

1 Einleitung und Fragestellung

Bei Tieren, die in Gruppen leben kommt es vor, daß einige Gruppenmitglieder auf eigene Reproduktion verzichten. Kommen zu diesem Verzicht auf eigene Reproduktion noch überlappende Generationen und kooperative Brutpflege hinzu, so werden die Arten als eusozial bezeichnet (Michener 1969 und 1974; Wilson 1971). Alle Ameisenarten, einige Bienen- und Wespenarten, alle Mitglieder der Hymenopteren, sowie Termiten erfüllen dieser Kriterien. Desweiteren wurde Eusozialität bei Blattläusen (Itô 1989), Ambrosiakäfern (Kent und Simpson 1992), Thysanoptera (Crespi 1992a), Nacktmulle (Sherman et al. 1991; Jarvis et al. 1994) und Garnelen (Duffy 1996) gefunden.

Eusoziale Arten haben in der Evolutionsbiologie eine besondere Stellung, denn der Verzicht einiger Individuen auf eigene Reproduktion bringt aus evolutiver Sicht Probleme mit sich, da diese altruistischen Individuen keine direkten Gene in die nächste Generation weitergeben. Altruistisches Verhalten führt somit dazu, daß ein Individuum, welches dieses Verhalten zeigt, die Überlebenswahrscheinlichkeit oder Produktion von Nachkommen eines anderen Individuums steigert (Nutzen), während es seine eigene Überlebenswahrscheinlichkeit oder Nachkommenproduktion vermindert (Kosten). Hamilton (1964a und b) spezifizierte in seiner Theorie der Verwandtenselektion die Bedingungen, unter denen altruistisches Verhalten evolviert als:

$$c / b < r \quad (\text{Hamilton's Regel})$$

d.h. wenn das Verhältnis aus Kosten (c) für den Altruisten und Nutzen (b) für den Rezipienten geringer ist als die Verwandtschaft (r) zwischen Rezipient und Altruist, dann wird sich das Gen für altruistisches Verhalten ausbreiten (für ausführliche Diskussion siehe Bourke und Franks 1995; Crozier und Pamilo 1996). Somit ist nach der Verwandtenselektionstheorie, der Verzicht einiger Individuen auf eigene Reproduktion, evolutionsbiologisch kein Problem, solange die Gruppenmitglieder ausreichend miteinander verwandt sind.

Das haplodiploide Geschlechtsbestimmungssystem der Hymenopteren, bei denen Männchen aus haploiden Eier entstehen (Arrhenotokie), bedingt zwischen den Weibchen einer Kolonie einen hohen Verwandtschaftsgrad. Betrachtet man die einfachste Kolonieforn, eine Königin, die nur einmal verpaart ist, so erhalten alle Töchter vom Vater die gleichen Gene,

woraus zwischen Schwestern ein Verwandtschaftsgrad von $r = 0,75$ resultiert (Life-for-Life-Verwandtschaftskoeffizient; Hamilton 1972; Grafen 1986), was den Verwandtschaftsgrad, den sie zu ihren eigenen Töchtern haben ($r = 0,5$) übersteigt. Dadurch wird, über die Verwandtenselektion, die Evolution des reproduktiven Altruismus zwischen den Arbeiterinnen erleichtert (Hamilton 1964b, 1972).

Gleichzeitig führt die Haplodiploidie aber aufgrund der asymmetrischen Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Kolonien zu Konflikten zwischen den Gruppenmitgliedern (Hamilton 1964b). Arbeiterinnen sind mit ihren Schwestern ($r = 0,75$) näher verwandt als mit ihren Brüdern ($r = 0,25$), wodurch sie die Aufzucht von Schwestern gegenüber Brüdern vorziehen sollten, was zu einem weibchenlastigen Geschlechterverhältnis bei der Produktion von Geschlechtstieren führen sollte. Dagegen sind die Königinnen mit ihren weiblichen und männlichen Nachkommen gleich verwandt ($r = 0,5$), d.h. sie sollten ein 1:1-Verhältnis bevorzugen, wodurch Konflikte zwischen den Arbeiterinnen und der Königin bezüglich des zu produzierenden Geschlechterverhältnisses bestehen (Hamilton 1972; Trivers und Hare 1976). Desweiteren sind Arbeiterinnen mit ihren Söhnen ($r = 0,5$) und den Söhnen ihrer Schwestern ($r = 0,375$) näher verwandt, als mit ihren Brüdern ($r = 0,25$), so daß sie eigene Männchen und Neffen produzieren sollten, was wiederum zu einem Konflikt zwischen Arbeiterinnen und Königin führt (Hamilton 1964b, 1972; Trivers und Hare 1976). Diese Vorhersagen gelten allerdings nur bei monogynen Kolonien, bei denen die Königin nur einmal verpaart ist (monoandrisch). Die Verwandtschaftsstruktur innerhalb der Kolonien bestimmt somit die Konflikte, wobei zwischen potentiellen und aktuellen Konflikten unterschieden werden sollte (Ratnieks und Reeve 1992). Denn die durch die genetische Struktur vorhergesagten potentiellen Konflikte müssen nicht unweigerlich zu sichtbaren, aktuellen Konflikten in den Kolonien führen, da zusätzliche Faktoren, wie Kosten der Manipulation, Resistenz gegenüber der Manipulation oder Gegenmanipulation, diese verhindern können (Cole 1986; Ratnieks und Reeve 1992; Nonacs 1993b; Reeve und Ratnieks 1993). Eine Änderung der genetischen Struktur, z.B. aufgrund der Mehrfachpaarung der Königinnen, reduziert den potentiellen Königinnen-Arbeiterinnen-Konflikt bezüglich des zu produzierenden Geschlechterverhältnisses (Boomsma und Grafen 1990, 1991; Pamilo 1991) und der Männchenproduktion (Starr 1984; Woyciechowski und Lomnicki 1987). Insgesamt wird die genetische Struktur innerhalb der Kolonien durch die Anzahl und den Verwandtschaftsgrad der Königinnen, die Paarungshäufigkeit der Königinnen und den Grad der Inzucht bestimmt. Da

