

3 Paarungshäufigkeit der Königinnen und band sharing-Koeffizienten

3.1 Einleitung

Die Anzahl der Patrilinearitäten in Kolonien, bedingt durch die Paarungshäufigkeit der Königinnen, ist einer der Hauptfaktoren, welche die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Kolonien eusozialer Hymenopteren bestimmen. Ameisenköniginnen paaren typischerweise nur einmal in ihrem Leben, wobei Königinnen der Treiberameisen *Eciton* eine Ausnahme darstellen könnten (aber siehe Bourke and Franks 1995). Die Spermien werden nach der Paarung in der Spermatheka gespeichert und müssen bis zum Ende der reproduktiven Phase einer Königin ausreichen. Mehrfachpaarungen (Polyandrie) vermindern den Verwandtschaftsgrad zwischen den weiblichen Tieren der Kolonien, und können dadurch zahlreiche Aspekte der sozialen Organisation einer Kolonie und die Aufteilung der Reproduktion beeinflussen (Queller 1993; Ross 1993; Bourke und Franks 1995; Crozier und Pamilo 1996). Außerdem beinhalten mehrere Paarungen für die Königinnen Kosten, z.B. durch größeren Energieaufwand, oder ein erhöhtes Risiko verletzt oder gefressen zu werden (Starr 1984; Sherman et al. 1988). Trotzdem kommt bei vielen Arten Polyandrie vor (Page 1986; Hölldobler und Wilson 1990: S. 156; Keller und Reeve 1994a; Boomsma und Ratnieks 1996).

Zur Erklärung der Entstehung von Mehrfachpaarungen bei Hymenopteren existieren viele Hypothesen. Einmal könnte Polyandrie evolviert sein, um zu gewährleisten, daß Königinnen ausreichend Spermien bekommen, um ihren Lebensfortpflanzungserfolg zu maximieren (Cole 1983; Fjerdingstad und Boomsma 1998).

Die anderen Hypothesen basieren darauf, daß Polyandrie zu multiplen Vaterschaften in den Kolonien führt, wodurch die genetische Diversität erhöht wird. Eine solche Erhöhung der Diversität kann von Vorteil sein, wenn dadurch die Arbeitsteilung innerhalb der Kolonie effizienter wird (Crozier und Page 1985; Page und Robinson 1991; Stuart und Page 1991; Carlin et al. 1993), oder Kolonien besser auf Umweltveränderungen reagieren können (Crozier und Page 1985; Page et al. 1995). Genauso könnten genetisch diversere Kolonien resistenter gegenüber Parasiten und Krankheiten sein (Shykoff und Schmid-Hempel 1991a und b; Schmid-Hempel 1994). Eine Erhöhung der genetischen Vielfalt würde auch die Wahrscheinlichkeit, viele diploide, sterile Männchen zu produzieren verringern, was sich positiv auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Kolonien auswirkt (Page 1980; Page und Metcalf 1982;

Ratnieks 1990; Pamilo et al. 1994). Bei den meisten Hymenopterenarten wird davon ausgegangen, daß das Geschlecht durch den Genotyp an einem spezifischen Locus bestimmt wird (Cook 1993). Die an diesem Locus heterozygoten Tiere werden zu weiblichen Nachkommen, die homozygoten oder hemizygoten (haploiden) zu Männchen. Wenn sich eine Königin zufällig mit einem Männchen paart, daß an diesem Locus das gleiche Allel besitzt, so sind 50 % der diploiden Nachkommen sterile Männchen, was eine so große energetische Belastung darstellen könnte, daß die Kolonie keine Überlebenschance hat (Crozier und Page 1985; Page 1980; Page und Metcalf 1982). Bei Mehrfachpaarung steigt zwar die Wahrscheinlichkeit, daß eines der Männchen das gleiche Allel besitzt, aber der Anteil diploider Männchen in der Kolonie wäre zu gering, als daß er sich negativ auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Kolonie auswirkt.

Zusätzlich wird durch die Mehrfachpaarung der Königinnen der Konflikt mit den Arbeiterinnen bezüglich des zu produzierenden Geschlechterverhältnisses bei der Produktion von Geschlechtstieren, sowie bezüglich der Produktion von Männchen verringert (Starr 1984; Moritz 1985; Woyciechowski und Lemnicki 1987). Bei einer Einfachpaarung der Königin ist das optimale Geschlechterverhältnis für Arbeiterinnen aufgrund der asymmetrischen Verwandtschaftsverhältnisse 3:1 (Weibchen:Männchen), während die Königin 1:1 bevorzugt. Verringern sich durch Mehrfachpaarung der Königin die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den weiblichen Nachkommen, so bevorzugen Arbeiterinnen ebenfalls ein weniger weibchenlastiges Geschlechterverhältnis, bis hin zu einem 1:1-Verhältnis. Dadurch wird der Konflikt zwischen der Königin und ihren Arbeiterinnen reduziert oder verschwindet vollständig (Boomsma und Grafen 1990 und 1991; Pamilo 1991; Queller 1993a). Gleiches gilt für die Männchenproduktion. Wenn die Königin nur einmal verpaart ist, sind Arbeiterinnen zu ihren Söhnen zu 0,5 verwandt, zu den Söhnen ihrer Vollschwestern zu 0,375, zu ihren Brüdern aber lediglich zu 0,25. Damit sollten sie ihre eigenen Söhne und die ihrer Schwestern gegenüber den von der Königin produzierten Männchen bevorzugen, wodurch ein massiver Konflikt entsteht. Verringern sich aufgrund der Mehrfachpaarung der Königin die intrakolonialen Verwandtschaftsverhältnisse, so wird gegen die Männchenproduktion durch Arbeiterinnen selektiert (Starr 1984; Woyciechowski und Lemnicki 1987; Ratnieks 1988; Pamilo 1991). Bei Mehrfachpaarung sind Arbeiterinnen weiterhin zu ihren Söhnen zu 0,5 und zu ihren Brüdern zu 0,25 verwandt, aber zu ihren Neffen nur noch zu 0,125. Dies bedeutet, daß sie ihre eigenen Söhne und ihre Brüder ihren Neffen vorziehen sollten. Da dies aber für alle Arbeiterinnen der

Kolonie gilt, sollten sie sich gegenseitig an der Männchenproduktion hindern (= worker policing; Ratnieks 1988), und königinnenproduzierte Männchen bevorzugen.

