

Consequences of Mating Behaviour on the Population Ecology of Honeybees (*Apis mellifera* L.)

Dissertation (kumulativ)



zur Erlangung der akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von Herrn Frank Bernhard Kraus
geb. am 03.07.1971 in Mannheim

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Pof. Dr. R.F.A. Moritz
2. PD Dr. habil. S. Fuchs
3. Prof. Dr. R. Paxton

Datum der Verteidigung: 26.11.2003, Halle (Saale)

urn:nbn:de:gbv:3-000005781

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005781>]

Consequences of Mating Behaviour on the Population Ecology of Honeybees (*Apis mellifera* L.)

F. Bernhard Kraus

Introduction 3-6

I Kraus FB, Neumann P, Scharpenberg H, van Praagh J & Moritz RFA (2003) Male fitness of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). Published in the *Journal of Evolutionary Biology* **16** (2003) 914-920.

7

II Kraus FB, Neumann P, van Praagh J & Moritz RFA (2003) Sperm limitation and the evolution of polyandry in honeybees (*Apis mellifera* L.). published in *Behavioral Ecology and Sociobiology* (in press).

8

III Kraus FB, Neumann P, Moritz RFA & Radloff SA (2003) Heritability of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.). Submitted to the *Journal of Heredity*.

9

IV Kraus FB & Moritz RFA (2003) Estimating population sizes in social insects using microsatellite DNA analyses of haploid males. An example for *Apis mellifera*. Submitted to *Molecular Ecology*.

10

V Kraus FB & Moritz RFA (2003) Choice of protection areas for the Western Honeybee (*Apis mellifera* L.) Manuscript for submission to *Conservation Genetics*.

11

Zusammenfassung 12-16

Appendix 17-20

Introduction

The Western Honeybee *Apis mellifera* (Linnaeus 1758) has a distribution area ranging from the northern parts of Europe over the Middle East down to the Cape of South Africa. Over this immense area *A. mellifera* has split into many races and subspecies in adaptation to local environmental conditions (Ruttner 1988). From the beginning of the 20th century apiculture and the breeding of honeybees in some parts of Europe (especially Germany) has resulted in the extinction and replacement of natural populations and subspecies with races considered being more suitable for beekeeping purposes (Ruttner 1969; Ruttner 1988). Mainly the Carniolian Honeybee (*A. m. carnica*) was heavily imported into Middle Europe and replaced the native Northern or "Black" Honeybee *A. m. mellifera*. Since the second half of the 20th century also *A. m. ligustica* from Italy is increasingly imported to nearly all other European countries. Nowadays also Spain, England, France and Denmark, which traditionally used their own, native honeybee subspecies in commercial beekeeping, increasingly import *A. m. carnica* and *A. m. ligustica* queens (Cornuet et al. 1986). Resulting from these heavy imports the pressure on native populations in these countries is increasing due to genetic introgression and the replacement of whole populations with foreign subspecies. From the perspective of conservation biology two important components of Europe's honeybee diversity are threatened. First the diversity of native subspecies and populations which are adapted to their local environment and second the genetic diversity within such local populations or subspecies. The genetic diversity of the European Honeybees is of great importance both as a source of genetic variation for the continued use of the honeybee in agriculture and also as part of Europe's natural biological heritage. Resistances to diseases (such as Varroaosis and American Foulbrood) and other desirable traits (such as adaptations to local climatic conditions) may well be among the lost genetic variation.

The effective population size is one of the key factors for the management of threatened species or populations (Wright 1933). Small populations are more affected by stochastic environmental factors like diseases, predation and unfavorable weather conditions. Furthermore, small populations are also more likely to be affected by genetic drift and the loss of genetic variability leading to the increased risk of inbreeding depressions (Hartl & Clark 1997). In short: the lower the effective size of a given population the higher is its vulnerability to extinction

In Honeybees, as well as in all other social insects (bees, wasps and ants), the effective population size is not determined by the number of individuals, which can be excessively high, but by the number of colonies in the population. For example a population of honeybees consisting of one million individuals would consist only of 20 colonies on the average (a single colony of *Apis mellifera* can hold up to 50 000 individuals), and every colony would only harbor a single queen (Winston 1987). Thus, genetically speaking, the queens are the bottleneck the whole population has to pass each generation, since they are the only reproducing females.

