F., Andersen A. N. & Leal I. R. (2014): Myrmecochores can target high-quality disperser ants: variation in elaiosome traits and ant preferences for myrmecochorous Euphorbiaceae in Brazilian Caatinga. – *Oecologia* 174: 493–500.
- Levey D. J. & Byrne M. M. (1993): Complex ant plant interactions - rain-forest ants as secondary dispersers and postdispersal seed predators. - *Ecology* 74: 1802-1812.
- Lisci M., Bianchini M. & Pacini E. (1996): Structure and function of the elaiosome in some angiosperm species. – *Flora* 191: 131–141.
- Lobo D., Tabarelli M. & Leal I. R. (2011): Relocation of *Croton sonderianus* (Euphorbiaceae) Seeds by *Pheidole fallax* Mayr (Formicidae): a Case of Post-Dispersal Seed Protection by Ants? – *Neotropical entomology* 40: 440–444.
- Lobstein M. B. & Rockwood L. L. (1993): Influence of elaiosome removal on germination in five ant-dispersed plant species. – *Virginia journal of science* 44: 59–72.

- Manzaneda A. J., Fedriani J. M. & Rey P. J. (2005): Adaptive advantages of myrmecochory: the predator-avoidance hypothesis tested over a wide geographic range. – *Ecography* 28: 583–592.
- Mark S. & Olesen J. M. (1996): Importance of elaiosome size to removal of ant-dispersed seeds. – *Oecologia* 107: 95–101.
- Martins V. F., Guimaraes P. R., da Silva R. R. & Semir J. (2006): Secondary seed dispersal by ants of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) in the Atlantic forest in southeastern Brazil: Influence on seed germination. – *Sociobiology* 47: 256–274.
- Mayer V, Ölzant S. & Fischer R. C. (2005): Myrmecochorous seed dispersal in temperate regions. – In: Forget P. M., Lambert J. E., Hulme P. E. & Vander Wall S. B. Seed fate predation, dispersal and seedling establishment. – Wallingford, Oxfordshire, UK, p. 175–196.
- Oberrath R. & Bohning-Gaese K. (2002): Phenological adaptation of ant-dispersed plants to seasonal variation in ant activity. – *Ecology* 83: 1412–1420.
- Oostermeijer J. G. B. (1989): Myrmecochory in *Polygala-vulgaris* L., *Luzula-campestris* (L.) DC and *Viola-curtisii* forster in a dutch dune area. – *Oecologia* 78: 302–311.
- Pfeiffer M., Huttenlocher H. & Ayasse M. (2010): Myrmecochorous plants use chemical mimicry to cheat seed-dispersing ants. – *Functional Ecology* 24: 545–555.
- Prior K. M., Saxena K. & Frederickson M. E. (2014): Seed handling behaviours of native and invasive seed-dispersing ants differentially influence seedling emergence in an introduced plant. – *Ecological entomology* 39: 66–74.
- Renard D., Schatz B. & McKey D. B. (2010): Ant nest architecture and seed burial depth: implications for seed fate and germination success in a myrmecochorous savanna shrub. – *Écoscience* 17: 194–202.
- Sernander R. (1906): Entwurf einer Monographie der europäischen Myrmekochoren. Kungliga Svenska Vetenskapsakad. – *Handlingar* 41: 1–410.
- Servigne P. & Detrain C. (2009): Seed desiccation limits removal by ants. – *Arthropod-Plant Interactions* 3: 225–232.
- Servigne P. & Detrain C. (2010): Opening myrmecochory's black box: what happens inside the ant nest? – *Ecological research* 25: 663–672.
- StatSoft (2013): STATISTICA (data analysis software system), version 12. – StatSoft Inc., URL: [www.statsoft.com].
- Šmilauer P. & Lepš J. (2014): Multivariate analysis of ecological data using Canoco5. – Cambridge University Press, Cambridge.
- Štěrba T. (2012): Anatomie listů lesnických významných druhů ostřic (*Carex*). – Lesnická a dřevařská fakulta, Mendelova univerzita, Brno, Mgr. Thesis.
- ter Braak C. J. F., Šmilauer P. (2012): Canoco 5, Windows release (5.00). [Software for canonical community ordination]. Microcomputer Power, Ithaca, NY.
- Vander Wall S. B. & Longland W. S. (2004): Diplochory: are two seed dispersers better than one? – *Trends in Ecology & Evolution* 19: 155–161.
- Zelený D. (1999): Vliv bioticky generované heterogenity na klíčení semenáčků v lučním porostu. – Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita, České Budějovice, Bc. Thesis.

8. Přílohy

Příloha I Kartička s nabízenými semeny v odnosovém experimentu.

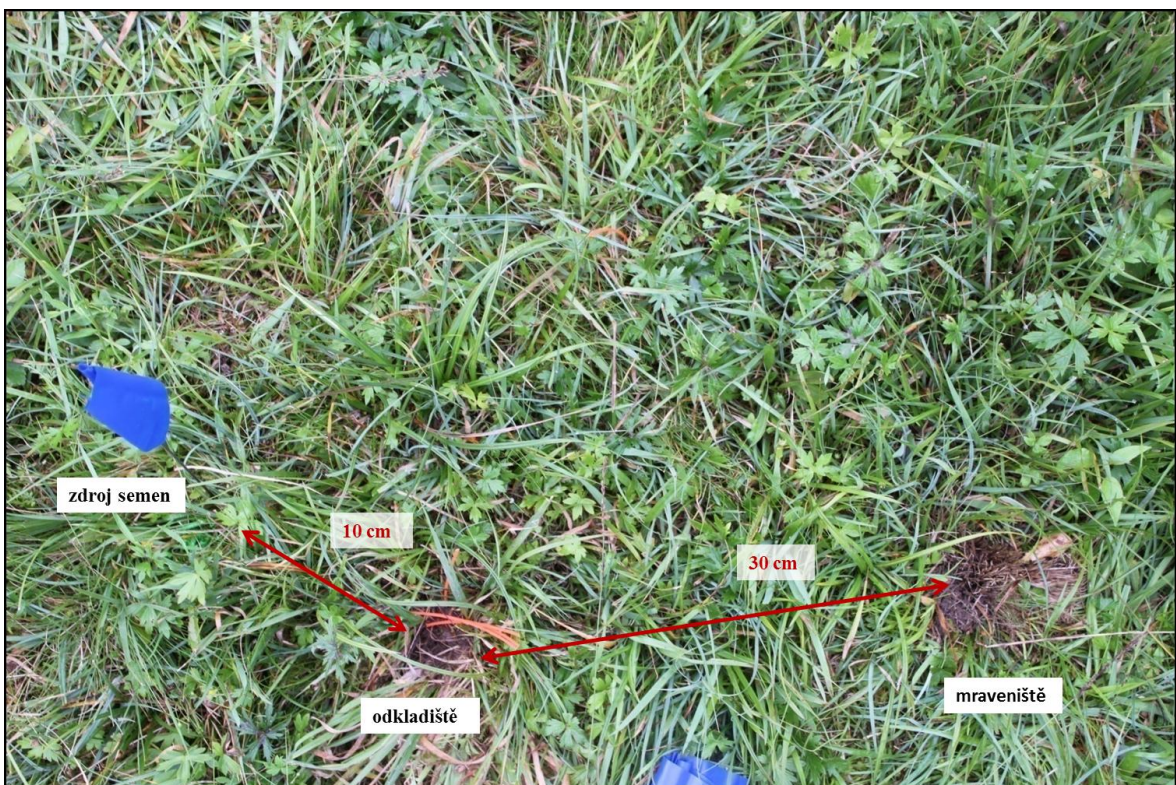
Příloha II Odkladiště nalezené na lokalitě Ohrazení – vzdálenost od mraveniště.

Příloha III Detail odkladiště, zvýrazněna odnesená semena.

Příloha IV Odkladiště, zvýrazněna nabarvená část cvrčka.



Příloha I Kartička s nabízenými semeny v odnosovém experimentu.



Příloha II Odkladště nalezené na lokalitě Ohrazení – vzdálenost od mravenišťe.



Příloha III Detail odkladiště, zvýrazněna odnesená semena.



Příloha IV Odkladiště, zvýrazněna nabarvená část cvrčka.

II Attractivity of elaiosomes for ants, their chemical composition and phylogenetic differences

Abstract

Myrmecochory is a type of plant dispersal resulting from mutualism with ants. Several characteristics on both sides of the partnership influence the removal frequency of myrmecochorous diaspores, besides other, the chemical composition of the diaspores. The influence of more hierarchical levels (*family, genus, species* and *population* and *part*) on this characteristic has been barely studied, though.

Therefore we focused on four families (*Amaryllidaceae, Boraginaceae, Papaveraceae* and *Poaceae*) with 2 different genera in each (each represented by a single species) and 3 populations per each genus. Five focal chemical groups, amino acids, free fatty acids, organic acids, polyols and sugars in elaiosomes and seeds were determined separately.

Redundancy analysis revealed significant trends on all levels, more frequently in the case of individual chemicals within groups, though. For instance, individual polyols and sugars were family specific. Further, rate of chemicals sum distinction between diaspore parts was genus dependent with evident differences among populations. Moreover, there is a trend of convergence in elaiosomes chemical composition with a higher content of easier digestible compounds in elaiosomes, specifically amino acids and shorter chained free fatty acids. However, the total content of free fatty acids, presumably the main ant attractants, was higher in the seed part than in the elaiosome one. This group of chemicals is the only one with this trend, while the other groups were opposite. All general statements about chemical composition should be done with great caution, since the total content and also the composition of individual chemical compounds varies widely even within one species.

1. Introduction

Myrmecochory is a type of plant dispersal as well as plant-ant mutualism (Sernander 1906). This phenomenon is widespread across plant families (at least 77), it has originated from different plant tissues of seed, fruit or floral parts (Mayer et al. 2005, Ciccarelli et al. 2005). This mutualism occurs around the world but Antarctica (Lengyel et al. 2010), even though it ensures a small distance from the maternal plant (average 1,99 m according to Gómez & Espadaler 2013, but some authors present much longer distances, e.g. Chlumský et al. 2013; 36,5 m). This distance depends also on the fact, that not all myrmecochorous plant species use solely ants as dispersers of their seeds. Several plant species use diplochory, a combination with other dispersing agents, balochory, endozoochory or anemochory (Sernander 1906, Vander Wall & Longland 2004), in this case is the distance mediated by ants shorter. On the other hand, even this shorter distance helps to reduce parent-offspring competition as well as competition among seedlings and also improves precise targeting to favourable sites for seed germination (Culver & Beattie 1978). The advantage for ants is the food source: ant-attracting appendages, called elaiosomes, which are present in seeds of most myrmecochorous plants (Sernander 1906, Brew et al. 1989, Mark & Olesen 1996). Therefore, a diaspore of a myrmecochorous plant is composed of a seed (fruit respectively) and one or more elaiosomes – high quality food rewards for ants (Gammans & Bullock 2005).

However, this dispersal mechanism is present with uneven success at both plant and ant species and has involved in partnerships of different plant and ant species (Gorb & Gorb 1995). Both sides of this partnership determine the effectiveness of myrmecochory. Firstly, crucial ant characteristics affecting this relationship are: size, (Pizo et al. 2005), food specialization and dispersal ability. According to food specialization, ants could act as seed predators – granivores, who eat the whole diaspore. Another type of exploitation is by omnivorous ants, who usually remove elaiosome *in situ*, whereas carnivores and fungivores, removing whole diaspore to the nest, act as mutualists (Hughes et al. 1994, Gammans et al. 2006, Christianini et al. 2012). Dispersal ability includes the speed of diaspores removal by ants, elaiosome eating *in situ* on baits, a distance they transport seeds and preference for different size of elaiosomes (Leal et al. 2014). Secondly, at plants, the mass ratio of the diaspore parts (Leal et al. 2014), diaspore size (Mark & Olesen 1996), its morphology (Boulay et al. 2006, Leal et al. 2014), number of revealed diaspores per one plant (Boulay et al. 2006, *Helleborus foetidus*), the time since they release by a plant (attractiveness is

decreasing with time) (Servigne & Detrain 2009) and chemical content and composition (Lanza 1992, 3 species of genera *Trillium*, Reifenrath et al. 2012) belong among the main plant traits determining the attractiveness. Further, even the configuration of present chemical compounds was revealed as important for diaspore removal by ants (Brew et al. 1989).