Der Einfluß der Paarungshäufigkeit der Königin auf die intrakolonialen Verwandtschaftsverhältnisse ist allerdings von mehreren Faktoren abhängig. Ein Faktor ist, inwieweit alle Paarungspartner der Königin in gleichem Maße zur Nachkommenschaft beitragen. Viele Untersuchungen haben gezeigt, daß Männchen durchaus in ihrem Anteil an der Nachkommenschaft variieren, indem einige Männchen stärker repräsentiert sind als andere (Honigbienen: Moritz 1986; Estoup et al. 1994; Wespen: Metcalf und Whitt 1977; Ross 1986; Ameisen (Gattung *Formica*): Pamilo 1993; Sundström 1993; Keller et al. 1997). Dies wäre vor allem beim Anteil an weiblichen Geschlechtstieren von Bedeutung. Allerdings gab es bei zwei untersuchten *Formica*-Arten, *F. exsecta* und *F. truncorum*, keinen Hinweis darauf, daß ein Männchen erfolgreicher bei der Vaterschaft von Jungköniginnen als von Arbeiterinnen war (Keller et al. 1997). Ungleiche Vaterschaften könnten auf unterschiedliche Spermienmengen der Männchen (Keller et al. 1997), Spermienkonkurrenz oder verschiedenen Überlebenswahrscheinlichkeiten der Spermien oder der Brut zurückzuführen sein. Ein anderer Faktor, der Einfluß auf den Verwandtschaftsgrad innerhalb der Kolonien hat, ist der Beitrag der verschiedenen Männchen an der Nachkommenschaft über die Zeit. Falls die Spermien der einzelnen Männchen geklumpt in der Spermatheka der Königin gespeichert werden, würden zunächst die Spermien eines Männchens aufgebraucht werden, dann die des zweiten usw., so daß immer Kohorten von Vollschwestern entstehen und Mehrfachpaarungen keinen großen Effekt auf den momentanen intrakolonialen Verwandtschaftsgrad haben (Trivers und Hare 1976). Bisherige genetische Untersuchungen haben allerdings gezeigt, daß zumindest ein extrem geklumpertes Aufbewahren der Spermien nicht vorliegt, da die Repräsentation der verschiedenen Männchen an der Nachkommenschaft über die Zeit relativ konstant war (Metcalf und Whitt 1977; Page und Metcalf 1982; Laidlaw und Page 1984; Ross 1986; Estoup et al. 1994; Keller et al. 1997). Ein weiterer Faktor, der den Einfluß der Paarungshäufigkeit auf die intrakolonialen Verwandtschaftsverhältnisse bestimmen kann, ist die Frequenz, mit der Polyandrie in der Population auftritt (Boomsma und Ratnieks 1996; Boomsma und Sundström 1998). So haben Boomsma und Sundström (1998) bei der Untersuchung von 7 *Formica*-Arten eine negative Korrelation zwischen der ungleichen Verteilung in der Vaterschaft und der populationsweiten Häufigkeit der Mehrfachpaarung gefunden.

Dies bedeutet, daß der Einfluß der Paarungshäufigkeit auf die intrakolonialen Verwandtschaftsverhältnisse nicht unbedingt an der Anzahl der Paarungspartner (numerische Paarungshäufigkeit) festzumachen ist, sondern daß vielmehr die Kenntnis der effektiven Paarungshäufigkeit, die jegliche Variabilität in den Beiträgen der Paarungspartner an der Nachkommenschaft mit einbezieht, wichtig ist (Page 1986; Queller 1993b; Boomsma und Ratnieks 1996). Und diese effektive Paarungshäufigkeit ist nur durch die genetischen Untersuchungen der Kolonien mittels variabler, molekularer Marker zu bestimmen.

Bei *Pachycondyla villosa* wurde die Technik des Multilokus-DNA-Fingerprintings benutzt, um die effektive Paarungshäufigkeit der Königinnen zu bestimmen. Die Paarungshäufigkeiten von Arten der Unterfamilie der Ponerinae wurde bisher nur bei 2 monogynen Arten mittels Allozymmarkern untersucht, *Rhytidoponera chalybaea* und *R. confusa*, und beidesmal fand sich eine Einfachpaarung der Königinnen (Ward 1983; Page 1986). Zusätzlich wurden bei *P. villosa* anhand der Fingerprint-Ergebnisse die band sharing-Koeffizienten bestimmt, die Aussagen über die Ähnlichkeit der miteinander verglichenen Individuen erlauben (Lynch 1988). Dabei unterscheidet man zwischen dem interkolonialen band sharing-Koeffizienten, der Ähnlichkeiten zwischen nicht verwandten Individuen (= Hintergrundsähnlichkeit) angibt, und dem intrakolonialen band sharing-Koeffizienten, der sich auf Ähnlichkeiten zwischen verwandten Individuen einer Kolonie bezieht. Aufgrund der ermittelten band sharing-Koeffizienten kann dann eine Abschätzung der Verwandtschaft zwischen den Individuen erfolgen, denn je größer der Koeffizient ist, desto ähnlicher sind sich die untersuchten Individuen, und desto höher ist der Verwandtschaftsgrad.

3.2 Material und Methode

Beim Multilokus-DNA-Fingerprinting wird genomische DNA aus dem Tier extrahiert und mittels Restriktionsenzymen in kleine Fragmente geschnitten. Diese DNA-Fragmente werden in einem Agarosegel aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt, denaturiert und auf eine Nylonmembran übertragen. Danach erfolgt die Hybridisierung mit einer nicht-radioaktiv markierten Oligonukleotidsonde und die Sichtbarmachung der mit der Sonde hybridisierten DNA-Fragmente.

3.2.1 DNA-Isolation

Die DNA wurde nach einem Protokoll von Schenkel et al. (1985) aus den Individuen isoliert und durch anschließende Phenolextraktion gereinigt.

- Eine Ameise mit Hilfe eines Stahlpistills in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß in 100 µl DNA-Puffer A homogenisieren. Weitere 150 µl DNA-Puffer A, 250 µl DNA-Puffer B, sowie 10 µl Proteinase K (10 mg/ µl) zugeben und für 90 Min. bei 56 °C im Wasserbad inkubieren.
- Die Reaktionsgefäße aus dem Wasserbad nehmen, 250 µl Phenol (Rotiphenol) zugeben, für ca. 2 Sek. kräftig durchmischen (vortexen), um wässrige und phenolische Phase gründlich zu durchmischen, und anschließend in einer Eppendorf-Zentrifuge 10 Min. bei 8000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugieren.
- Den wässrigen, DNA-haltigen Überstand und eine gegebenenfalls vorhandene Interphase mit einer 200 µl-Automatikpipette mit abgeschnittenen und rundgeschmolzenen Pipettenspitzen abnehmen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß geben.
- Die Probe nochmals mit 250 µl Phenol extrahieren und abzentrifugieren.
- Den Überstand (ohne Interphase) mit abgeschnittenen Pipettenspitzen abnehmen, in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) versetzen, für ca. 2 Sek. kräftig mischen (vortexen) und 10 Min. bei 8000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand, wiederum ohne Interphase, mit einer normalen Pipettenspitze abnehmen, dabei das Volumen bestimmen, und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1/10tel Volumen 3 M Natriumacetat und doppeltem Volumen eiskaltem 100%igem Ethanol versetzen. Die Reaktionsgefäße mehrmals kurz kippen, um die Lösungen zu mischen, und die DNA über Nacht bei -20°C ausfällen.
- Die gefällte DNA 10 Min. bei 14000 rpm zentrifugieren, den Überstand abgießen, eiskaltes 70%iges Ethanol zugeben, kurz mischen und wiederum bei 14000 rpm zentrifugieren.
- Den Überstand abgießen, das Eppendorf-Reaktionsgefäß umgedreht auf Filterpapier stellen, die restliche Lösung ablaufen und das DNA-Pellet für 1 Stunde trocknen lassen.

- Die DNA für mindestens 6 Stunden bei 4°C in 110 µl bidest. und autoklaviertes Wasser lösen.

3.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA erfolgte in einem Minigel (Sambrook et al. 1989), wobei jeweils 10 µl der Proben mit einer Probe bekannter DNA-Menge (250 ng) verglichen wurde. Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung mit Hilfe des λ -Hind III-Größenstandards, bei dem jeder Bande eine bestimmte Konzentration zugeordnet werden kann (Davies et al. 1986). Die DNA-Proben und die Standards wurden hierfür in einem 0,8%igen Agarosegel 30-45 Min. bei 90 Volt aufgetrennt (Laufpuffer: 0,5 M TAE) und anschließend mit Ethidiumbromid (0,5 mg/µl Lösung) gefärbt. Die Einlagerung des fluoreszierenden Ethidiumbromids in die DNA ermöglicht, durch visuellen Vergleich der Helligkeit der DNA-Banden mit den Banden der Standards auf einem UV-Leuchtschirm die DNA-Menge der Proben abzuschätzen.