The effective population size of social hymenoptera is further restricted by the haplo/diploid sex determination system (in contrast to the termites which have a diploid/diploid sex determination system). Resulting from the haplo/diploid sex determination system the males develop from unfertilized eggs and therefore have no fathers. As a consequence the maximum effective size of a population of social

hymenoptera is 2.25 times the number of colonies, depending on the degree of polyandry of the queens (Kerr 1967, Pamilo & Crozier 1997; Pamilo et al. 1997). Besides the restriction in effective population size the haplo/diploid sex determination system has a further disadvantage which becomes more relevant, when the number of colonies is low. In honeybees the sex of an individual is determined by a single locus (complementary sex determination locus, *csd*) and so not only haploid individuals, but also individuals which are homozygous at the sex locus develop into males. In the latter case these diploid drones are not viable and are cannibalized by the workers (Woyke 1965). When diploid drones occur in high frequencies the reproductive potential and fitness of a colony is reduced. The smaller a population of honeybees the larger the probability for a queen to mate with a drone which carries the same sex determination allele than herself. Thus the proportion of diploid males in a small population will be higher than in a large population, again reducing the viability of a small population. Since the effective population size is directly linked with the mating system of a given species it is an essential parameter for conservation purposes. Moreover the mating system is also correlated with other parameters important for conservation biology like gene flow and dispersal potential.

The Western Honeybee *A. mellifera*, like all species of the genus *Apis*, has a complex mating system where the drones and virgin queens of a population meet at so called drone congregation areas for mating (Winston 1987; Moritz & Southwick 1992). The sex ratio within a colony is extremely biased, while there are only few new queens produced by a colony the number of males can be up to 5000 drones during the peak of the mating season. Thus the production of drones can be a quite expensive task for a colony and weak colonies are known to completely abandon rearing drones. But in the general the male aspect of reproductive biology of social insects had received only little attention from researchers so far. Only few studies have dealt with male fitness and reproductive success of social insect colonies in natural populations (Berg et al 1997, Sundström & Boomsma 2000).

One of the most puzzling characteristics in honeybee mating behaviour is the extreme polyandry of the queen. Mating frequencies of up to 45 matings have been recorded for *Apis mellifera* queens, a number which is even exceeded by queens of the giant honeybee *Apis dorsata* which can mate with more than 100 drones (Wattanachaiyinhcharoen et al. 2003). Many hypotheses have been proposed to explain this behaviour during the last decades, but empirical evidence has been scarce. Most of these hypothesis are based on increased intracolony genetic variability (genetic variance hypothesis) resulting in an increased colony fitness, e.g. through more efficient genetic polyethism (Page et al. 1989; Page et al. 1995), reduced genetic load of the sex locus (Crozier and Page 1985, Tarpy and Page 2002) or herd immunity (Hamilton 1987; Schmid-Hempel 1994). Another, in fact the "intuitively simplest explanation" (Hölldobler & Wilson 1990), for the evolution of polyandry in the social insects is the sperm limitation hypothesis (Cole 1983). However, this hypothesis has been often disregarded and widely neglected as a plausible explanation for the evolution of extreme polyandry in *A. mellifera*.

The manuscripts/papers this thesis is based on address various aspects of the mating biology and population ecology with a particular focus on the consequences for the conservation of the Western honeybee *A. mellifera*:

- I. "Male fitness of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.)" addresses the male reproductive success in honeybees on the colony level and on the level of the individual drone.
- II. "Sperm limitation and the evolution of polyandry in honeybees (*Apis mellifera* L.)" provides first empirical evidence for the sperm limitation hypothesis in *A. mellifera*.
- III. "Heritability of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.)" focuses on the question whether polyandry can be considered selectively neutral based on the estimates for heritability of the mating frequency.
- IV. "Estimating population sizes in social insects using microsatellite DNA analyses of haploid males. An example for *Apis mellifera*." here a method is presented to estimate the size of a population of social hymenoptera based on male genotypes.
- V. "Choice of protection areas for the Western Honeybee (*Apis mellifera* L.)" evaluates the suitability of different habitats for the establishment of conservation areas for *A. mellifera* based on mating frequency data and population sizes.