Chemical composition of several myrmecochorous species elaiosomes has been investigated. It was shown previously, that the composition of amino acids, fatty acids and carbohydrate of elaiosomes is more similar to each other than to the corresponding seeds (Fischer et al. 2008). For example, elaiosomes of species *Asarum europaeum* and *Leucojum vernum* contained less than 5 % of lipids. Among lipids, probably free fatty acids are the most abundant and after them triacyl-glycerols (Perternelli et al. 2008). Also the protein content was greater in seeds than in elaiosomes (Fischer et al. 2008). However, in diaspores of myrmecochorous plants are present essential fatty acids, oleic, α -linolenic and γ -linolenic respectively (Gammans & Bullock 2005). The starch content is negligible in elaiosomes (less than 1 %), whereas in seeds is reaching about 10 %, the content of elements N and C did not differed (Fischer et al. 2008). The low content of lipids, starch and proteins in diaspores could be explained by more dispersal agents used by certain plant (diplochory) (Ciccarelli et al. 2005). Brew et al. (1989) proposed three possible causes of seeds removal by ants: (1) elaiosome as a nutrient source, (2) elaiosome as a source of essential chemical compounds for ants and (3) presence of chemical signals releasing seed removal. (1) The evidence for the first hypothesis could be preferential feeding of elaiosomes to larvae after the seed removal. Fischer et al. (2005) found out that around 61 % of the nitrogen from *Corydalis cava* elaiosomes was found in the larvae of *Formica rubra*. However, ant workers profit either, those of *Myrmica ruginodis* in colonies without queen produced heavier larvae after being fed with elaiosomes of two *Ulex* species (*U. minor* and *europaeus*) (Gammans & Bullock 2005). On the other hand, Caut et al. (2013) did not found any significant importance of *Helleborus foetidus* elaiosomes for *Aphaenogaster senilis* ants and they suggested that the advantage for ants is a food source, when other food resources are scarce. In conformity with this is the fact, that myrmecochorous plants flower on average 7.1 weeks earlier than non-myrmecochorous ones and provide so food for ants before the insects as a food resource is available (Oberrath & Böhning-Gaese 2002). (2) Gammans & Bullock (2005) highlighted the presence of essential chemical compounds for ants in elaiosomes – fatty acids (e.g. linolenic and linoleic) and sterols (e.g. cholesterol), which cannot be synthesised by ants themselves. (3) Brew et al. (1989) proposed a theory of chemical signals

produced by a single compound or group of them, and supported it by their own data. As mentioned previously, the lipid content does not have to be high, but it seems to be crucial for triggering the diaspore removal. Even diaspores of nonmyrmecochorous plants with greater lipid content are removed more frequently than those with lower lipid amounts (Pizo & Oliveira 2001). However, total lipids amount only does not determine the attractiveness. In the study of Brew et al. (1989), who impregnated small pieces of pith by different chemicals, non-polar lipids fraction was the most abundant besides polar lipid fraction and aqueous fraction but were not removed more frequently than “untreated pieces of pith” (no extract from elaiosome). Further, as the main releaser of diaspore removal by ants is mostly stated a fatty acid – oleic acid (Boulay et al. 2006, Pfeiffer et al. 2010). Higher amount of several fatty acids are present in elaiosomes, for instance in the study by Fischer et al. (2008) was oleic acid on average 2.6 times in elaiosomes than in seeds. Moreover, this compound was the most abundant fatty acid in elaiosomes of most target species in study by Fischer et al. (2008). Oleic acids induced quick removal of artificial bait soaked by this compound by ants. In other study, the most attractive compound was 1,2 diolein, in which is oleic acid incorporated (Gammans et al. 2006). This acid also causes ant removal behaviour of dead bodies of insects „*dead body simulation*” (Brew et al. 1989), further it is the major component of hemolymph (Hughes et al. 1994). Bresinsky (2014) compared attractiveness of oleic, linoleic and ricinoleic acids. The last mentioned was the most attractive one in all measurements. Linoleic acid was after 120 min two times less attractive than oleic acid and even than control filter paper without any fatty acid. Brew et al. (1989) stated, that oleic acid, 1,2-diolein and triolein were removed by ants at the same rate as elaiosomes, which could suggest that they are also triggers of the diaspore removal.

It is usually stated, that elaiosome – literally “oil body” – is a nutrient rich appendage with a high lipid and protein content (e.g. Vander Wall & Longland 2004). The real trends in chemical content remain not completely determined. Studies focused on chemical composition in myrmecochorous plants are interested mainly only in ant-attracting part, elaiosome (Lanza 1992, Schmeer et al. 1996, Peternelli et al. 2008, Boieiro 2012), single species (Schmeer et al. 1996, *Commiphora guillaumini*, Boulay et al. 2006, *Helleborus foetidus*, Peternelli et al. 2008, *Mabea fistulifera*, Boieiro 2012 *Euphorbia characias*). Studies mostly focused on limited spectrum of chemical compounds, especially lipids (Schmeer et al. 1996, Boulay et al. 2006), their components – fatty acids (Lanza 1992, Hughes et al. 1994, Boieiro et al. 2012) or searching for the attractive compounds (Brew et al. 1989, Schmeer et al. 1996). Very few studies compared the influence of more levels on

chemical composition, specifically within one specimen, to our knowledge only Boieiro et al. (2012), within one species (Boulay et al. 2006, 2 populations; Perternelli et al. 2008, 2 populations; Boieiro et al. 2012, 4 populations) or between species (Hughes et al. 1994, only fatty acids, 12 species; Fischer et al. 2008) and families (Fischer et al. 2008).

The study of Fischer et al. (2008) is to our knowledge the only one comparing more groups of chemical compounds in both diaspore parts of higher number of species in temperate region. They specifically focused on 15 species unevenly distributed in 7 families and collected in the surroundings of Vienna and the Botanical Garden of the University of Vienna. However, the influence of different taxonomical levels on the chemical composition was not revealed yet – so we chose myrmecochorous species hierarchically organized and tried to separate the variability in chemical composition of their diaspore to parts attributable to differences between populations within target species, between genera, within target families, and between families. Therefore, we attempted to answer the following questions:

1. Are there any consistent differences in chemical composition between elaiosome and the rest of the diaspore across various species?
2. Are there consistent differences in chemical composition of parts of diaspore attributable to their taxonomic distinctness?

2. Materials and methods

2.1 Selected species, diaspore collection and storage

Concentration of selected chemical compounds present in diaspores (amino acids, free fatty acids, organic acids, polyols and sugars) of eight myrmecochorous plant species was analysed. We chose a pair of myrmecochorous species from each of four families: *Boraginaceae* and *Papaveraceae* from Dicots, and *Amaryllidaceae* and *Poaceae* from Monocots. Species in pairs belonged to different genera and had comparable seed weight (*Pulmonaria officinalis* and *Symphytum officinale*, *Corydalis cava* and *Chelidonium majus*, *Galanthus nivalis* and *Leucojum vernum*, *Danthonia decumbens* and *Melica nutans*). (Fig.1). We studied four monocot and four dicot species with different origin of elaiosome: *Danthonia decumbens* (floral parts – sterile spikelet), *Galanthus nivalis* (seed – chalaza), *Leucojum vernum* (seed – chalaza), *Melica nutans* (3 elaiosomes – 2 fruit origin – lemma and 1 floral origin – sterile spikelet) and dicots *Corydalis cava* (seed – raphe), *Chelidonium*

majus (seed – raphe), *Pulmonaria officinalis* (fruit – pericarp base) and *Symphytum officinale* (fruit – pericarp base). Therefore, each diaspore was divided into two parts – elaiosome (E) and seed (S). The term “seed” is used (to follow the terminology used in the seminal paper of Fischer et al. 2008). However, morphologically it is incorrect, because it is a nutlet for *Boraginaceae* and a caryopsis for *Poaceae*. Because the pairs of species within a family belong to different genera, we use in further text the name of factor “genus”, even though we have no replication of species within a genus.

Diaspores of selected myrmecochorous plants were collected in the years 2013 and 2014. For one sample were used more plant individuals of each population. Number of used elaisomes in one sample (representing one population) was species dependent, because of different elaiosome size, approximately 5 mg of dry mass was needed. For example, in case of *Amaryllidaceae* the sample contained only several elaisomes, in contrast to the sample of *Chelidonium majus*, which contained more than one hundred elaisomes. Diaspores of one population per each of 3 selected localities defined by 1 km minimal distance from each other were sampled (Table 1, Fig. 2). The diaspores were stored in a freezer (–35 °C) in order to preserve the chemical composition. Storage endured the whole period between sampling and analysis with the exception of the segregation of two diaspore parts (using a binocular microscope and a scalpel). Exception was the presence of two different types of elaisomes on caryopsis of *Melica nutans*, therefore these diaspores were divided into three samples – S, E as two elaisomes originated from glum, and B as elaiosome originated from a bud(both parts were analysed but only part E was used in the statistical analysis).

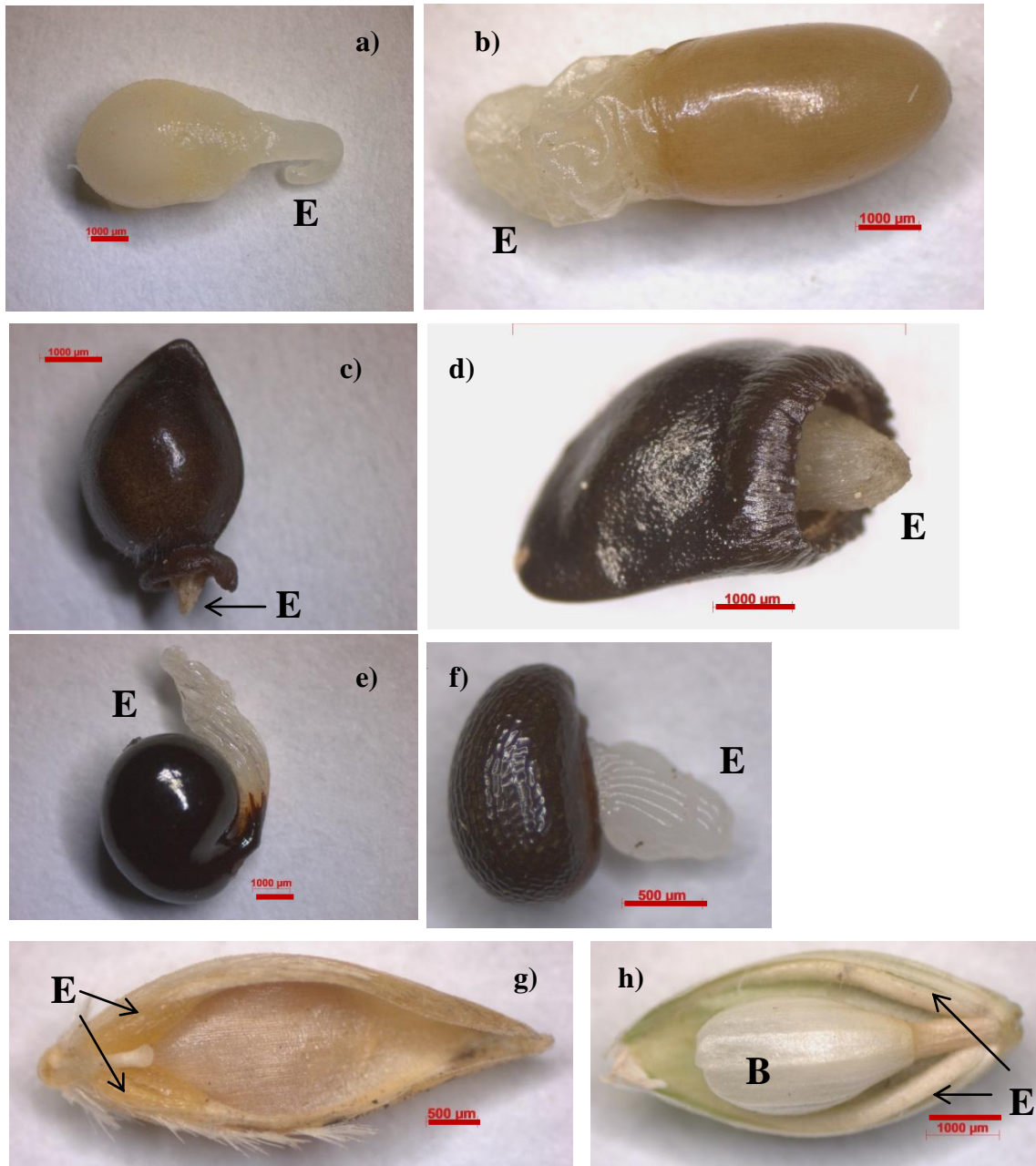


Fig. 1. – Diaspores of species of interest: *Galanthus nivalis* (a), *Leucojum vernum* (b), *Pulmonaria officinalis* (c), *Symphytum officinale* (d), *Corydalis cava* (e), *Chelidonium majus* (f), *Danthonia decumbens* (g) and *Melica nutans* (h) (orig.).