3.2.3 Schneiden der genomischen DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche an bestimmte Nukleotidsequenzen - sog. Erkennungsstellen - der doppelsträngigen DNA binden und diese spezifisch schneiden. Bei einem Multilokus-DNA-Fingerprint werden in der Regel Restriktionsenzyme, die eine Erkennungsstelle aus 4 Basenpaaren besitzen ("four-cutter") verwendet, da diese in der genomischen DNA im Durchschnitt alle $4^4=256$ Basenpaare auftritt. Durch dieses relativ häufige Schneiden der DNA werden die den repetitiven Sequenzen benachbarten DNA-Abschnitte entfernt. Dies bedeutet, daß im wesentlichen nur die repetitiven Sequenzen miteinander verglichen werden.

Das Restriktionsenzym muß in Abhängigkeit von der anschließend benutzten Sonde ausgewählt werden, da es nicht innerhalb der Erkennungsstelle der Sonde schneiden darf. Als Restriktionsenzym wurde Sau 3A I (Stratagen) bzw. Bsp 143I (MBI Fermentas) verwendet, die beide an der Erkennungsstelle 5'... \downarrow GATC ...3' bzw. 3'... CTAG \uparrow ...5' schneiden.

Zum Verdauen der genomischen DNA wurden pro Probe folgende Ansätze benutzt:

Sau 3A I:

100 µl DNA
20 µl 10x Restriktionspuffer
5 µl Restriktionsenzym (6 Units/µl)
75 µl bidest. Wasser

Bsp 143I:

100 µl DNA
20 µl 10x Restriktionspuffer
3 µl Restriktionsenzym (10 Units/µl)
77 µl bidest. Wasser

Um Pipettierfehler zu vermeiden bzw. so gering wie möglich zu halten, wurde aus Restriktionspuffer, Restriktionsenzym und Wasser ein sog. Mastermix erstellt. Dafür wurden die für die vorhandenen Proben, plus die für eine halbe Probe benötigten Mengen in einem 2 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Dies bedeutet, daß für 18 Proben ein Mastermix für 18,5 Proben hergestellt wurde, aus dem dann in jede Probe jeweils 100 µl pipettiert wurden.

Mastermix Sau 3A I (18,5 Proben):

370 µl 10x Restriktionspuffer
93 µl Restriktionsenzym
1387 µl bidest. Wasser

Mastermix Bsp 143I (18,5 Proben):

370 µl 10x Restriktionspuffer
56 µl Restriktionsenzym
1424 µl bidest. Wasser

- Jeweils 100 µl Mastermix zu den 100 µl DNA -Proben pipettieren und kurz mischen.
- Über Nacht bei 37°C, der für die Restriktionsenzyme spezifischen Temperatur inkubieren.
- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA und Inkubation der Proben bei 65°C für 10 Min. Anschließend die Proben im Eisbad abkühlen lassen.
- Die DNA durch die Zugabe von 1/10tel Volumen 3 M Natriumacetat und doppeltem Volumen 100%igem Alkohol für mindestens 3 Stunden bei - 20°C fällen.
- Die gefällte DNA 10 Min. bei 14000 rpm abzentrifugieren, Überstand abgießen und nach dem einstündigen Trocknen in 17 µl bidest. und autoklaviertes Wasser für ebenfalls mindestens 3 Stunden bei 4°C lösen.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die aus dem Restriktionsverdau resultierenden DNA-Fragmente wurden in einem 1%igen Agarosegel gemäß ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt. Diese Laufgeschwindigkeit beruht auf der unterschiedlichen Größe und Konformation der doppelsträngigen DNA und der Konzentration der Agarose.

Um die Vollständigkeit der Restriktion auf dem UV-Leuchtschirm zu kontrollieren, wurden anschließend die Nukleinsäuremoleküle im Gel mit fluoreszierendem Ethidiumbromid angefärbt.

- 17 µl der gelösten, geschnittenen DNA mit 3 µl Auftragspuffer mischen.
- 5 µl des Digoxigenin-markierten λ -Hind III-Größenstandards (0,01 µg/µl) mit 6 µl Auftragspuffer und 29 µl 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Laufpuffer mischen.
- 250 µl 1%ige Agarose (ultrapure Agarose von Sigma) in eine Gelkammer (Gibco-BRL) gießen und nach dem Aushärten mit 1750 µl 1 x TAE Laufpuffer überschichten.
- Jeweils 20 µl des Größenstandards auf die 1. und 19. Spur, die DNA-Proben auf die restlichen Spuren auftragen und für 20 Stunden bei 60 Volt auftrennen.
- Nach der Auftrennung das Gel für 30 Min. mit Ethidiumbromid (0,5 µg EtBr/µl Laufpuffer) färben.

3.2.5 Southern-Transfer durch Vakuum

Beim Southern-Transfer werden die gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente im Gel denaturiert und mit Hilfe des Vakuums auf eine Nylonmembran, die Affinität zur DNA besitzt, übertragen (modifiziert nach Southern 1975). Der Transfer auf die Membran ist aufgrund der im Anschluß verwendeten nichtradioaktiven Nachweismethode notwendig, da die dort benutzen Antikörperkonjugate (siehe Nachweis der Sonde) nicht in ausreichendem Maß in das Gel einwandern.

- Die poröse Trägerplatte mit dest. Wasser spülen und mit der glänzenden Seite nach oben in die Vakuum.Kammer (Vacugene^TMXL LKB 2016 von Pharmacia) einsetzen. Den Vakuum-Schlauch, mit einer Waschflasche zwischen Kammer und Pumpe, anbringen.
- Die Nylonmembran (ungeladen, von Qiagen) auf die Größe des Gels (2-5 mm größer; 20 x 19,5 cm) zuschneiden, mit dest. Wasser befeuchten und auf die Trägerplatte legen.
- Die Plastikmaske mit einem der Gelgröße entsprechenden Fenster (3-5 mm kleiner; 19 x 19 cm) auf die Membran legen.
- Das Gel auf die Plastikmaske legen; dabei mit der Gel-Startkante beginnen und langsam, ohne Luftblasen-Einschluß weiter absenken.
- Den Toprahmen der Apparatur aufsetzen und verschließen.
- Die Vakuumpumpe einschalten (60 mbar) und sofort ca. 200 µl Depurinierungs-Lösung auf das Gel gießen. Das Gel sollte vollständig bedeckt, die Kammer aber nicht überflutet sein. Nach 10 Min. die Lösung mit der Wasserstrahlpumpe absaugen.
- Für 10 Min. Denaturierungslösung aufgießen, danach absaugen.
- Für 10 Min. Neutralisierungslösung aufgießen, anschließend absaugen.
- 20 x SSC aufgießen und 2-3 Stunden blotten lassen; dabei darauf achten, daß das Gel immer mit Flüssigkeit bedeckt ist.
- Das SSC mit der Wasserstrahlpumpe absaugen, Gel abziehen und Vakuum abschalten.
- Die DNA-Seite und evtl. die Laufrichtung auf der Membran mit einem Kugelschreiber markieren.
- Die Membran auf eine Glasplatte legen und die DNA in einem Stratalinker (Stratagen) auf beiden Seiten mit UV fixieren (UV-crosslink).
- Die Membran kann bei Bedarf in 6 x SSC im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

3.2.6 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden

Die verwendeten synthetischen Oligonukleotidsonden (GATA)₄, (GACA)₄ und (GGAT)₄ sind an ihrem 5'-Ende mit Digoxigenin (DIG) markiert (Firma Roth).

Blockierung

Die Blockierung der Membran verhindert unspezifische Bindungen der Sonde an die DNA-freien Flächen der Membran während der Hybridisierung. Aus diesem Grund wird die Membran mit einer 1 %igen Blockierungslösung behandelt.