Cited references

- Berg S, Koeniger N, Koeniger G, Fuchs S (1997) Body size and reproductive success of drones (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, **28**, -460.
- Cole B.J. (1983) Multiple Mating and the Evolution of Social Behaviour in the Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **12**, 191-201.
- Cornuet JM, Daoudi A, Chevalet C (1986) Genetic pollution and number of matings in a black honeybee (*Apis mellifera mellifera*) population. *Theoretical and Applied Genetics*, **73**, 223-227.
- Crozier RH, Page RE, Jr. (1985) On being the right size: male contributions and multiple matings in social Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **18**, 105-115.
- Hamilton, W.D. (1987) Kinship, recognition, disease and intelligence: constraints of social evolution. *Animal Societies* (ed. by Y.Ito, J.L.Brown and J.Kikkawa), pp. 81-102. Japanese Scientific Society Press.
- Hartl DL, Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Hölldobler B & Wilson EO (1990) *The Ants*. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg.
- Kerr W (1967) Multiple alleles and genetic load in bees. *Journal of Apicultural Research*, **6**, 61-64.

- Moritz, R.-F.A. & Southwick, E.E. (1992) *Bees As Superorganisms - An Evolutionary Reality*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Pamilo P, Crozier RH (1997) Population Biology of Social Insect Conservation. *Memoirs of the Museum of Victoria*, **56**, 411-419.
- Pamilo P, Gertsch P, Thoren P, Seppä P (1997) Molecular population genetics of social insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**, 1-25.
- Page RE, Robinson GE, Fondrk MK (1989) Genetic specialists, kin recognition and nepotism in honey-bee colonies. *Nature*, **338**, 576-579.
- Page RE, Jr., Robinson GE, Fondrk MK, Nasr ME (1995) Effects of worker genotypic on honey bee colony development and behavior (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **36**, 387-397.
- Ruttner F (1969) Biometrische Charakterisierung der österreichischen *Carnica*-Biene. *Z Bienenforsch*, **9**, 469-491
- Ruttner F (1988) *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer Verlag, Berlin.
- Schmid-Hempel P (1994) Infection and colony variability in social insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, **346**, 313-321.
- Sundstrom L, Boomsma JJ (2000) Reproductive alliances and posthumous fitness enhancement in male ants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **267**, 1439-1444.
- Tarpy DR, Page RE, Jr. (2001) The curious promiscuity of honey bees (*Apis mellifera*): evolutionary and behavioural mechanisms. *Ann.Zool.Fennici*, **38**, 255-265.
- Wattanachaiyinhcharoen W, Oldroyd BP, Wongsiri S, Palmer K, Paar S (2003) A scientific note on the mating frequency of *Apis dorsata* Fabricius. *Apidologie*, **34**, 85-86.
- Winston (1987) *The Biology of the Honeybee*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts; London, England.
- Woyke (1965) Drones from fertilized eggs and the biology of sex determination in the honeybee. *Apiacta* 1 (1-2): 77-78.
- Wright S (1933) Homozygosis and inbreeding. *Proc Natl Acad Sci Wash*, 411-420.

Male fitness of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.)

Kraus FB¹, Neumann P¹, Scharpenberg H¹, van Praagh J², Moritz RFA¹

¹ Institut für Zoologie Martin Luther Universität Halle/Wittenberg, 06109 Halle Saale, Germany

² Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, Wehlstr. 4a, 29221 Celle, Germany

Journal of Evolutionary Biology **16** (2003) 914-920

Abstract

Honeybees (*Apis mellifera* L.) have an extreme polyandrous mating system. Worker offspring of 19 naturally mated queens was genotyped with DNA microsatellites, to estimate male reproductive success of 16 drone producing colonies. This allowed for estimating the male mating success on both the colony level and the level of individual drones. The experiment was conducted in a closed population on an isolated island to exclude interferences of drones from unknown colonies. Although all colonies had produced similar numbers of drones, differences among the colonies in male mating success exceeded one order of magnitude. These differences were enhanced by the siring success of individual drones within the offspring of mated queens. The siring success of individual drones was correlated with the mating frequency at the colony level. Thus more successful colonies not only produced drones with a higher chance of mating, but also with a significantly higher proportion of offspring sired than drones from less successful colonies. Although the life cycle of honeybee colonies is very female centred, the male reproductive success appears to be a major driver of natural selection in honeybees.