Table 1. – Location of target species populations.

locality number	plant species	name of locality	date of seed collection	GPS location
1	<i>Corydalis cava</i>	Hluboká nad Vltavou	21.4.2014	49°2'25.492"N, 14°27'28.558"E
2		Ktiš	24.4.2014	48°55'31.901"N, 14°7'17.601"E
3		Libochovka	20.4.2014	49°5'1.883"N, 14°28'19.313"E
4	<i>Danthonia decumbens</i>	Ohrazení	1.8.2013	48°56'58.056"N, 14°35'46.949"E
5		Zvíkov	17.7.2014	48°59'20.366"N, 14°36'28.119"E
6		Ruda	18.7.2014	49°8'47.051"N, 14°41'38.199"E
7	<i>Galanthus nivalis</i>	Brdo	21.5.20104	49°4'46.178"N, 13°50'35.839"E
8		Hradčany	24.5.2014	49°3'3.729"N, 13°49'17.819"E
9		Záhoří	20.5.2014	49°4'55.029"N, 13°49'57.043"E
10	<i>Chelidonium majus</i>	Bošice	1.7.2013	49°5'22.053"N, 13°50'23.369"E
11		Hradčany	14.9.2013	49°6'8.060"N, 13°50'13.382"E
12		České Budějovice	13.6.2013	48°58'27.662"N, 14°27'17.536"E
13	<i>Melica nutans</i>	Brdo	11.7.2014	49°4'44.831"N, 13°50'34.700"E
14		Věneč	15.6.2014	49°5'43.067"N, 13°52'24.846"E
15		Čížov	12.6.2014	48°51'48.031"N, 15°51'49.539"E
16	<i>Leucojum vernum</i>	Kohoutov	15.6.2013	50°27'7.804"N, 15°53'2.144"E
17		Brdo	16.6.2014	49°6'8.060"N, 13°50'13.382"E
18		Opolenec	20.5.2014	49°5'20.641"N, 13°47'47.304"E
19	<i>Pulmonaria officinalis</i>	Bohumilice	3.5.2014	49°5'37.535"N, 13°49'57.131"E
20		Budilov	17.5.2014	49°4'52.688"N, 13°50'59.020"E
21		Hradčany	29.4.2014	49°6'14.252"N, 13°49'34.074"E
22	<i>Symphytum officinale</i>	Kaliště	14.9.2013	48°57'55.380"N, 14°34'44.488"E
23		Bošice	16.9.2013	49°5'0.635"N, 13°50'35.910"E
24		Plaveč	11.6.2014	48°55'46.295"N, 16°4'42.105"E

2.2 Chemical analysis

Chemical composition of diaspores was analysed in the Biological Centre ASCR, Laboratory of analytical biochemistry and metabolomics, in 2014 (April – October). Amino acids, free fatty acids, organic acids, polyols and sugars were main chemical substance groups of our interest. Firstly, each separated sample of elaiosomes and seeds was lyophilized, and then divided into three parts to create triplicates (average concentrations counted for each sample). Each part with the minimal weight 5 mg of elaiosomes and 10 mg of seeds was further analysed separately. To each sample in microtubes, 1 ml of hexane was added and then the plant material was ground using a steel ball during shaking in the Tyssue Lyser, (5 min, 40 oscillations.s⁻¹). An adjusted method described by Fischer et al. (2008) was used during extraction. Liquid and solid parts were separated by centrifugation (10 min, 7 000 r. p. m). Free fatty acids were analysed from the liquid part; solid part was used for analysis of amino acids and organic acids (ECF method; Košťál 2011b) and polyols and sugars by SAC method. Chromatography was used as the separation method and peak heights were used in all analyses.

Free fatty acids were analysed according to the study (Zahradníčková et al. 2014) after transesterification to fatty acid methyl ester (FAMES) by gas chromatography with flame ionization detection (GC/FID). The transesterification procedure is shortly mentioned here:

After extraction, 100 µl of supernatant aliquots were placed into microtubes and evaporated with liquid nitrogen, then 50 µl of hexane, 10 nmol of tetracosane (IS) and 100 µl of newly prepared 2M sodium methoxide were added and shaken intensely for 10 s and then gently for 15 min. After 100 µl of hexane and 250 µl of 1 M HCl were added in order to maintain the acidic pH, the sample was shaken again. The upper hexane layer was collected, than 200 µl of hexane was added to the remaining sample and the solution was shaken. Finally, both obtained hexane parts were combined, dried by nitrogen steam, diluted with isooctane (concentration 1 mg of sample in 1000 µl of isooctane) and 1 µl was injected into GC/FID.

For extraction of amino acids, organic acids, sugars and polyols the pellets were washed 5 times with 200 µl of 30% EtOH and the extracts were stored at 60 °C for 60 minutes. Then the samples were transferred to 1ml microtubes and centrifuged (10 min. 7000 r. p. m). For SAC analysis 100 µl of the sample was taken and after the addition of xylitol (IS) it was evaporated to dryness. Derivatization occurred in two steps – oximation and silylation, sugars and polyols were then quantified by gas chromatography with FID (Košťál et al. 2011a).

Amino acids and organic acids were quantitatively determined after derivatization by ethyl chloroformate under pyridine catalysis and simultaneous extraction into chloroform by a combination of gas chromatography with mass spectrometric detection and liquid chromatography with mass spectrometric detection (Hušek 1997, Košťál et al. 2011b).

As a result, for each group, we have its total content (total sugar content, total amino acid content), and then detailed quantitative composition of individual chemical substances within each group.

2.3 Statistical analysis

For the univariate responses (i.e. total content of each group analysed separately) we used a type of mixed effect Nested design (hierarchical) ANOVA – using Statistica 12 (StatSoft 2013). For analysing all total contents of five major chemical groups together was used a corresponding multivariate method (in this case Redundancy Analysis, Šmilauer & Lepš 2014) using programme Canoco for Windows release 5.0 (ter Braak & Šmilauer (2012)). The same multivariate analysis was also used in case of individual chemical compounds for each group separately.

For all analyses, concentrations of all chemical compounds were counted on 1 mg of elaiosome and seed dry mass (DM) of eight target species and transformed according to the formula $Y' = \log(Y+1)$. For multivariate analyses, centering and standardization by chemical compounds was applied. Chemical analysis of polyols and sugars of one elaiosome sample of *Danthonia decumbens* elaiosome failed, and the data were inputted by averages for the other two populations to keep the balanced design needed for further analyses.

2.3.1 Composition of major chemical groups

To identify main differences between the diaspore parts (i.e. between elaiosome and seed), sums of compounds concentrations within five groups were analysed by partial RDA with category population as the covariate. This category was also used as a block to define permutations within blocks. The same data (each group separately) were analysed also by Nested design ANOVA with categorical explanatory variables (factors) part, genus(family)*part, genus(family) and family (the brackets signify nesting, so that genus(family) means genus nested in family). The factor genus (and also its interaction) was taken as factor with random effect.

2.3.2 Interaction *genus*part*

Further, the significance of interaction of the category *genus* and *part* was tested by RDA; this interaction reflects the non-additivity of the main effects of factors *genus* and *part* – in other words, low variability explained by this interaction means that the differences between elaiosome and seed are consistent across various genera. This analysis was conducted both with sums of concentrations and with individual chemical compounds.

2.3.3 Individual chemical compounds – hierarchical decomposition

Because the amount of explained variability (also called trace) is dependent on degree of freedom (DF) of the corresponding explanatory variables used, the characteristics called Means Square - MS was used (similarly to the variation partitioning in the Canoco 5 package, ter Braak and Šmilauer (2012), obtained by dividing the explained variability by corresponding DF.

2.3.3.1 Diaspore

Hierarchical decomposition of variability was for individual chemical compounds revealed by partial RDA on three levels: *part*, *genus* and *family* (Table 2). Distinction between diaspores of eight selected plant species in individual chemical compounds of five main groups were analysed by partial RDAs. On the *family level*, *part* was used as a covariable and permutations defined by hierarchical design (freely exchangeable within wholeplots). On the *genus level*, variable *family* and *part* was used as covariates and permutations were done unrestrictedly. In order to determine the differences between diaspore parts, category *population* was used as a covariable and permutations were performed unrestrictedly with blocks defined by covariate (population).

Afterwards, the variability explained by population after subtraction of explained variability by all levels (*family*, *genus* and *part*) and variability explained exclusively by (“pure”) *genus*part* interaction from one was computed. Pure *genus* part* interaction obtained in order to compute the population level was obtained by partial RDA with *genus*part* interaction as explanatory variable and *part* and *genus* as covariate was done. Therefore, the results of these analyses were proportions of explained variability of chemical content by each level.

2.3.3.2 Elaiosome

Proportion of explained variability by each hierarchical level was also examined for elaiosome part separately, because of its importance for ant dispersal. On the *family level*, RDA with hierarchical design of permutations was used. On the *genus level*, partial RDA

with family as a covariate was used and permutations were performed freely exchangeable. Proportion of variability in elaiosome composition explained by the category population was computed by subtracting of sum of variability explained by *family* and *genus* from one. Further, RDA of all individual chemical compounds together was done with unrestricted permutations, to determine differences among populations within each genus.

Table 2. – Overview of variables and manner of permutation used in hierarchical decomposition by RDA. f = family, g = genus, p = part.

tested level	diaspore		elaiosome	
	covariate	permutations	covariate	permutations
family	part	freely within wholeplot	–	hierarchical design
genus	family, part	unrestricted	family	unrestricted
part	population	block defined by population	–	–
population	1 – (f+g+p)	–	1 – (f+g)	–
genus*part (pure)	part, genus	–	–	–

3. Results

3.1 Composition of major chemical groups

In total, 61 chemical compounds were detected and analyzed (26 amino acids, 14 fatty acids, 6 organic acids, 9 polyols and 6 sugars – Appendix Table I–V). The total concentrations sums of these five chemicals groups in elaiosomes and seeds of the target species were compared (Fig. 2). Concentrations significantly differed between elaiosomes and seeds (partial RDA analysis; $F = 18.3$; $p = 0.0001$; the only canonical axis explained 44.34 % of the total variability). Whereas amino acids (AA), organic acids (OA) and polyols (P) were highly correlated and more abundant in elaiosomes, sugars (S) and free fatty acids (FA) seem to be independent and were negatively correlated to each other. Sugars were the most abundant group of chemicals (Fig. 3). All groups of chemical compounds analysed with the exception of FA were more abundant in elaiosomes. The greatest difference was detected in AA, which were on average 8.9 times more abundant in elaiosomes than in seeds of the same species. The nested design ANOVA revealed significance of these differences in concentrations of each separately analysed chemical group. Note that concentrations are log-transformed, so the relative differences are tested.

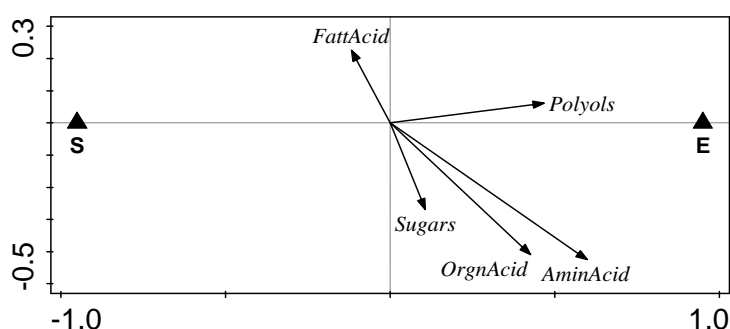


Fig.2. – Ordination diagram of partial RDA depicting the difference in five main chemical compounds groups between seeds and elaiosomes ($F = 18.3$; $p = 0.0001$). Canonical axis explains 44.34 % of the total variability.