- Die Membran in einer Schale kurz in 6 x SSC waschen.
- Für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in 200 ml 1 %iger Blockierungslösung bewegen.

Prähybridisierung

Bei der Prähybridisierung wird die mit der Blockierungslösung behandelte Membran in der Prähybridisierungslösung (= Hybridisierungslösung ohne Sonde) äquilibriert, was wiederum unspezifische Bindungen der Sonde an die Membran unterbindet.

Die Temperatur, bei der die Prähybridisierung durchgeführt wird richtet sich nach der Hybridisierungstemperatur, die für jede Sonde spezifisch ist. Zur Erhöhung der Signalintensität wird die Hybridisierung in etwa bei T_d (= Schmelzpunkt der Sonde) minus 10°C durchgeführt. Der Schmelzpunkt der Sonde kann aus der Basenzusammensetzung kalkuliert werden, wobei pro A/T-Base 2°C und je G/C-Base 4°C berechnet werden.

Für die benutzten Oligonukleotid-Sonden ergeben sich folgende Temperaturen:

$$(\text{GATA})_4 = 30^\circ\text{C}$$

$$(\text{GACA})_4 = 38^\circ\text{C}$$

$$(\text{GGAT})_4 = 38^\circ\text{C}$$

Um die Spezifität der Sonden weiter zu erhöhen, wurden die Hybridisierungen bei etwas höheren Temperaturen durchgeführt, d.h. bei 32°C statt 30°C bzw. bei 40°C statt 38°C .

- Die Membran in einen Hybridisierungszylinder, der 10 ml der Prähybridisierungslösung enthält überführen. Es können zwei Membranen gleichzeitig in einem Zylinder hybridisiert werden, dabei beide Membranen mit der DNA-Seite nach oben übereinander legen, auf eine

Glaspipette aufrollen und in dem Hybridisierungszyylinder möglichst blasenfrei wieder ausrollen.

- Für eine Stunde in der Prähybridisierungslösung im Hybridisierungssofen bei der spezifischen Hybridisierungstemperatur inkubieren.

Hybridisierung

- Die Prähybridisierungslösung abgießen und 10 ml der vorgewärmten Hybridisierungslösung (mit 10 pmol DIG-markierter Sonde/ml Lösung) zugeben.
- Für 3,5 Stunden bei 32 °C (GATA-Sonde) bzw. 40 °C (GACA- und GGAT-Sonde) im Hybridisierungssofen inkubieren.
- Nach der Hybridisierung die Hybridisierungslösung abgießen und bei 4 °C aufbewahren. Die Lösung enthält noch genügend DIG-markierte Sonden für ca. 10 weitere Hybridisierungen. Bei längerer Lagerung sollte die Hybridisierungslösung bei -20 °C aufbewahrt werden.
- Die Membran bzw. Membranen aus dem Zylinder nehmen und in einer Schale auf dem Schüttler bei Raumtemperatur zweimal mit 2 x Waschlösung waschen. Dabei werden ungebundene Sonden, die zu einem hohen Hintergrund führen würden, entfernt.
- Die Membranen zweimal in 0,5 x Waschlösung waschen.
- Die Membranen für 2 Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur in 1 %iger Blockierungslösung schütteln lassen. Dabei sollte die Schale abgedeckt sein, um eine Verdunstung der Lösung zu verhindern. Diese Blockierung verhindert die unspezifischen Bindung des im anschließenden Nachweis verwendeten Antikörpers an die Membran.

3.2.7 Nachweis der Sonde

Die Detektion der Digoxigenin-markierten Sonden beruhte auf der Methode des Chemilumineszenz-Nachweises (Boehringer, Mannheim). Die digoxigenierten Oligonukleotid-Sonden werden mit einem monospezifischen Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase (Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment; Boehringer, Mannheim) gekoppelt ist, nachgewiesen. Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert das Chemilumineszenz-Substrat CSPD (Boehringer, Mannheim) und es entsteht ein metastabiles Phenolat-Anion. Dieses emittiert beim Zerfall Licht, was auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann. Da das

Chemilumineszenz-Substrat CSPD auf der Nylon-Membran mindestens 24 Stunden lang erhalten bleibt, und Film-Expositionen von wenigen Stunden ausreichen, können mehrere Bilder generiert werden.

- Den bei 4 °C gelagerten Antikörper kurz zentrifugieren, da evtl. kleine Antikörper-Aggregate in der Lösung zu einem Hintergrund führen könnte.
- Pro Membran den Antikörper 1:1000 in 1,5 ml der Blockierungslösung (1,5 µl Antikörper in 1,5 ml Blockierungslösung) verdünnen und auf eine Transparentfolie (DIN A4) geben.
- Die Membran mit der DNA-Seite blasenfrei auf diese Folie legen, wodurch sich zwischen Membran und Folie ein gleichmäßiger Flüssigkeitsfilm bildet. Für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Membran abnehmen und auf dem Schüttler bei Raumtemperatur zweimal für jeweils 15 Min. mit Waschpuffer waschen, wodurch ungebundene Antikörper entfernt werden.
- Die Membran 2 Min. in Substratpuffer äquilibrieren.
- Das dunkel und bei 4 °C gelagerte Substrat CSPD 1:100 in Substratpuffer verdünnen (pro Membran 15 µl CSPD/1,5 ml Substratpuffer) und auf eine Transparentfolie auftragen.
- Die Membran wiederum mit der DNA-Seite blasenfrei auf die Folie und damit auf die Flüssigkeit legen und mit einer zweiten Folie abdecken.
- Die Membran in eine Entwicklungskassette geben und zur Dokumentation einen Röntgenfilm auflegen.
- Nach ca. 2 Stunden den Röntgenfilm abnehmen und entwickeln. Falls notwendig, kann, je nach Intensität der Banden, die Belichtungszeit eines weiteren Röntgenfilmes verlängert oder verkürzt werden.

3.2.8 "Stripping" und Rehybridisierung der Membran

Die alkali-labilen DIG-markierten Sonden können in alkalischem "Stripping"-Puffer von der Membran entfernt werden. Die Membran kann dann mit einer weiteren DIG-markierten Sonde hybridisiert werden, was die Möglichkeit bietet, dieselben Tiere mit verschiedenen Sonden zu analysieren, wodurch die Aussagekraft erhöht werden kann.

- Die Membran für 1 Min. in dest. Wasser waschen, wodurch das Chemilumineszenz-Substrat CSPD entfernt wird.
- Die Membran zweimal für jeweils 10 Min. bei 37 °C in alkalischem "Stripping"-Puffer waschen.
- Abschließend in 2 x SSC waschen. In dieser Lösung kann die Membran bei 4 °C auch aufbewahrt werden.
- Die Membran steht nun für weitere Hybridisierungen zur Verfügung, wobei mit der Blockierung begonnen wird.

3.2.9 Auswertung

Bei der Auswertung der Fingerprints wurden alle deutlich sichtbaren Banden zwischen 23,1 und 2,0 kb gewertet. Dabei galten die Banden als homolog, deren Laufstrecke sich nicht um mehr als 0,1 mm unterschied und die gleiche Intensität zeigten. Intensitätsunterschiede homologer Banden aufgrund unterschiedlicher DNA-Auftragsmengen wurden berücksichtigt, indem andere homologe Banden, die bei allen Individuen auftraten, miteinander verglichen wurden. Die Untersuchungen machten es teilweise erforderlich zwischen Gelen zu vergleichen. Dies wurde dadurch ermöglicht, daß zum einen die DNA-Menge, die aus Königinnen isoliert wurde ausreichte, um sie auf zwei Gelen einzusetzen, d.h. die Proben einer Königin wurde halbiert und mit bidestilliertem Wasser auf die jeweils erforderlichen 17 µl ergänzt. Eine andere Möglichkeit bestand darin, die DNA-Proben von 3 Arbeiterinnen der Kolonie zu mischen und jeweils 1/3tel davon auf den zu vergleichenden Gelen einzusetzen. Dadurch erhielt man eine "gemischte" Arbeiterin, die im Idealfall alle Banden der Königinnen einer Kolonie hatte.