Inzucht bei Ameisen eher selten auftritt (Gadagkar 1991), bedingt hauptsächlich die Anzahl reproduzierender Individuen (Mütter und Väter) die genetische Zusammensetzung der Kolonien (Queller 1993a; Ross 1993).

Damit die Theorien zu den innerhalb sozialer Insektenkolonien auftretenden Verwandtenkonflikten, und somit letztendlich auch die Verwandtenselektionstheorie getestet werden können, müssen die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den beteiligten Individuen bekannt sein. Die Analyse dieser genetischen Struktur innerhalb der Kolonien kann mit Hilfe von molekularen Markern erfolgen. Einmal mittels Allozymuntersuchungen (z.B. Pamilo 1993; Ross 1993; Heinze et al. 1995), die allerdings lediglich einen durchschnittlichen Verwandtschaftsgrad innerhalb einer Kolonie vor dem Hintergrund des Populationmittels berechnen, Aussagen über intrakoloniale individuelle Beziehungen aber nicht ermöglichen (Queller und Goodnight 1989; Pamilo 1984, 1990). Die Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse einzelner Individuen einer Kolonie zueinander wurde erst durch die Entwicklung hochvariabler molekularer Marker auf DNA-Ebene, wie dem DNA Fingerprinting (Jeffreys et al. 1985a) oder den Mikrosatelliten (Tautz 1989), möglich.

Das DNA-Fingerprinting beruht auf der erhöhten Variabilität in der DNA-Sequenz bestimmter nicht-kodierender Regionen innerhalb des eukaryontischen Genoms, zwischen kodierenden Genen und in Introns, die als hypervariable Regionen bezeichnet werden. Diese Regionen bestehen aus kurzen, vielfach hintereinandergeschalteten Basensequenzen, sog. "tandem repeats", die sehr GC-reich sind, eine Länge von 9-40 Basenpaaren (bp) aufweisen und deshalb als Minisatelliten bezeichnet werden (Wyman und White 1980; Jeffreys et al. 1985a; Debenham 1992; alternativ werden diese Loci oft auch als VNTRs, d.h. Variable Number of Tandem Repeats, bezeichnet). Die hohe Variabilität der Minisatelliten beruht auf einer hohen Mutationsrate und der selektiven Neutralität der wohl meisten Mutationen (Studer und Epplen 1989). Diese Mutationsrate liegt für menschlicher DNA bei ca. 10^{-4} pro Kilobase (kb) (Jeffreys 1987), für Honigbienen bei 10^{-3} bis 10^{-4} pro kb (Estoup et al. 1995), während die durchschnittliche Rekombinationsrate von kodierenden Regionen mit 10^{-5} pro kb um ein bis zwei Zehnerpotenz niedriger ist (Lewin 1991). Da es sich dabei um den Verlust oder Gewinn ganzer Wiederholungseinheiten handelt, geht man davon aus, daß die Erhöhung der Mutationsrate aufgrund ungleicher Rekombination zwischen falsch gepaarten Minisatelliten von Schwesterchromatiden oder eines Fehlers bei der Replikation entsteht (Jeffreys 1987; Wolff et al. 1991; Strand 1993).