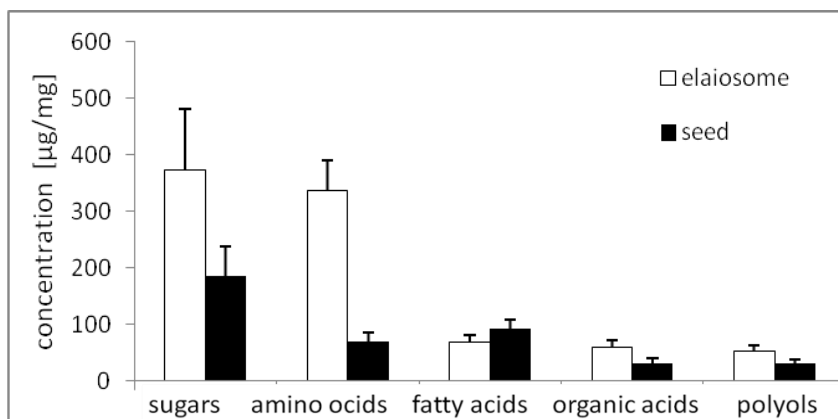


Fig.3. – Mean total sums of concentrations of five chemical groups counted on dry mass [$\mu\text{g}/\text{mg}$], bars represent standard error of mean.

3.1.1 Amino acids

Amino acids content differed significantly between elaiosome and seed (i.e. *part* factor), as well as the significant *genus*part* interaction was found (Table 3; Fig. 4). Only family *Papaveraceae* showed consistent trend of higher AA amount in elaiosomes of both genera. Also at the *genus level*, the greatest distinction was found within the family *Poaceae*, AA content in genus *Danthonia* was rather similar in both diaspore parts, on the other hand genus *Melica* had approximately 10 times higher content of AA in elaiosome. Similar trend, though weaker, was found in the family *Boraginaceae*, higher AA content was detected in *Pulmonaria officinalis*.

The amount of AA was significantly higher in elaiosomes – *part* factor ($F_{1,7} = 12.0$; $p = 0.0105$). The greatest distinction occurred in *Papaveraceae* and the only exception from this pattern was the species *Galanthus nivalis*. Differences between elaiosomes and seeds varied across genera (*genus* part*; $F_{7,32} = 10.1$; $p < 0.0001$).

Table 3. – Results of nested design ANOVA for amino acids.

	effect	SS	DF	MS	error DF	F	p
Family	Fixed	1.778	3	0.5927	4	0.6	0.6285
Part	Fixed	5.3677	1	5.3677	7	12.0	0.0105
Genus(family)*part	Random	3.1382	7	0.4483	32	10.1	<0.0001
Genus(family)	Random	3.7086	4	0.9272	7	2.1	0.1888
Population		1.425	32	0.0445			

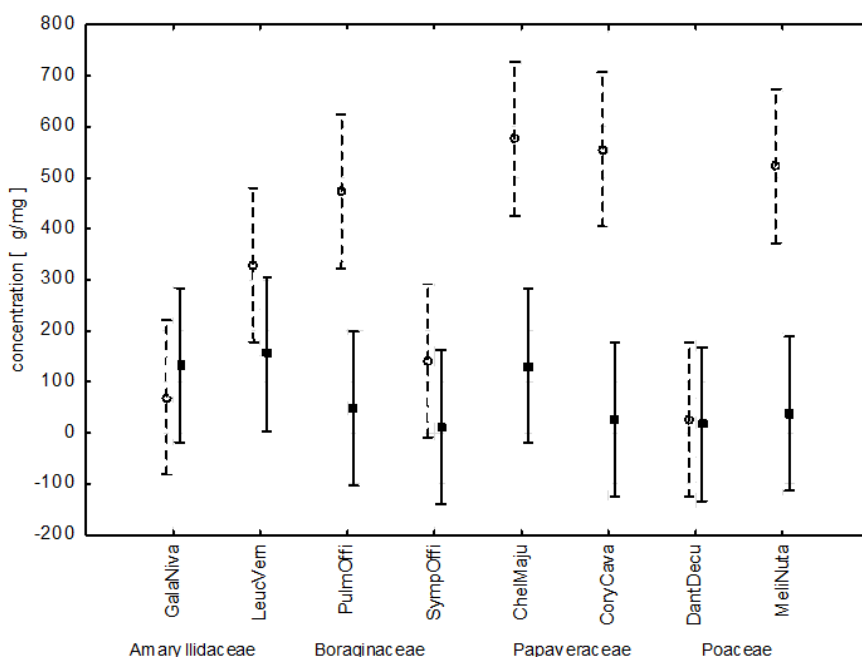


Fig. 4. – Differences in average content of amino acids at the part, genus and family level; by nested design ANOVA; significant: part ($F_{1,7} = 12.0$; $p = 0.0105$); *genus*part* interaction ($F_{7,32} = 10.1$; $p < 0.0001$).

3.1.2 Free fatty acids

Overall, the amount of FA did not differ significantly between seed and elaiosome. However, slightly higher free fatty acids amount occurred in seeds, with the exception of the species *Leucjum vernum* and *Danthonia decumbens*. The highest difference between diaspore parts was showed by the species *Pulmonaria officinalis*. Free fatty acids content differed significantly at the *genus level*; ($F_{4,7} = 5.4$, $p = 0.0267$; Table 4; Fig. 5). Moreover, the differences between genera resulted in *genus*part* interaction significance ($F_{7,32} = 3.5$, $p = 0.0065$). Genera differed also within family *Poaceae*, *Danthonia decumbens* had rather distinct sums of FA between diaspore parts, whereas both *Melica nutans* parts contained similar FA amounts.

Table 4. – Results of nested design ANOVA for sums of free fatty acids.

	effect	SS	DF	MS	error DF	F	p
Family	Fixed	10.7774	3	3.5925	4	3.3	0.1408
Part	Fixed	0.1399	1	0.1399	7	0.7	0.4347
Genus(Family)*Part	Random	1.4267	7	0.2038	32	3.5	0.0065
Genus(Family)	Random	4.3859	4	1.0965	7	5.4	0.0267
Population		1.8508	32	0.0578			

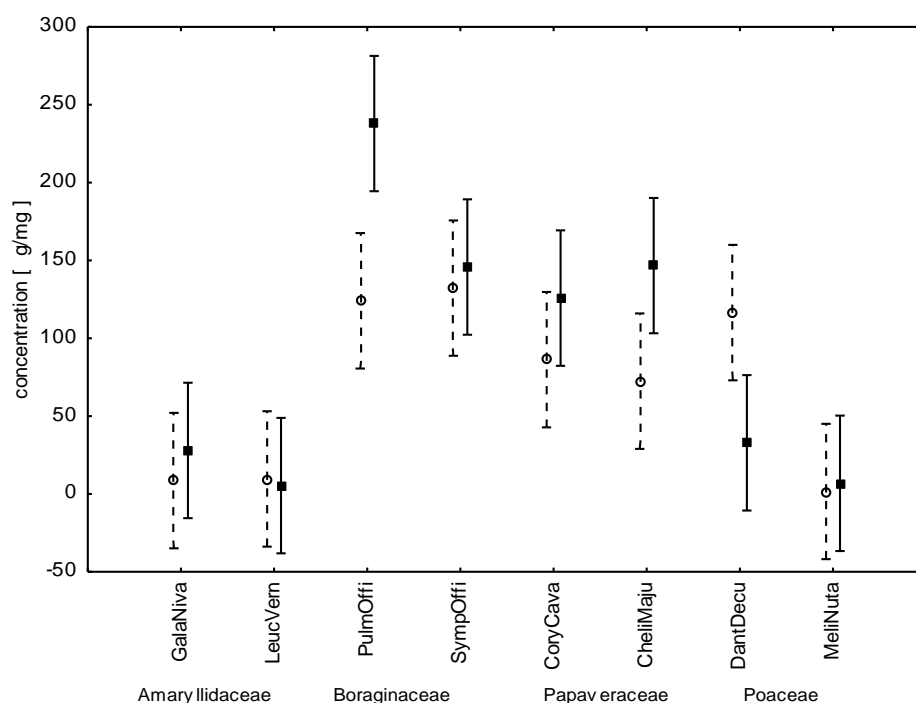


Fig. 5. – Elaiosomes and seed differences of average content of free fatty acids at genera and family level; by nested design ANOVA; significant: part ($F_{4,7} = 5.4$, $p = 0.0267$); genus*part interaction ($F_{7,32} = 3.5$, $p = 0.0065$).

3.1.3 Organic acids

In organic acids content, the *part* level was the only significant one ($F_{1,7} = 7.8$, $p = 0.0266$; table 5; Fig 6). Sums of OA were higher in elaiosomes with the exceptions of *Galanthus nivalis* and *Danthonia decumbens*. Out of our species, *Corydalis cava* contained the highest sum of OA, especially in elaiosomes.

Table 5. – Results of nested design ANOVA for sums of organic acids.

	effect	SS	DF	MS	error DF	F	p
Family	Fixed	1.6516	3	0.5505	4	1.2	0.4002
Part	Fixed	1.7253	1	1.7253	7	7.8	0.0266
Genus(family)*part	Random	1.5434	7	0.2205	32	1.8	0.1172
Genus(family)	Random	1.7479	4	0.4370	7	2.0	0.2019
Population		3.8738	32	0.1211			

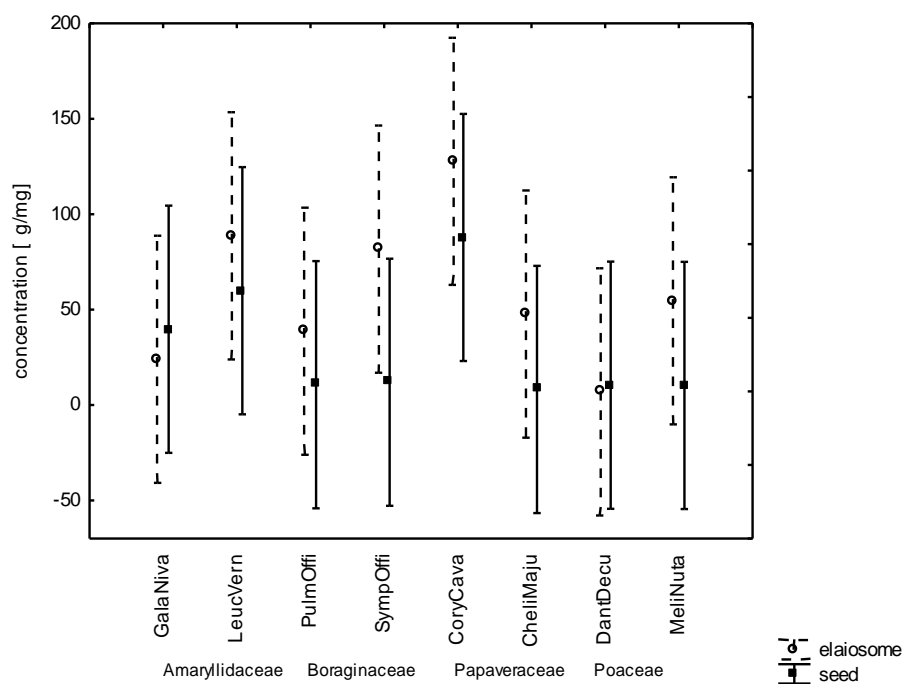


Fig. 6. – Elaiosomes and seed differences of average content of organic acid at genera and family level; by nested design ANOVA; significant: part ($F_{1,7} = 7.8$; $p = 0.0266$).