Zur Bestimmung der Paarungshäufigkeit der Königinnen, wurden deren DNA-Proben, zusammen mit den Proben ihrer Arbeiterinnen, teilweise auch zusätzlich weiblicher Geschlechtstiere, auf einem Gel aufgetragen. Aufgrund des haplodiploiden Geschlechtsbestimmungssystem der Hymenopteren, kann die Paarungshäufigkeit durch direkten Vergleich der Bandenmuster der Königinnen mit den Bandenmustern ihrer weiblichen Nachkommen ermittelt werden, da die haploiden Männchen ihren gesamten Chromosomensatz an ihre Töchter weitergeben. Das bedeutet, daß alle Banden, die bei den weiblichen Nachkommen, nicht aber den Königinnen vorhanden sind, paternalen Ursprungs sind. Haben

weibliche Nachkommen unterschiedliche paternale Banden, so können diese nur von verschiedenen Männchen stammen, wodurch eine Mehrfachpaarung der Königinnen nachgewiesen wäre. Die Paarungshäufigkeit wurde bei insgesamt 13 Kolonien untersucht: sechs Kolonien mit jeweils einer Königin und 16-17 Arbeiterinnen, 5 Kolonien mit jeweils 2 Königinnen und 33-46 weibliche Nachkommen, sowie 2 Kolonien mit jeweils 3 Königinnen und 16 bzw. 33 weibliche Nachkommen (Tab. 3.1).

Von diesen Kolonien wurden auch die band sharing-Koeffizienten berechnet. Der band sharing-Koeffizient, oder Ähnlichkeits-Koeffizient, ist ein Maß der mittleren Ähnlichkeit der DNA-Profile zweier Individuen und wird nach folgender Formel berechnet (Lynch 1990; Bruford et al. 1992):

$$S = 2 n_{AB} / (n_A + n_B)$$

wobei n_{AB} die Anzahl der gemeinsamen Banden gleicher elektrophoretischer Mobilität und gleicher Intensität zwischen Individuum A und B ist, und n_A und n_B jeweils die Anzahl der Banden in Individuum A und B.

Der band sharing-Koeffizient geht von 0 bis 1, und je größer die Ähnlichkeit der DNA-Profile der verglichenen Individuen ist, desto größer ist S.

Bei dem Vergleich von Individuen aus einer Kolonie, spricht man vom intrakolonialen band sharing-Koeffizient, während sich der interkoloniale band sharing-Koeffizient auf den Vergleich von Tieren verschiedener Kolonien bezieht. Durch den Vergleich nicht verwandter Tiere erhält man Maß für die Wahrscheinlichkeit, daß eine Bande eines Individuums auch im Bandenprofil eines zufällig ausgewählten Tieres der gleichen Population vorhanden ist (= Hintergrundsähnlichkeit; Jeffreys et al. 1985).

Die intrakolonialen band sharing-Koeffizienten wurden für die 13 Kolonien, bei denen auch die Paarungshäufigkeit analysiert wurde, bestimmt, wobei jeweils die Bandenprofile der weiblichen Nachkommen einer Kolonie miteinander verglichen wurden. Zur Bestimmung des interkolonialen band sharing-Koeffizienten wurden die DNA-Proben von jeweils 2 Arbeiterinnen von 9 der untersuchten Kolonien auf ein Gel aufgetragen, und die Bandenprofile paarweise miteinander verglichen. Dadurch erhält man ein Maß für die Ähnlichkeit nicht verwandter Tiere und damit die Hintergrundsähnlichkeit.

Um die Ähnlichkeit zwischen verwandten und nicht verwandten Männchen abschätzen zu können, wurden die inter- und intrakolonialen band sharing-Koeffizienten von jeweils 3 Männchen aus 6 Kolonien bestimmt.

3.2.10 Lösungen

DNA-Puffer A

10 mM Tris/HCl-Puffer; pH 7,5

10 mM EDTA

60 mM NaCl

0,15 mM Spermin

0,15 mM Spermidin

DNA-Puffer B

0,2 M Tris/HCl-Puffer; pH 9,0

0,03 M EDTA

2 % SDS

TAE-Puffer

10 mM Tris/HCl-Puffer; pH 7,5

1 mM EDTA

Auftragspuffer

30 % Glycerin

0,25 % Xylencyalon

0,25 % Bromphenolblau

Depurinierungs-Lösung

0,25 M HCl

Denaturierungs-Lösung

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

Neutralisierungs-Lösung

0,5 M Tris

1,5 M NaCl

20 x SSC

3 M NaCl

0,3 M Trinatriumcitrat; pH 7,0

1 % Blockierungslösung

2 g Blockierungsreagenz (Boehringer, Mannheim)

200 ml 6 x SSC

Prähybridisierungslösung

5 x SSPE

5 x Denhardt's Lösung

0,1 % SDS

20 x SSPE; pH 7,4

3 M NaCl

0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

0,02 M $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$

pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen; Lösung auf
1000 ml auffüllen und Lösung autoklavieren

100 x Denhardt's Lösung

2 g Polyvinylpyrrolidon

2 g BSA

2 g Ficoll

die Reagenzien in 100 ml autoklaviertem dest.
Wasser lösen und in kleinen Aliquots bei - 20 °C
lagern

Alkalischer "Stripping"-Puffer

0,2 M NaOH

0,1 % SDS

3.3 Ergebnisse

Sowohl zur Berechnung der intrakolonialen band sharing-Koeffizienten, als auch zur Untersuchung der Paarungshäufigkeit der Königinnen wurden 13 Kolonien analysiert. Zur Bestimmung des interkolonialen band sharing-Koeffizienten wurden jeweils 2 Tiere aus 9 der untersuchten Kolonien verglichen. In Abhängigkeit von den Kolonien konnten zwischen 8 und 23 Banden, die zwischen 23,1 und 2,0 kb (Kilobasen) groß waren, ausgewertet werden. Dabei hatten die einzelnen Individuen zwischen 5 und 15 Banden.

Der interkoloniale band sharing-Koeffizient variierte von 0,2 bis 0,5 ($MW \pm SD = 0,31 \pm 0,09$; $N = 144$ Vergleiche; Abb 3.1). Der intrakoloniale band sharing-Koeffizient wurde einmal für die 6 monogynen Kolonien berechnet und lag zwischen 0,6 und 1,0 ($0,90 \pm 0,12$; $N = 784$ Vergleiche) und einmal für die 7 polygynen Kolonien, bei denen er zwischen 0,3 und 0,9 ($0,63 \pm 0,16$; $N = 2399$ Vergleiche) schwankte (Abb. 3.1).