Viele der repetitiven Sequenzen evolvierten aus einer gemeinsamen Kern-Sequenz oder einem Satz solcher Sequenzen, wodurch jeder hypervariable Locus eine gewisse Sequenzähnlichkeit mit vielen anderen Loci im Genom aufweist (Jeffreys et al. 1985a). Durch die Verwendung von sog. Multilokus-Sonden, die gleichzeitig eine Vielzahl im Genom verstreut liegender, hypervariabler Regionen nachweisen, entsteht ein Multilokus-DNA-Fingerprint (z.B. Jeffreys et al. 1985b, 1987). Solche Multilokus-Sonden sind z.B. die synthetischen Oligonukleotidsonden, d.h. kurze Nukleinsäure-Moleküle aus 2-6 Nukleotiden, die sich 3-8 mal wiederholen, und deren Einsatz die Technik des DNA-Fingerprintings erheblich vereinfacht (Ali et al. 1986; Eppel et al. 1991).

Das Multilokus-DNA-Fingerprinting wurde in den letzten Jahren vielfach zur Klärung von Fragen in der Populationsbiologie und Verhaltensökologie im Tierreich angewendet (z.B. Lehmann et al. 1992; Haig et al. 1993; Mörsch und Leibenguth 1993). Damit konnten die Paarungssysteme z.B. vieler Vogelarten und damit verbundene Fragestellungen genauer untersucht werden (Burke und Bruford 1987; Burke et al. 1989; Birkhead et al. 1990; Møller und Briskie 1995; Haydock et al. 1996; Quinn et al. 1999). Das Hauptaugenmerk bei den Multilokus-DNA-Fingerprintuntersuchungen liegt dabei auf der Paarungshäufigkeit und dem Reproduktionserfolg einzelner Männchen (Pemberton et al. 1992; Hartley et al. 1993; Bercovitch und Nürnberg 1997) oder Weibchen (Blanchetot 1991; Moritz et al. 1991; Gadau et al. 1996).

Mit Hilfe der Technik des Multilokus-DNA-Fingerprintings sollte bei *Pachycondyla villosa*, einer Art der Ameisenunterfamilie der Ponerinae, das Paarungssystem und die genetische Struktur der Kolonien genauer untersucht werden.

Die meisten Daten zur Paarungshäufigkeit bei Ameisen beruhen auf der Beobachtung der Anzahl der Paarungspartner von Königinnen (Hölldobler und Wilson 1990, S: 156; Keller und Reeve 1994a). Dabei ist aber nicht sichergestellt, ob bei jeder Paarung Spermien übertragen werden, oder inwieweit z.B. aufgrund von Spermienkonkurrenz, die Präsenz des väterlichen Erbmaterials nach der Paarung noch gegeben ist. Erst durch die genetische Untersuchung der Nachkommen einer Königin können Aussagen über die tatsächlichen Anzahl der Paarungspartner gemacht werden.

Das gleiche trifft auf die Anwesenheit mehrerer Königinnen in einem Nest zu. Auch hier ist nicht die numerische Anzahl entscheidend, sondern die Anzahl der sich tatsächlich

fortpflanzenden Königinnen. Durch das Auffinden von Gründungskolonien von *P. villosa* mit mehreren Königinnen, konnte zum ersten mal für die Unterfamilie der Ponerinae zunächst das Verhalten von assoziierten Königinnen bei der Gründung von Kolonien, sowie das Wachstum der Kolonien genauer untersucht werden. Da in den meisten Fällen Koloniegründungen durch mehrere Königinnen nach der Gründungsphase, aufgrund aggressiver Interaktionen, in monogyne Kolonien übergehen (z.B. Hölldobler und Wilson 1990, S. 217; Heinze 1993), war bei *P. villosa* das Schicksal und Verhalten der Königinnen von besonderem Interesse. Durch das Ausbleiben einer Regulation zu monogynen Kolonien konnte auch das Verhalten der assoziierten Königinnen nach der Gründungsphase untersucht werden. Dabei sollte mittels genetischer Untersuchungen die Anzahl der sich in einer Kolonie reproduzierenden Königinnen, deren Verwandtschaftsgrad, sowie der Anteil der jeweiligen Königin an der Produktion von Arbeiterinnen und besonders von Geschlechtstieren festgestellt werden.

Frühere Untersuchungen (Heinze et al. 1996) hatten gezeigt, daß sich in Anwesenheit der Königinnen Arbeiterinnen von *P. villosa* nicht an der Reproduktion beteiligen. Erst nach Isolation von der Königin beginnen Arbeiterinnen mit der Eiablage, und aggressive Interaktionen führen zur Ausbildung von Dominanzhierarchien, wobei sich in der Regel aber immer mehrere Arbeiterinnen an der Reproduktion beteiligen. Durch die Untersuchungen von Arbeiterinnengruppen, besonders der genetischen Analyse der produzierten Männchen und ihren potentiellen Müttern, sollte festgestellt werden, inwieweit die Stellung in der Dominanzhierarchie mit der Fekundität einer Arbeiterin und letztendlich mit der Anzahl produzierter Söhne korreliert ist.