3.1.4 Polyols

The difference in polyols concentrations at the *part level* was significant ($F_{1,7} = 26.4$; $p = 0.0013$), with greater concentrations in elaiosomes in all species with the exception of *Galanthus nivalis*. The highest amount of polyols was detected in elaiosomes of the species *Danthonia decumbens*. The greatest differences are between parts of *Pulmonaria officinalis* and *Chelidonium majus* diaspores. The *genus* level was also significant ($F_{4,7} = 0.6275$; $p = 0.0128$; Table 6; Fig. 7), thus trends within family differed.

Table 6. – Results of nested design ANOVA for sums of polyols.

	effect	SS	DF	MS	error DF	F	p
Family	Fixed	0.9323	3	0.3108	4	0.5	0.7049
Part	Fixed	2.3075	1	2.3075	7	26.4	0.0013
Genus(family)*part	Random	0.6127	7	0.0875	32	1.2	0.3184
Genus(family)	Random	2.5098	4	0.6275	7	7.2	0.0128
Population		2.2872	32	0.0715			

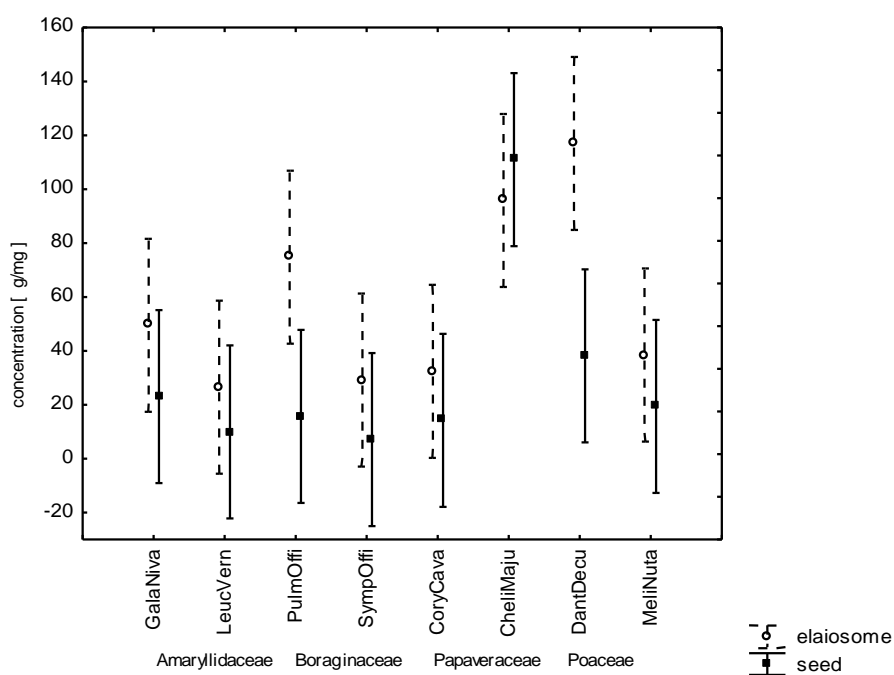


Fig. 7. – Elaiosomes and seed differences of average content of polyols on genera and family level; by Nested design ANOVA; significant: part ($F_{1,7} = 26.4$; $p = 0.0013$); genus*part interaction ($F_{7,32} = 0.6275$; $p = 0.0128$).

3.1.5 Sugars

In case of sugars, the only significant level was *family* ($F_{3,4} = 32.2640$; $p = 0.029$; Table 7; Fig. 8). Higher amount of sugars was in seeds of the target species, although the highest amount of sugars by far occurred in elaiosomes of *Galanthus nivalis*. Also, slightly higher amount of sugars occurred in *Leucojum vernum*, other species had higher concentrations of sugars in seeds.

Table 7. – Results of nested design ANOVA for sums of sugars.

	effect	SS	DF	MS	error DF	F	p
Family	Fixed	8.0243	3	2.6748	4	32.2640	0.0029
Part	Fixed	0.3321	1	0.3321	7	1.9740	0.2028
Genus(Family)*Part	Random	1.1778	7	0.1683	32	2.2670	0.0541
Genus(Family)	Random	0.3316	4	0.0829	7	0.4930	0.7424
Population		2.3747	32	0.0742			

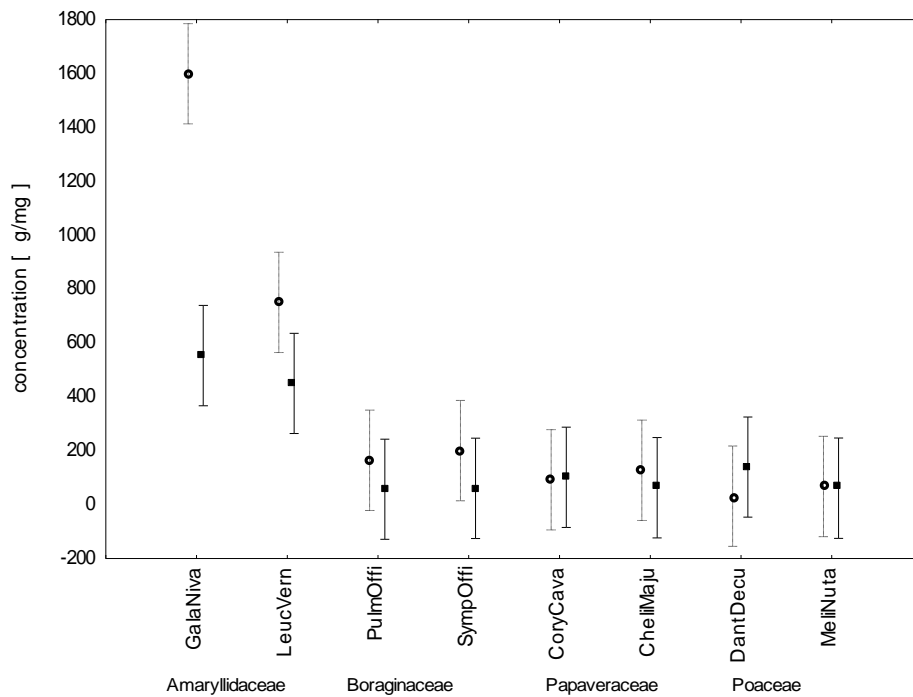


Fig. 8. – Elaiosomes and seed differences of average content of sugars at genera and family level; by nested design ANOVA; significant: part ($F_{3,4} = 32.2640$; $p = 0.029$).

3.2 Interaction genus*part

Significant distinction between diaspore parts of each genus in sums of five groups of chemical compounds was identified by RDA with interaction of category genus and part as the explanatory variable for sums of concentrations within groups ($F = 8.3$; $p = 0.0001$; first axis explained 37.67 % of the total variability; Fig. 9) and for concentrations of individual chemical compounds ($F = 6.0$; $p = 0.0001$, first axes

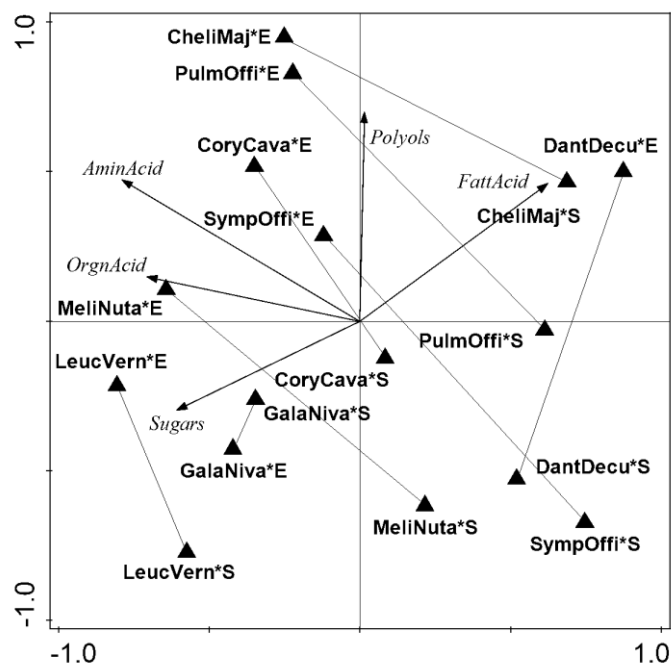


Fig. 9. – Ordination diagram of RDA with sums of five chemical groups depicting the difference in chemical compounds of elaiosomes and seeds (lines connect parts of one species), interaction with genus (which includes in this case both main effects) ($F = 8.3$; $p = 0.0001$; first axis explained 37.67 % of the total variability).

explained 30.21 % of the total variability; Fig. 10a, b). *Amaryllidaceae* differed at least

between seeds and elaiosomes of all studied families, on the other hand *Poaceae* the most. There was higher concentration of sugars in seeds and elaiosomes of the family *Amaryllidaceae*, higher in *Leucojum vernum*. The species *Pulmonaria officinalis* contained the highest amount of free fatty acids. Elaiosomes were at some species more similar to each other across different families than to seeds of the same species. For instance, elaiosome of *Melica nutans* from *Poaceae* is rather similar to *Leucojum vernum* from *Amaryllidaceae* or *Corydalis cava* to *Chelidonium majus* – both from family *Papaveraceae*. On the other hand, both diaspore parts of family *Amaryllidaceae* genera appeared to be rather similar. Elaiosomes usually contain more polyols, amino acids and organic acids with the exception of elaiosome of *Danthonia decumbens*.

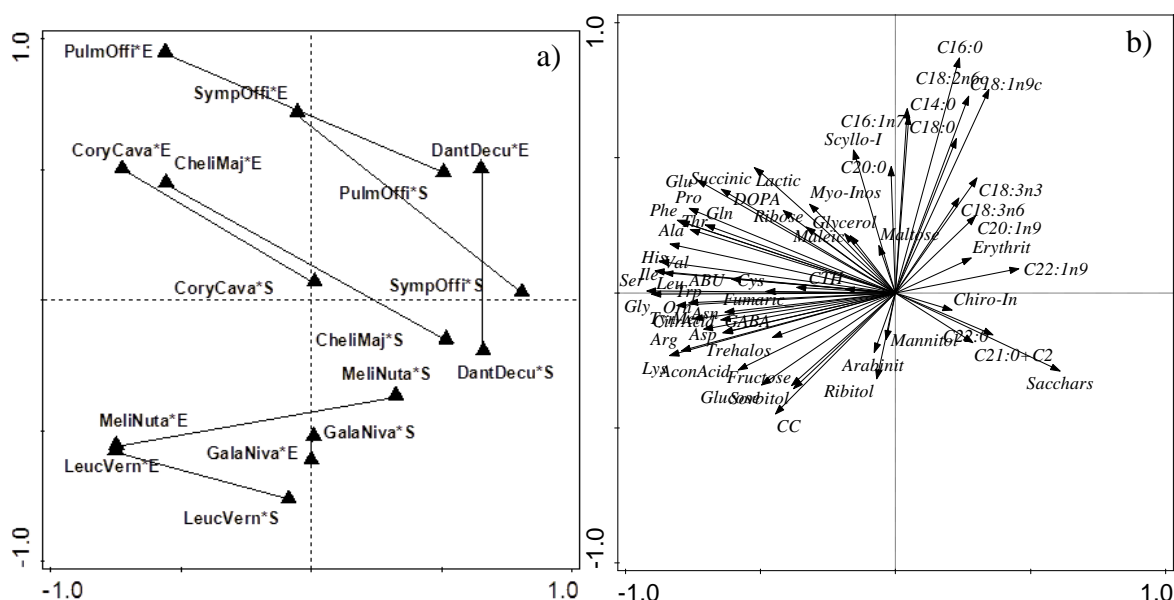


Fig. 10. – Ordination diagram of RDA with individual chemical compounds (a) corresponding ordination with individual chemical compounds (all five chemical groups) and (b) individual chemical compounds of seeds and elaiosomes depicting the differences between elaiosomes and seeds (lines connect parts of one species) interaction with genus (which includes in this case both main effects); $F = 6.0$; $p = 0,0001$, first axes explained 30.21 % of the total variability.

3.3 Individual chemical compounds – hierarchical decomposition

3.3.1 Diaspore

In order to get the hierarchical decomposition of variability, the proportion of explained variability by each level was revealed by RDA. For both diaspore parts, these two levels were examined: *genus* and *family* and also the difference between elaiosomes and seeds (Table 8). For revelation of variability explained by *population* level, which cannot be tested, RDA with interaction of *genus* and *part* as explanatory variable was conducted.