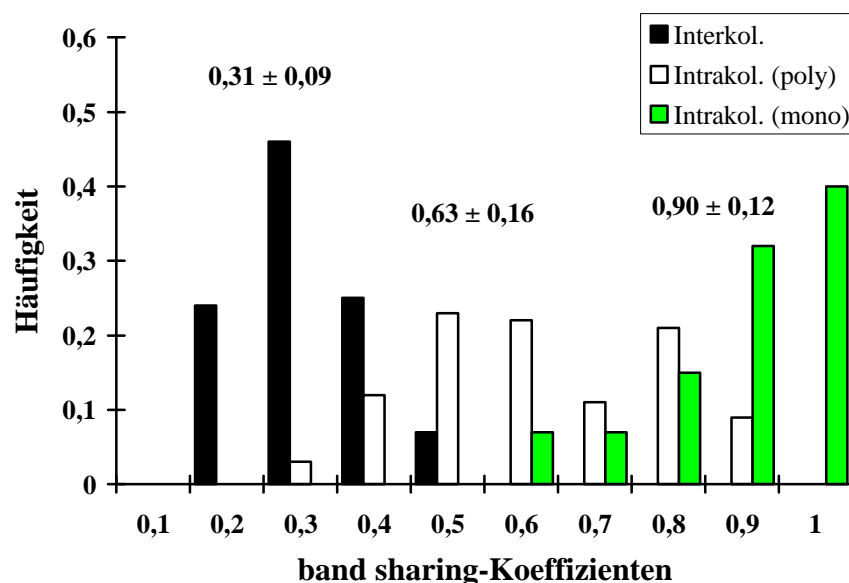


Abb. 3.1 Band sharing-Koeffizienten und ihre Häufigkeiten für nicht verwandte Individuen (interkol., schwarze Balken), für Individuen aus polygynen (weiße Balken) und monogyne (graue Balken) Kolonien, sowie die entsprechenden Mittelwerte (\pm SD).

Dabei unterschied sich der mittlere interkoloniale band sharing-Koeffizient, d.h. der von nicht verwandten Individuen, signifikant von den mittleren intrakolonialen band sharing-Koeffizienten (Mann-Whitney U-Test: interkolonial versus intrakolonial polygyn, $0,31 \pm 0,09$ versus $0,63 \pm 0,16$: $U = 479,5$; $p < 0,001$; interkolonial versus intrakolonial monogyn, $0,31 \pm 0,09$ versus $0,90 \pm 0,12$: $U = 1399,0$; $p < 0,001$). Auch die band sharing-Koeffizienten der verwandten Individuen unterschieden sich, der für monogyne Kolonien lag signifikant höher als der für polygyne Kolonien ($0,90 \pm 0,12$ versus $0,63 \pm 0,16$: $U = 1049,0$; $p < 0,001$).

Zur Bestimmung der Paarungshäufigkeit der Königinnen wurden insgesamt 22 Königinnen und zwischen 16 und 53 weibliche Nachkommen aus 13 Kolonien analysiert (Tab. 3.1). Dadurch, daß die haploiden Väter ihren gesamten Chromosomensatz an ihre Töchter weitergeben, kann durch einfachen Vergleich der Bandenmuster der Königinnen mit denen ihrer weiblichen Nachkommen die Paarungshäufigkeit bestimmt werden, denn alle Banden, die bei den Nachkommen vorhanden sind, bei den Königinnen aber nicht, sind paternalen Ursprungs (patrilinienspezifische Banden). Zeigen sich bei den Nachkommen verschiedene paternale Banden (patrilinienspezifische Bandenmuster), so können diese, aufgrund der Haploidie, nur von verschiedenen Vätern stammen, wodurch eine Mehrfachpaarung der Königinnen nachgewiesen wäre (Abb. 3.2).

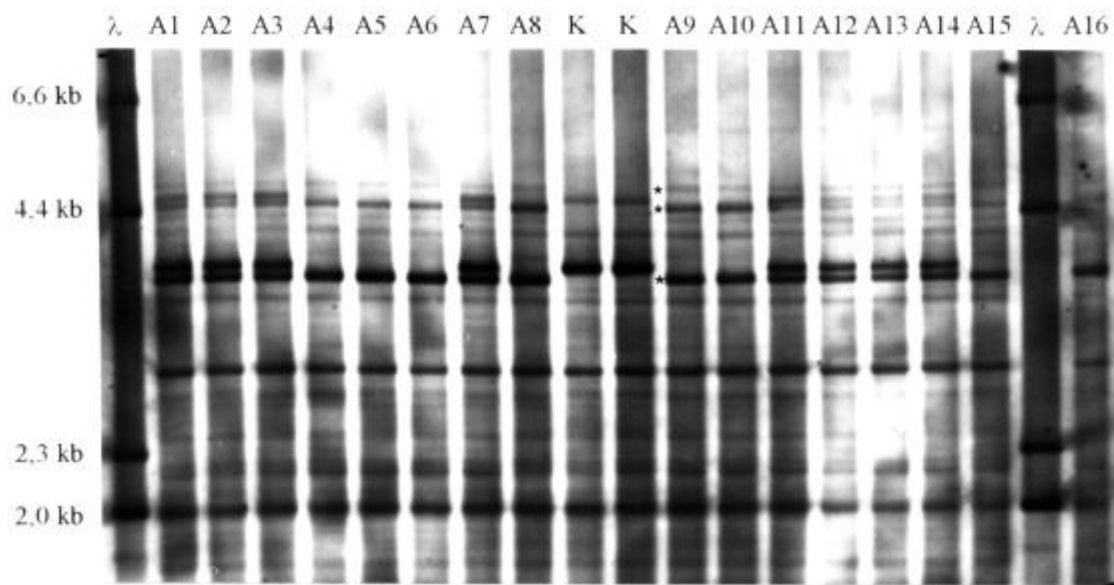


Abb. 3.2 Multilokus-Fingerprint einer Königin (K.; Spur 9 und 10) und 16 ihrer Arbeiterinnen (A1-A16). Die 3 paternalen Banden sind mit Sternen (bei A9) gekennzeichnet. Alle Arbeiterinnen hatten das gleiche patrilienspezifische Bandenmuster, d.h. alle stammten von einem Vater ab. kb = Kilobasen.

Die Fingerprintanalysen ergaben für alle 22 Königinnen der 13 Kolonien keine Hinweise auf Mehrfachpaarung. Alle untersuchten Arbeiterinnen hatten, in Abhängigkeit von der Matrilinie, zwischen 1 und 4 patrilienspezifischen Banden und ein patrilienspezifisches Bandenmuster (Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Anzahl der Patrilineien (= patrilienspezifischen Bandenmuster), die in den Kolonien mittels Multilokus-DNA-Fingerprintings pro Matrilinie nachgewiesen wurden. Dazu wurden in insgesamt 13 Kolonien zwischen 16 und 53 weibliche Tiere (Arbeiterinnen und evtl. weibliche Geschlechtstiere) analysiert, wobei pro Kolonie zwischen 1 und 4 patrilienspezifischen Banden gefunden wurden.

Kolonie	Anzahl				
	Königinnen	Individuen (Arb. / Kön.) getestet	Banden insgesamt	patrilienspez. Banden pro Matrilinie	patrilienspez. Bandenmuster pro Matrilinie
Pv 5	1	16	14	4	1
Pv 6	1	17	10	2	1
Pv 7	1	17	18	3	1
Pv 10	1	17	19	1	1
Pv 15	1	16	14	4	1
Pv 23	1	17	15	4	1

Pv 4	2	46	16	2 / 3	1
Pv 14	2	53	17	3	1
Pv 17	2	34	10	1	1
Pv 34	2 ^a	34	11	2 / 3	1
Pv 35	2 ^a	33	7	2	1
Pv 16	3	16	19	1 / 2 / 2	1
Pv 26	3	33	15	2	1
MW		15,9 ^b		2,3	
Σ	22	349			

^a die dritten Königinnen waren vor der Analyse gestorben; ^b Mittelwert der untersuchten Nachkommen pro Matrilinie.

Bei der Untersuchung der Paarungshäufigkeit gibt es allerdings zwei potentielle Fehlerquellen, die dazu führen könnten, daß Mehrfachpaarungen übersehen werden. Zum einen könnte ein zweites Männchen zufällig die gleichen Bandenmuster aufweisen, wie das erste Männchen. Eine weitere Möglichkeit, eine Patrilinie in der Analyse nicht zu entdecken, könnte in einer ungleichen Beteiligung der beiden Männchen an der Nachkommenschaft liegen (siehe z.B. Keller et al. 1997). Für beide Fälle wurden die Wahrscheinlichkeiten berechnet, daß in dieser Untersuchung eine zweite Paarung übersehen wurde.