The proportion of variability which is explained by each level differs between groups of chemical compounds. In case of fatty acids and sugars, level *family* explained most of the variability. On the other hand, in amino acids, polyols and organic acids, level *part* had the strongest influence. *Genus*part* interaction alone explained the smallest proportion of the variability.

Table 8. – Results of RDA analyses of individual chemical compounds for each level. Hierarchical decomposition of variability of (a) amino acids, (b) fatty acids, (c) organic acids, (d) polyols and (e) sugars.

a) amino acids.

	trace	DF	MS	F	p
Family	0.1486	3	0.0495	3.5	0.5165
Genus	0.2143	4	0.0536	5.31	0.0001
Population	0.2063	16	0.0129	–	–
Part	0.244	1	0.2440	22.49	0.0001
genus*part	0.1868	7	0.0267	4.1	0.0001

b) fatty acids

	trace	DF	MS	F	p
Family	0.3325	3	0.1108	8.3	0.0827
Genus	0.1673	4	0.0418	3.99	0.0001
Population	0.2196	16	0.0137	–	–
Part	0.0913	1	0.0913	8.14	0.0001
genus*part	0.1893	7	0.0270	3.9	0.0022

c) organic acids

	trace	DF	MS	F	p
Family	0.1615	3	0.0538	3.3	0.3828
Genus	0.1895	4	0.0474	3.55	0.0013
Population	0.3882	16	0.0243	–	–
Part	0.1286	1	0.1286	14.17	0.0002
genus*part	0.1322	7	0.0189	1.56	0.1059

d) polyols

	trace	DF	MS	F	p
Family	0.2116	3	0.0705	4.1005	0.0197
Genus	0.1577	4	0.0394	4.5066	0.0001
Population	0.3833	16	0.0240	–	–
Part	0.0489	1	0.0489	3.2195	0.0020
genus*part	0.1985	7	0.0284	2.37	0.0001

e) sugars

	trace	DF	MS	F	p
Family	0.3049	3	0.1016	7.2	0.1059
Genus	0.1784	4	0.0446	4.1	0.0001
Population	0.2281	16	0.0143	–	–
Part	0.0885	1	0.0885	7.0	0.0005
genus*part	0.2001	7	0.0286	4.0	0.0001

3.3.2 Elaiosome

Separate RDA analyses of elaiosomes variation differences in chemical compounds on two hierarchical levels – *genus* and *family* were examined (Table 9). These analyses revealed in all cases significant influence of *genus level*. In addition, differences in sugars were also highly influenced by the *family level*. Also the rate of variability among populations of the same species was relatively low, particularly in comparison with differences among genera. The variation in particular chemical composition of populations within one genus differed among genera (Fig. 11).

Table 9. – Proportions of explained variability for five chemical groups occurring in elaiosome itself in four levels (family, genus, population and part).

a) amino acids

	trace	DF	MS	F	p
Family	0.2545	3	0.08483	2.3	0.5471
Genus	0.4771	4	0.11928	7.1	0.0001
Population	0.2684	16	0.01678	–	–

b) fatty acids

	trace	DF	MS	F	p
Family	0.33	3	0.11000	3.3	0.2778
Genus	0.3028	4	0.07570	3.3	0.0001
Population	0.3672	16	0.02295	–	–

c) organic acids

	trace	DF	MS	F	p
Family	0.2414	3	0.08047	2.1	0.5459
Genus	0.3402	4	0.08505	3.2	0.0051
Population	0.4184	16	0.02615	–	–

d) polyols

	trace	DF	MS	F	p
Family	0.29303	3	0.09768	2.7	0.443
Genus	0.3691	4	0.09228	4.3	0.0001
Population	0.33787	16	0.02112	–	–

e) sugars

	trace	DF	MS	F	p
Family	0.4559	3	0.15197	5.6	0.0475
Genus	0.2663	4	0.06658	3.8	0.0001
Population	0.2778	16	0.01736	–	–

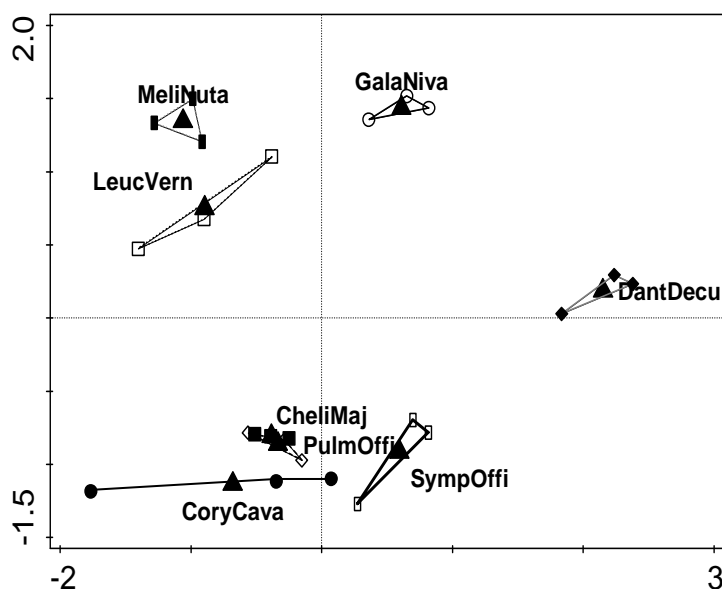


Fig. 11. – Ordination diagram of RDA depicting the differences in individual chemical compounds of elaiosomes among populations ($F = 5.2$; $p = 0.0001$; first axis explained 27.99 % of the total variability); lines connect populations of one genus.

3.3.3 Diaspore parts

RDA of individual chemical compounds revealed significant differences in all five groups, the trends differed, though. All amino acids occurred more in elaiosomes (Fig. 12a; $F = 22.5$; $p = 0.0001$; first canonical axis explained 49.44 %; showed 10 best fitting amino acids). Free fatty acids differed in individual compounds (Fig. 12b; $F = 8.1$; $p = 0.0001$); first canonical axis explained 26.14 % of the total variability). Several shorter chained, therefore easily digestible ones (e.g. C14:0), occurred in elaiosomes and longer in seeds (e.g. C21:0 + C20:2 which cannot be separated). All organic acids occurred more in elaiosomes (Fig. 12c; $F = 14.2$; $p = 0.0002$, first axis explained 38.12 % of the total variability). Some polyols, especially glycerol, were represented in greater amount in elaiosomes, whereas none was in seeds (Fig. 12d; $F = 3.2$; $p = 0.002$; first axis explained 12.28 % of the total variability). In case of sugars, only one disaccharide, respectively saccharose, occurred more in seeds, whereas the other disaccharides and monosaccharides in elaiosome. (Fig. 12e; $F = 6.9$; $p = 0.0005$; first axis explained 23.09 % of the total variability).

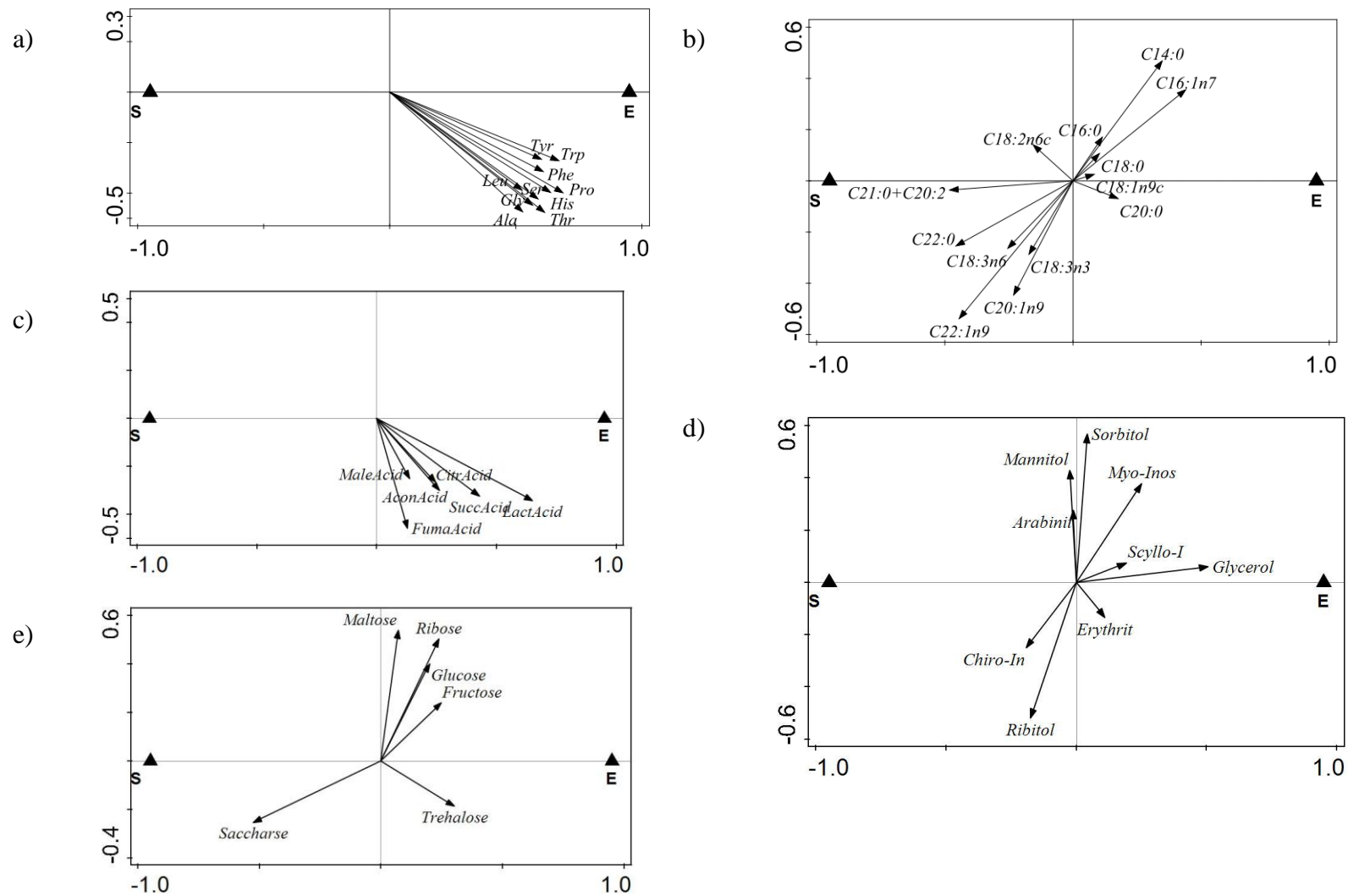


Fig. 12. – Ordination diagrams of partial RDA with differences in seeds and elaiosomes in concentrations of (a) amino acids ($F = 22.5$; $p = 0.0001$; first axis explained 49.44 % of the total variability; showed 10 best fitting compounds out of 26), (b) fatty acids ($F = 8.1$; $p = 0.0001$; first axis explained 26.14 % of the total variability), (c) organic acids ($F = 14.2$; $p = 0.0002$; first axis explained 38.12 % of the total variability), (d) polyols ($F = 3.2$; $p = 0.002$; first axis explained 12.28 % of the total variability) and (e) sugars ($F = 6.9$; $p = 0.0005$; first axis explained 23.09 % of the total variability).

3. Discussion

Elaiosome is an example of a convergence - it has evolved at least 101 times (possibly up to 147 times) independently across angiosperms (Lengyel et al. 2010) from different tissues of seed, fruit or floral parts (Mayer et al. 2005, Ciccarelli et al. 2005). In spite of diverse elaiosome origins, its purpose remains the same – attracting ants and triggering the seed removal (e.g. Kjellsson 1985 – *Carex pilulifera*, Espadaler & Gómez 1997 – *Euphorbia characias*, Konečná 2012 – *Potentilla erecta*). Convergence could be also documented in the chemical content of elaiosomes, because similar differences between elaiosome and seed developed in various taxonomic groups (Fischer et al. 2008), and further because of higher similarity to insects prey of ants than to seeds (Hughes et al. 1994). Only limited number of studies focused on chemical composition of both diaspore parts at higher number of myrmecochorous species (Hughes et al. 1994, Australia; Fischer et al. 2008, Austria). Moreover, Fischer et al. (2008) is the only study, where elaiosome and also seed chemical composition of more myrmecochorous species was analysed in temperate region.

4.1 Composition of major chemical groups

Three out of five detected chemical groups were clearly associated with elaiosomes, specifically AA, organic acids and polyols. The other two chemical groups appear to be independent on the diaspore part. They are mutually negatively correlated – higher FA amount was found in seeds, whereas sugar concentration was higher in elaiosomes (mainly due to the family *Amaryllidaceae*). The most abundant group were in our study sugars, whereas in study Fischer et al. (2008) lipids (more frequent in seeds). However, unlike Fischer et al. (2008), we examined only FA, whereas lipids occurred in elaiosomes also in other forms – mainly diglycerides and triglycerides (less frequently monoglycerides) (Boulay et al. 2006). According to Perternelli et al. (2008), lipids forms in order of their concentrations in elaiosomes are FA, triglycerides and diglycerides, whereas monoglycerides occurred only in one population. The FA was slightly more abundant (in total 1.3 times) in seeds except in species *Danthonia decumbens*. Similarly, Fischer et al. (2008) found significantly higher lipid content in elaiosomes only in family *Dipsacaceae* (three *Knautia* species), no difference in *Fumariaceae*, *Boraginaceae* and *Amaryllidaceae*, moreover in *Ranunculaceae* and *Papaveaceae* lower in elaiosomes. The greatest average difference in chemical content between elaiosomes and seeds was found in case of amino acids - in our target species on average 8.9

times more abundant in elaiosomes. Similar results (7.5 times) were obtained by Fischer et al. (2008), whereas Reifenrath et al. (2012) detected only 3.6 times higher AA content in elaiosomes. As authors mentioned, it is probably a sign of easier digestible chemical compounds presence in elaiosomes. The biggest difference between genera of one family in AA content occurred within *Poaceae*. Whereas *Danthonia decumbens* diaspore parts had rather similar chemical content, *Melica nutans* elaiosome had higher AA content. On the other hand, FA had a reverse trend, dissimilarity in *Danthonia decumbens* and similarity in *Melica nutans* diaspore parts. However, the third *Melica nutans* elaiosome, originated from a sterile bud, was not included in comparisons with other species ones. However, both types of *Melica nutans* contained together the same amount of fatty acids as seed part.

4.2 Interaction genus*part

In all cases, the *genus* level explained considerably higher proportion of variability, than *genus*part* interaction. However, both levels were significant. Therefore, difference between diaspore parts content was great and more or less consistent across unrelated plant genera.

4.3 Individual chemical compounds – hierarchical decomposition

4.3.1 Diaspore

Chemical content of diaspores of myrmecochorous plants is barely studied at more levels. One of these studies is Boieiro et al. (2012) who studied sub-individual, individual and population level. To our knowledge, in our study for the first time is conducted the decomposition of variability between levels *family*, *genus*, *part*, *population* and *genus*part* interaction. This is possible due to the experiment design with even species distribution into families. The hierarchical decomposition of variability showed in three out of five groups (FA, polyols and sugars) identical order of explained variability rates (in terms of MS), respectively *family* > *part* > *genus* > *genus*part* > *population*. Whereas in group organic acids the order *part* > *family* > *genus* > *population* > *genus*part* and in AA *part* > *genus* > *family* > *genus*part* > *population* were found.

In all these cases, the smallest amount of variability is explained by population, followed by *genus*part*, with exception of organic acids, where the order of the two least powerful explanatory terms is reversed. It means that despite some variability among populations of one species, this variability is always lower than variability among genera. The low value of variability explained by interaction signifies that the differences between seeds and elaiosomes are very consistent in various taxonomical groups.

4.3.2 Elaiosome

In case of ant attractive diaspore part – elaiosome – was the order of the explained variability rates in *order family* > *genus* > *population* for all chemical groups but AA. Their order of rates was *genus* > *family* > *population*.

4.3.3 Family

It seems that there are rather large differences between families, but these are mostly not significant, because we considered individual genera to be independent “replications” for individual families (which is expressed by the fact that genus is a factor with random effect and is reflected by applied hierarchical permutation scheme). Therefore, we were not able to get sufficient number of replications for the test of differences among families. This is, however, a general phenomenon. In most cases, only one target species or at most 3 species in one family in the study (Fischer et al. 2008) compared to two species in each out of our 4 target families. Our eight target plant species belonged to different taxonomical groups (4 monocots, 4 dicots). Selected monocots (Liliopsida), specifically families *Amaryllidaceae* and *Poaceae* differed on the subclass level – Liliidae, respectively Commelinidae. Dicots belong to families *Boraginaceae*, which belongs to one of the most derived taxonomical classes of eudicots – Euasterids I in Asterids, on the other hand *Papaveraceae* belong to Ranunculales from basal eudicots. This level can explain the biggest rate of variability in most cases. The trend of the difference between diaspore parts is with a few exceptions consistent over our target families; however, the rate of distinction differs. *Amaryllidaceae* is the most consistent target family in the chemical content, both diaspore parts originated from the same tissue – seed. This similarity could be also caused by the fact, that genera *Galanthus* and *Leucojum* belong to the same tribus. Therefore they are the most relative genera within family in our experiment. On the other hand, the most differing group was *Poaceae*. Also monocots differed a lot but their diaspore parts did not originated from the same tissue as in the previous case. This suggests that the chemical composition of elaiosomes is determined not only by taxonomical similarities, but also by the morphological origin of elaiosomes. This is particularly visible in cases of elaiosome origin from different plant tissues in different genera of the same family.

4.3.4 Genus

A great difference between genera in their chemical composition was found even within families. The greatest one was found in the family *Poaceae* at *Melica nutans*. Although chemical composition of both elaiosome parts – bud and also glum origin – was studied at

this species, in the statistical analysis only glum part was used, in order to have comparable samples within the family *Poaceae*, but also bud probably play a role in myrmecochory. *Melica nutans* have two types of diaspores with or without elaiosome originating from the bud. Chemical content of the bud originated elaiosomes differed from glum originated ones in content of our target chemical groups. Amino acids were in the bud more abundant than in seed only approximately twice whereas in glumes 8.9 times. Fatty acids of both elaiosomes types together contained the same concentration of free fatty acids as seeds. Concentrations of sugars were comparable in all three parts of the diaspore. In case of polyols and organic acids was the concentration in bud similar to seed and lower than in glum.

4.3.5 Populations

Characteristics of populations of myrmecochorous plants differed widely. For instance, the study of Boulay et al. (2006) mentioned variation in elaiosome size and also in the probability of diaspore removal between populations of the species *Helleborus foetidus*. The influence of the population on chemical contents was not studied very closely in previous studies. The rare exceptions are articles by Boulay et al. (2006, 2 populations of *Helleborus foetidus*) and Boieiro (2012, 4 populations of *Euphorbia characias*) which revealed important differences, e.g. significant distinction between fatty acids composition (Boieiro et al. 2012). In our study, the population level could not be tested, because we had 3 population of one species, each represented by one sample, the proportion of explained variability of this level can be counted though (this is the residual variation in the analysis). The revealed proportion of explained variability indicate, that differences between population should not be neglected, although they are probably the least powerful explanatory level in all but one case - organic acids. In this group there was found the highest proportion of explained variability within our compound groups sum by *population level*, respectively (MS = 0,0243) for diaspore and for elaiosome (MS = 0,0261). This proportion of explained variability is much smaller than the one explained by *genus* or *family* level. Therefore, we can conclude that although the differences among individual populations are not negligible, the differences among genera and families are much larger, and so the chemical content is rather taxonomically specific on the studied taxonomical levels.

4.3.5 Diaspore parts

Diaspores of our target plant species were divided into elaiosome and seed part (the rest of diaspore). However, both parts can have the same origin – seed tissues, other possible origins are fruit and floral parts (Mayer et al. 2005) Elaiosomes of our target species also

originated from different plant tissues – seed (*Amaryllidaceae* and *Papaveraceae*) or fruit parts (*Boraginaceae* and *Poaceae*), which suggests that elaiosomes and seeds of the first two families should be more similar to each other. This seems to be true only in case of *Amaryllidaceae*, in our study the most consistent family in chemical composition, especially the species *Galantus nivalis*.

4.3.5.1 Amino acids

Reifenrath et al. (2012) found out, that preference of different ant species was influenced by amino acids content. In our chemical analysis and also in Fischer et al. (2008), amino acids were the group with the greatest difference in concentrations between elaiosomes and seeds. Moreover, also the hierarchical decomposition of variability showed in this chemical group the greatest proportion explained by *part* followed by *genus*. The trend of higher concentrations in elaiosomes was consistent in all detected amino acids.

4.3.5.2 Free fatty acids

This group is considered as an attracting group for ants (Reifenrath 2012), but effect of individual fatty acids was not supported. Lipids occurred in elaiosomes in three forms: triglycerides, diglycerides and free fatty acids (Boulay et al. 2006). We studied only free fatty acids, in total 14 of them was found in the diaspores of our target species. Their content did not significantly differ between diaspore parts; moreover, this group was slightly more abundant in seeds except from all three examined populations of *Danthonia decumbens*, two of *Leucojum vernum* and one population *Symphytum officinale*. In the study by Fischer et al. (2008), which focused on all lipids, significant difference between seeds and elaiosomes was not also found and elaiosome of species *Leucojum vernum* was distinct from other elaiosomes. They found significantly lower lipid content in *Chelidonium majus* elaiosomes. Higher lipid content occurred only in family *Dipsacaceae*, in *Knautia arvensis* (two times) higher but it was less than 5 % in 4 out of 15 species.

Trends in fatty acids of elaiosomes of different species should be more similar to each other than to the respective seed of the same species (Fischer et al. 2008 – 15 species, Boieiro et al. 2012 – 1 species), studies differed in the order of their content. In our study, the most abundant chemical compound in elaiosomes was linoleic acid, followed by palmitic acid and oleic acid. Further, the study of Fischer et al. (2008) and Boieiro et al. (2012) detected oleic acid as the dominant fatty acid present in elaiosomes, whereas seeds were dominated by linoleic acid (Fischer et al. 2008). Further, in Boieiro et al. 2012, palmitic acid was second most abundant fatty acid, other ones only reached up to 5 %. Linoleic acid is essential fatty

acid for most of insects (Lanza et al. 1992). Differences could be caused by individual species and according to palmitic acid (C16:0) was the most abundant in elaiosomes in September and linoleic in October (Perternelli et al. 2008; *Mabea fistulifera*).

4.3.5.3 Organic acids

To our knowledge, organic acids were not studied yet. The hierarchical decomposition of variability showed the greatest proportion explained by *part* followed by family in this chemical group. All detected organic acids showed trend in higher occurrence in elaiosomes.

4.3.5.4 Polyols

To our knowledge, no other study focused on these compounds. In Fischer et al. (2008), the chemical analysis revealed that soluble carbohydrates contained sugars, including also polyols. However, the trend of these two groups in our study differed. Higher total sum of polyols across all target species was associated with elaiosomes whereas sugars were roughly equally represented in two parts of the diaspore. The same trend in polyols occurred also in majority of populations with an exception of *Chelidonium majus*, slightly more polyols occurred in its seeds (and one population of *Leucojum vernum* and *Danthonia decumbens*). We detected in total 9 different polyols, from which glycerol had the most clear trend of higher concentration in elaiosomes. Only the study of Fischer et al. (2008) mentioned two different polyols, glycerol and myo-inositol, in comparison with 9 different polyols detected by us. They found higher concentration of glycerol in seeds, whereas we found clear association of glycerol occurrence with elaiosomes and the higher amount of myo-inositol in elaiosomes was mutual to both studies.