Die Wahrscheinlichkeit P_a , ein zweites, nicht verwandtes Männchen, dessen Bandenprofil von dem des ersten Männchens verschieden ist, zu entdecken, hängt von der durchschnittlichen Ähnlichkeit x_m zwischen diesen Männchen ab, sowie von der mittleren Anzahl der patrilinienspezifischen Banden q der untersuchten Kolonien ($q = 2,3$; Tab. 3.1). Die Ähnlichkeit der Männchen wurde durch den Vergleich von jeweils 3 Männchen aus 6 Kolonien bestimmt. Dabei ergab sich ein mittlerer band sharing-Koeffizient von $0,58 \pm 0,11$ (MW \pm SD) für nicht verwandte Männchen, sowie von $0,87 \pm 0,12$ für verwandte Männchen. Da $P_a = 1 - x_m^q$ ist (Jeffreys et al. 1985; Bruford et al. 1992), ergibt sich für diese Untersuchung ein P_a von 0,71. Dies bedeutet, daß in einer Kolonie die Wahrscheinlichkeit P_0 , ein zweites Männchen mit dem gleichen Bandenmuster zu übersehen $1 - P_a$ ist, was für diese Untersuchung bei fast 30 % liegt. Berechnet man für diesen Fall allerdings die Wahrscheinlichkeit für alle 22 untersuchten Königinnen ($P_0 = (1 - P_a)^n = 0,29^{22}$), so liegt sie bei lediglich 10^{-10} %. Hätten sich alle 22 Königinnen jeweils mit Brüdern gepaart (mittlerer band sharing-Koeffizient von 0,87), läge die Wahrscheinlichkeit, ein zweites Männchen mit demselben Bandenmuster zu übersehen, immer

noch bei 0,09 %. Somit hätte, wenn man davon ausgeht, daß alle untersuchten Königinnen mehrfach begattet sind, in mindesten einer der untersuchten Kolonien, eine zweite Paarung zu 99,9 % nachgewiesen werden müssen.

Die zweite Fehlerquelle, eine Mehrfachpaarung nicht zu entdecken, weil eine Patriline in der Nachkommenschaft unterrepräsentiert ist, ist abhängig von der durchschnittlichen Anzahl der untersuchten Nachkommen pro untersuchter Matriline. Bei der Analyse der 22 Königinnen wurden im Mittel 15,9 weibliche Nachkommen einbezogen. Damit ist die Wahrscheinlichkeit, ein zweites Männchen zu übersehen, welches zu gleichen Teilen zur Nachkommenschaft beiträgt wie das erste Männchen, $0,5^{15,9}$ und damit kleiner als 0,016 %. Erst wenn ein Männchen weniger als 18 % zur Nachkommenschaft beitragen würde, steigt die Wahrscheinlichkeit, es zu übersehen, auf über 5 %. Damit ist die Wahrscheinlichkeit, bei dieser Untersuchung Mehrfachpaarungen übersehen zu haben, relativ gering.

3.4 Diskussion

Die Analyse der band sharing-Koeffizienten zeigte signifikante Unterschiede zwischen dem interkolonialen und den intrakolonialen Werten. Der Wert des interkolonialen band sharing-Koeffizient, der die mittlere Ähnlichkeit nicht verwandter Individuen, und somit die Hintergrundsähnlichkeit der Population beschreibt, bestimmt die Aussagekraft der Fingerprintuntersuchungen hinsichtlich Elternschaft und Verwandtschaft zwischen den Individuen. Bei der Zuordnung der Elternschaft bzw. der Vaterschaft, d.h. bei nah verwandten Individuen, gibt es in der Regel keine Probleme, und der Einsatz des DNA Fingerprinting ist hier sehr profitabel, was durch viele Untersuchungen bestätigt wird (Burke et al. 1989; Pemberton et al. 1992; Hartley et al. 1993; Schartl et al. 1993; Freeland et al. 1995; Gadau et al. 1996; Haydock et al. 1996; Bercovitch und Nürnberg 1997; Quinn et al. 1999). Bei der Berechnung des Verwandtschaftsgrades, besonders zwischen weniger verwandten Individuen, treten allerdings Probleme auf. Denn je größer die Hintergrundsähnlichkeit ist, desto größer ist die Gefahr, den Verwandtschaftsgrad zu unterschätzen, da der Zusammenhang zwischen Verwandtschaft und band sharing-Koeffizient nicht mehr linear ist (Lynch 1988). Bei einer Untersuchung des Europäischen Bienenfressers (*Merops apiaster*) fanden Jones et al. (1991), daß die Korrelation zwischen dem Verwandtschaftsgrad r und dem band sharing-Koeffizienten,

bei einem r größer als 0,5, in eine nicht-lineare Form übergeht. Gleiches fanden Haig et al. (1993) bei der Untersuchung von Spechten. Dadurch ist eine Berechnung des Verwandtschaftsgrades zwischen spezifischen Individuen anhand der band sharing-Daten nicht zuverlässig, weshalb bei dieser Untersuchung darauf verzichtet wurde.

Allerdings erhält man durch die band sharing-Koeffizienten Hinweise auf die Verwandtschaftsverhältnisse in den untersuchten Kolonien. So deutete der intrakoloniale band sharing-Koeffizient der 6 monogynen Kolonien, der im Mittel bei $0,90 \pm 0,12$ (\pm SD) lag, an, daß es sich bei den untersuchten Arbeiterinnen um Vollschwestern, und somit um monogyn, monoandrische Kolonien handelte. Der Mittelwert von $0,63 \pm 0,16$ für die 7 polygynen Kolonien hingegen wies auf eine Mischung aus Voll- und Halbschwestern hin.

Die genetische Analyse der Paarungshäufigkeit von 22 *P. villosa*-Königinnen ergab auch, daß sich Königinnen dieser Art nur einmal paaren. Nur die genetischen Untersuchungen der Paarungshäufigkeit und damit die Kenntnis der effektiven Paarungshäufigkeit m_e geben Auskunft über den Einfluß von Mehrfachpaarungen auf die genetische Zusammensetzung der Kolonie, denn dabei wird die Variabilität in den Beiträgen der verschiedenen Paarungspartner an der Nachkommenschaft berücksichtigt (Pamilo 1993; Queller 1993b; Boomsma und Ratnieks 1996). Unterschiedliche Beiträge der verschiedenen Paarungspartner einer Königin haben nicht nur Auswirkungen auf die intrakolonialen Verwandtschaftsverhältnisse, sondern auch auf die Wahrscheinlichkeit bei der Untersuchung eine Einfachpaarung festzustellen, obwohl eine Doppelpaarung vorliegt. Bei *P. villosa* steigt die Wahrscheinlichkeit, aus diesem Grund ein zweites Männchen zu übersehen auf über 5 %, wenn ein Männchen weniger als 18 % zur Nachkommenschaft beiträgt. Berechnet man für diesen Fall die effektive Paarungshäufigkeit m_e ($m_e = 1 / \sum p_i^2$, wobei p_i der Anteil der Vaterschaft des i -ten Männchens an der Nachkommenschaft ist; Starr 1984), so liegt sie für doppelt gepaarte Königinnen bei 1,42. Berechnet man nun für Kolonien, bei denen eine Doppelpaarung aufgrund der ungleichen Verteilung der Vaterschaft nicht entdeckt wurde, den intrakolonialen Verwandtschaftsgrad (r) zwischen den Arbeiterinnen, so ergibt sich ein r von 0,6 ($r = 0,25 + 0,5 (1 / m_e)$; Pamilo 1993). Damit wären die Auswirkungen auf den intrakolonialen Verwandtschaftsgrad und den damit verbundenen Konflikten wesentlich geringer, als aufgrund der numerischen Paarungshäufigkeit angenommen werden würde.