4.3.5.5 Sacharids

We found higher total sum of sugars in elaiosomes than in corresponding seeds across all target species, similarly to Fischer et al. (2008). Further, sum of five out of six detected sugars was found with higher concentration in elaiosomes. The order of their frequency was trehalose, fructose, ribose, glucose, maltose and saccharose. Last mentioned saccharose, a disaccharide, was the only sugar more frequent in seeds what corresponds with findings of Fischer et al. (2008), where it composed 74.9 % of all saccharides in seeds, whereas elaiosomes had more evenly distributed concentration of all sugars. Bresinsky (2014) mentioned concentration of hexoses, in our case fructose, glucose and saccharose as important for the ant removal and disaccharides, e.g. trehalose, maltose occurring in our elaiosomes, whereas saccharose more in seeds. Which is in contrast to findings of Bresinsky

(2014), who frequently detected saccharose and no ribose in elaiosomes. Other discrepancy is with findings of Fischer et al. (2008). In our study, no oligosaccharids has been found. The highest total sum of saccharides was detected in elaiosomes of *Galanthus nivalis*. On the contrary, Fischer et al. (2008) mentioned higher content (above 10 % dry mass) in family *Amaryllidaceae* represented by *Galanthus nivalis* and *Leucojum vernum*, further Bresinsky (2014) stated, that the sweet taste of *Galanthus* can be even recognised by human sense. The total content of sugars differed widely even within species. Several species, i.e. *Corydalis cava*, *Chelidonium majus*, *Leucojum vernum* and *Melica nutans* did not show even uniform trend in the higher occurrence in seeds or elaiosomes. Only *Danthonia decumbens* showed higher content of sugars in seeds in all of the populations. *Chelidonium* species are mentioned as one of few exceptions with no sugars in elaiosomes, which is in conflict with this study and with Fischer et al. (2008) where was found concentration above 10 %.

Since the species and also populations differed widely, all comparisons with previous studies and generalizations should be done with great caution. There is probably no danger of the bias caused by collecting of certain part of the plant. Boieiro et al. (2012) uncovered, that the position of a fruit on plant (species *Euphorbia characias*) does not influence the composition of fatty acids. On the other hand, there is a danger of picking up not completely mature diaspores, which can vary greatly from immature diaspores (Ciccarelli 2005 – *Myrtus communis*; Perternelli et al. 2008 – *Mabea fistulifera* – lipids). This problem could occur mainly because of the huge fresh diaspore amount needed for the analysis and because of limited period of the optimum phase of the diaspores present on plants before ejecting. Also seeds from different individuals from one population differed in the free fatty acid content (Boieiro et al. 2012). Despite all these facts, several different trends have been found in the manner that the phylogenetic relationships reflect the chemical composition of elaiosomes and seeds and also the differences within species.

References

- Boieiro M., Espadaler X., Gómez C. & Eustaquio A. (2012): Spatial variation in the fatty acid composition of elaiosomes in an ant-dispersed plant: Differences within and between individuals and populations. – *Flora* 207:497–502.
- Boulay R., Coll-Toledano J. & Cerda X. (2006): Geographic variations in *Helleborus foetidus* elaiosome lipid composition: implications for dispersal by ants. – *Chemecology* 16: 1–7.
- Bresinsky A. (2014): Ants, Plants and fungi: a view on some patterns of interaction and diversity. – In: Lüttge U. & Beyschlag W, *Progress in botany 75*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. p. 3-54.
- Brew C. R., Odowd D. J. & Rae I. D. (1989): Seed dispersal by ants - Behavior-releasing compounds in elaiosomes. – *Oecologia* 80: 490–497.
- Caut S., Jowers M. J., Cerda X. & Boulay R. R. (2013): Questioning the mutual benefits of myrmecochory: a stable isotope-based experimental approach. – *Ecological entomology* 38: 390–399.
- Chlumský J., Koutecký P., Jílková V. & Štech M. (2013): Roles of species-preferential seed dispersal by ants and endozoochory in *Melampyrum* (Orobanchaceae). – *Journal of plant ecology* 6: 232–239.
- Ciccarelli D., Andeucci A. C., Pagni A. M. & Garbari F. (2005): Structure and development of the elaiosome in *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) seeds. – *Flora* 200: 326–331.
- Culver D. C. & Beattie A. J. (1978): Myrmecochory in *Viola*: dynamics of seed-ant interactions in some West Virginia species. – *Journal of Ecology* 66: 53–72.
- Espadaler X. & Gómez C. (1997): Soil surface searching and transport of *Euphorbia characias* seeds by ants. – *Acta oecologica-international journal of ecology* 18: 39–46.
- Fischer R. C., Ölzant S. M., Wanek W. & Mayer V. (2005): The fate of *Corydalis cava* elaiosomes within an ant colony of *Myrmica rubra*: elaiosomes are preferentially fed to larvae. – *Insectes Sociaux* 52: 55–62.
- 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: 539–547.
- Gammans N. & Bullock J. M. (2005): Ant benefits in a seed dispersal mutualism. – *Oecologia* 146: 43–49.
- Gammans N., Bullock J. M., Gibbons H. & Schönrogge (2006): Reaction of mutualistic and granivorous ants to *Ulex* elaiosome chemicals. – *Journal of chemical ecology* 32: 1935–1947.
- Gómez C. & Espadler X. (2013): An update of the world survey of myrmecochorous dispersal distances. – *Ecography* 36: 1193–1201.
- Gómez C., Espadler X. & Bas J. M. (2005): Ant behaviour and seed morphology: a missing link of myrmecochory. – *Oecologia* 146: 244–246.
- Gorb S. N., Gorb E. V. & Puntila P. (2000): Effects of redispersal of seeds by ants on the vegetation pattern in a deciduous forest: A case study. – *Acta Oecologica* 21: 4–5.
- Gorb S. N. & Gorb E. V. (1995): Removal rates of seeds of 5 myrmecochorous plants by the ant *Formica-polyctena* (Hymenoptera, Formicidae). – 73: 367–374.
- Hughes L., Westoby M. & Jurado E. (1994): Convergence of elaiosomes and insect prey: evidence from ant foraging behaviour and fatty acid composition. – *Functional ecology* 8: 358–365.
- Hušek P. (1997): Urine organic acid profiling by capillary gas chromatography after a simple pretreatment. – *Clinical Chemistry* 43: 1999–2001.
- Kjellsson G. (1985): Seed fate in a population of *Carex pilulifera* L. – *Oecologia* 67: 416–423.

- Košťál V., Doležal R., Rozsypal J., Moravcová M., Zahradníčková H. & Šimek P. (2011a): Physiological and biochemical analysis of overwintering and cold tolerance in two Central European populations of the spruce bark beetle, *Ips typographus*. – *Journal of Insect Physiology* 57: 1136–1146.
- Košťál V., Zahradníčková H. & Šimek P. (2011b): Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. – *PNAS* 108: 13041–13046.
- Lanza J., Schmitt M. A. & Awad, A. B. (1992): Comparative chemistry of elaiosomes of 3 species of *Trillium*. – *Journal of chemical ecology* 18: 209–221.
- Leal L. C., Neto M. C. L., de Oliveira A. F. M., Andersen A. N. & Leal I. R. (2014): Myrmecochores can target high-quality disperser ants: variation in elaiosome traits and ant preferences for myrmecochorous Euphorbiaceae in Brazilian Caatinga. – *Oecologia* 174: 493–500.
- Lengyel S., Gove A. D., Latimer A. M., Majer J. D., Dunn R. R. (2010): Convergent evolution of seed dispersal by ants, and phylogeny and biogeography in flowering plants: A global survey. – *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12: 43–55.
- Mark S. & Olesen J. M. (1996): Importance of elaiosome size to removal of ant-dispersed seeds. – *Oecologia* 107: 95–101.
- Oberrath R. & Bohning-Gaese K. (2002): Phenological adaptation of ant-dispersed plants to seasonal variation in ant activity. – *Ecology* 83: 1412–1420.
- Peternelli E. F. D., Barbosa L. C. A. & Della Lucia T. M. C. (2008): Isolation of compounds attractive to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) from *Mabea fistulifera* elaiosome. – *Quimica Nova* 31: 475–478.
- Pfeiffer M., Huttenlocher H. & Ayasse M. (2010): Myrmecochorous plants use chemical mimicry to cheat seed-dispersing ants. – *Functional Ecology* 24: 545–555.
- Pizo M. A. & Oliveira P. S. (2001): Size and lipid content of nonmyrmecochorous diaspores: effects on the interaction with litter-foraging ants in the Atlantic rain forest of Brazil. – *Plant Ecology* 157: 37–52.
- Pizo M. A., Passos L. & Oliveira P. S. (2005): Ants as seed dispersers of fleshy diaspores in Brazilian Atlantic forests. – In: Forget P. M., Lambert J. E., Hulme P. E. & Vander Wall S. B., Seed fate predation, dispersal and seedling establishment, Cabi publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK, p. 315–330.
- Reifenrath K., Becker Ch. & Poethke J. H. (2012): Diaspore Trait Preferences of Dispersing Ants. – *Journal of chemical ecology* 38: 1093–1104.
- Schmeer K., Nicholson G., Zhang S., Bayer E. & Bohning-Gaese K. (1996): Identification of the lipids and the ant attractant 1,2 dioleoylglycerol in the arils of *Commiphora guilaumini* Perr. (Bursaceae) by supercritical fluid chromatography – atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. – *Journal of chromatography* 727: 139–146.
- Sernander R. (1906): Entwurf einer Monographie der europäischen Myrmekochoren. *Kungliga Svenska Vetenskapsakad.* – *Handlingar* 41: 1–410.
- Servigne P. & Detrain C. (2009): Seed desiccation limits removal by ants. – *Arthropod-Plant Interactions* 3: 225–232.
- StatSoft (2013): STATISTICA (data analysis software system), version 12. – StatSoft Inc., URL: [www.statsoft.com].
- Šmilauer P. & Lepš J. (2014): *Multivariate analysis of ecological data using Canoco5*. – Cambridge University Press, Cambridge.
- ter Braak C. J. F. & Šmilauer P. (2012): *CANOCO Reference manual and User's guide: Software for ordination (version 5.0)*. – Microcomputer Power, Ithaca, NY.

- Vander Wall S. B. & Longland W. S. (2004): Diplochory: are two seed dispersers better than one? – *Trends in Ecology & Evolution* 19: 155–161.
- Vittoz P. & Engler R. (2007): Seed dispersal distances: a typology based on dispersal modes and plant traits. – *Botanica Helvetica* 117: 109–124.
- Zahradníčková H., Tomčala A., Berková P., Schneedorferová I., Okrouhlík J. Šimek P. & Hodková M. (2014): Cost effective, robust, and reliable coupled separation techniques for the identification and quantification of phospholipids in complex biological matrices: Application to insects. – *Journal of separation science* 37: 2062–2068.

Appendix

Table I. – Detected amino acids in elaiosomes and seeds.

systematic name	abbreviation
3,4-Dihydroxyalanine	DOPA
aminobutyric acid	ABU
arginin	Arg
asparagine	Asn
aspartic acid	Asp
cystathionine	CTH
cysteine	Cys
cystine	CC
fenylalanine	Phe
glutamic acid	Gln
glutamine	Glu
glycine	Gly
histidine	His
isoleucine	Ile
leucine	Leu
lysine	Lys
methionine	Met
ornithine	Orn
phenylalanin	Phe
proline	Pro
serine	Ser
threonine	Thr
tryptofane	Trp
tyrosine	Tyr
valine	Val
minobutyric acid	GABA

Table II. – Detected fatty acids in elaiosomes and seeds.

systematic name	lipid number
arachidic acid	C20:0
behenic acid	C22:0
erucic acid	C22:1n9
γ -Linolenic acid	C18:3n6
gondoic acid	C20:1n9
heneicosylic acid + eicosadienoic acid	C21:0 + C20:2
linoleic acid	C18:2n6c
linolenic acid	C18:3n3
myristic acid	C14:0
oleic acid	C18:1n9c
palmitic acid	C16:0
palmitoleic acid	C16:1n7
stearic acid	C18:0

Table III. – Detected organic acids in elaiosomes and seeds.

systematic name
Aconitic acid
Citric acid
Fumaric acid
Lactic acid
Maleic acid
Succinic acid

Table IV. – Detected polyols in elaiosomes and seeds.

systematic name
arabinitol
erythritol
glycerol
chiro-Inositol
mannitol
myo-Inositol
ribitol
scyllo-Inositol
sorbitol
threitol

Table V. – Detected sugars in elaiosomes and seeds.

monosaccharide	disaccharide
fructose	maltose
glucose	saccharose
ribose	trehalose