Eine erhebliche Abweichung zwischen der numerischen und effektiven Paarungshäufigkeit fand Pamilo (1993) bei der Untersuchung von *Formica aquilonia*, bei der

Königinnen bis zu sechsfach begattet waren, die effektive Paarungshäufigkeit aber, aufgrund der sehr unterschiedlichen Beiträge der Männchen zu den Nachkommen, bei 1,48 lag. Solche Unterschiede in der Verteilung der Vaterschaft wurde für viele Arten gezeigt (z.B. Metcalf und Whitt 1977; Moritz 1986; Sundström 1993; Estoup et al. 1994). Bei doppelt gepaarten Königinnen von *Formica exsecta* und *F. truncorum* hatte in 7 Kolonien das erfolgreichere Männchen einen Anteil an der Vaterschaft von 51 bis 84 % (Keller et al. 1997). Dabei war lediglich bei einer Kolonie der Anteil eines Männchen, mit nur 16 % der Nachkommen in einem Bereich, in dem für *P. villosa* die Nachweisgrenze lag, bei den restlichen *Formica*-Kolonien lag der Anteil bei mindesten 29 % (Keller et al. 1997). Daraus kann man ableiten, daß bei der Analyse von 22 *P. villosa*-Königinnen zumindest eine Doppelpaarung nachgewiesen worden wäre, wenn diese existieren würden.

Ein weiteres Problem bei der Abschätzung der effektiven Paarungshäufigkeit ist die Frequenz der Mehrfachpaarungen in der Population (Pamilo 1993; Boomsma und Ratnieks 1996). In ihrem Übersichtsartikel beschreiben Boomsma und Ratnieks (1996) bei 19 Ameisenarten eine durchschnittliche effektive Paarungshäufigkeit 1-1,5 und schließen daraus, daß die meisten Paarungssysteme entweder als solche mit ausschließlich Einfachpaarungen charakterisiert werden können, oder als eine Mischung aus Einfach-, Doppel- und selten Drei- und Mehrfachpaarungen. Effektive Paarungshäufigkeit von $m_e > 2$ wurden durch genetische Untersuchungen lediglich bei *Apis*-Arten (Estoup et al. 1994; Moritz et al. 1995; Oldroyd et al. 1995), zwei *Vespula*-Arten (Ross 1986), und zwei Ameisenarten, *Acromyrmex versicolor* und *Atta colombica* (Reichardt und Wheeler 1996; Fjerdingsstad und Boomsma 1998) dokumentiert.

Bei einer Mischung aus Einfach- und Doppelpaarung scheint der Anteil an der Vaterschaft in den zweifach gepaarten Kolonien häufig ungleich verteilt zu sein. Bei einem Vergleich von 7 *Formica*-Arten fanden Boomsma und Sundström (1998), daß die durchschnittliche Ungleichverteilung in der Vaterschaft bei doppelt gepaarten Königinnen negativ korreliert ist mit der populationsweiten Frequenz von Mehrfachpaarungen (meist Zweifachpaarung). D.h. bei einer Häufigkeit der Mehrfachpaarungen von ca. 25 % ist hauptsächlich eins der Männchen erfolgreich, während die Männchen relativ gleiche Anteile an der Nachkommenschaft haben, wenn die Häufigkeit von Mehrfachpaarungen bei 40-50 % liegt (Boomsma und Sundström 1998).

Eine weitere Studie an sieben Populationen von *Lasius niger* findet genau den gleichen Zusammenhang, die Ungleichverteilung in der Vaterschaft war in Populationen mit geringer Frequenz an Doppelpaarungen der Königinnen hoch, und gering in solchen mit mittlerer Häufigkeit der Doppelpaarungen (Boomsma und Van DerHave 1998). So fanden auch Studien von Arten mit einem hohen Grad an multipler Vaterschaft, wie z.B. Honigbienen oder Blattschneiderameisen eher eine gleichmäßige Verteilung in der Vaterschaft (Moritz et al. 1995; Reichardt und Wheeler 1996; Fjerdingstad et al. 1998). Bei der Untersuchung von *P. villosa* wurde bei 22 Königinnen kein Hinweis auf eine Mehrfachpaarung festgestellt. Nimmt man nun an, daß die nächste untersuchte Königin doppelt gepaart wäre, läge der Anteil multipler Paarungen bei 6 % (nach der Korrektur mit der Wahrscheinlichkeit eine Doppelpaarung zu entdecken von 0,71 (siehe Ergebnisteil); Pamilo 1982). Dies bedeutet, daß, wenn man die Untersuchung der *Formica*-Arten heranzieht (Boomsma und Sundström 1998), bei dieser geringen populationsweiten Frequenz von Mehrfachpaarungen eine starke Ungleichverteilung im Anteil an der Nachkommenschaft der Väter zu erwarten wäre, wodurch eine vorhandene Doppelpaarung evtl. nicht entdeckt werden würde. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit bei keiner der 22 untersuchten Königinnen eine Mehrfachpaarung nachzuweisen sehr gering. Zudem hätte eine daraus resultierende populationsweite effektive Paarungshäufigkeit von 1,04 (Pamilo 1993) keinen Einfluß auf die genetische Zusammensetzung der Kolonien und damit auch keine Auswirkungen auf die Konflikte bezüglich des zu produzierenden Geschlechterverhältnisses bei der Produktion von Geschlechtstieren, sowie bezüglich der Produktion von Männchen (Starr 1984; Moritz 1985; Woyciechowski und Lemnicki 1987). Das Verhältnis bei der Geschlechtstierproduktion wurde bei *P. villosa* nicht untersucht. Die Vorhersage, daß in den monogyn, monoandrischen Kolonien in Anwesenheit der Königin, aufgrund der asymmetrischen Verwandtschaftsverhältnisse, Arbeiterinnenreproduktion auftreten sollte, wurde bei der Untersuchung allerdings nicht gefunden (siehe Abschnitt 5).

Viele Hypothesen, welche die Evolution von Mehrfachpaarungen zu erklären versuchen, gehen davon aus, daß durch die Zunahme der genetischen Variabilität selektive Vorteile bestehen und wurden unter dem Begriff "genetic-variability hypothesis" zusammengefaßt. Keller und Reeve (1994) führten dabei an, daß diese "genetic-variability hypothesis" beinhalten sollten, daß ein negativer Zusammenhang zwischen der Paarungshäufigkeit und der Anzahl der Königinnen in der Kolonie besteht. Denn in monogynen

Populationen kann die genetische Diversität zwischen den Kolonimitgliedern nur durch die multiple Paarung der Königinnen entstehen, während in polygynen Populationen durch die multiplen Königinnen genetische Vielfalt vorhanden ist, und Königinnen deshalb auf evtl. mit Kosten verbundene Mehrfachpaarungen verzichten sollten. Bei der Untersuchung von 6 monogynen und 7 polygynen Kolonien von *P. villosa* konnte ein solcher Zusammenhang nicht gefunden werden. In beiden Fällen waren die Königinnen einfach gepaart. Auch Boomsma und Ratnieks (1996), sowie Schmid-Hempel und Crozier (1999), fanden keine negative Korrelation zwischen Polygynie und Polyandrie. Bei der Untersuchung von *Myrmica*-Arten fand sich sogar ein positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl und der durchschnittlichen Paarungshäufigkeit der Königinnen, wobei das auf das spezifische Paarungssystem dieser Arten zurückgeführt wurde (Pedersen und Boomsma 1999).