Sperm limitation and the evolution of polyandry in honeybees (*Apis mellifera* L.)

F. B. Kraus¹, P. Neumann¹, J. van Praagh², R.F.A. Moritz¹

¹ Institut für Zoologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06099 Halle/Saale, Germany

² Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, Wehlstr. 4a, 29221 Celle, Germany

Behavioral Ecology and Sociobiology (in press)

Abstract

Honeybee queens (*Apis mellifera*) show extreme levels of polyandry, but the evolutionary mechanisms underlying this behaviour are still unclear. The "sperm-limitation hypothesis", which assumes that high levels of polyandry are essential to get a life time sperm supply for large and long lived colonies, has been widely neglected for honeybees because the semen of a single male is in principal sufficient to fill the spermatheca of a queen. But the inefficient post mating sperm transfer from the queen's lateral oviducts into the spermatheca requires multiple matings to ensure the spermatheca filling. Males of the African honeybee subspecies *A. m. capensis* have fewer sperm than males of the European subspecies *A. m. carnica*. Thus, given sperm limitation is a causative for the evolution of multiple mating in *A. mellifera*, we would expect *A. m. capensis* queens to have higher mating frequencies than *A. m. carnica*. Here we show that *A. m. capensis* queens indeed show significantly higher mating frequencies than queens of *A. m. carnica*, both in their native ranges and in an experiment on a North Sea island. We conclude that honeybee queens try to achieve a minimum number of matings on their mating flights to ensure a sufficient life time sperm supply. It seems thus premature to discard the sperm limitation hypothesis as a concept explaining the evolution of extreme polyandry in honeybees.

Heritability of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.)

F. Bernhard Kraus ¹, Peter Neumann ¹, Robin F.A. Moritz ¹ and Sarah E. Radloff ²

¹ Institut für Zoologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06099 Halle/Saale, Germany

² Department of Statistics, Rhodes University, Grahamstown 6140, RSA

Submitted to *Journal of Heredity*

Abstract

The heritability of queen mating frequency was studied in honeybees (*Apis mellifera carnica*). Worker offspring (N=966) of 28 naturally mated half sister-queens ($r=0.25$) from seven unrelated breeding lines were genotyped at four DNA microsatellites. The mating frequencies of the queens were derived from the offspring genotypes. The number of observed matings per queen ranged from 10 to 28 with an average of 17.32 ± 1.10 (number of estimated matings: 24.94 ± 2.51). Half-sib analyses of the breeding lines yielded a heritability estimate of $h^2=0.45 \pm 0.14$ for the estimated number of matings. We conclude that the high genetic variance for polyandry in honeybees is probably favored by balanced selection between individual queen and colony level.

Estimating population sizes in social insects using microsatellite DNA analyses of haploid males. An example for *Apis mellifera*.

F. B. Kraus¹, R. F.A. Moritz¹

¹Institut für Zoologie, Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, D 06099 Halle/Saale Germany

Submitted to *Molecular Ecology*

Abstract

In social insects primarily the number of colonies rather than the actual number of individuals in the population determines the effective population size. We here present a method where microsatellite data of haploid males can be used to estimate population size. A cluster analysis which is based on the allelic identity among male genotypes is used to group potential brother males. For each "brother cluster" the corresponding mother queen genotype is determined by Mendelian inference. We show in various simulations that although limited number of screened loci can result in slightly biased estimates, the precision improves considerably with increasing number of loci. Empirical data from microsatellite studies of the Western Honeybee (*Apis mellifera* L.) is presented to illustrate the application of the procedure.

Choice of protection areas for the Western Honeybee (*Apis mellifera* L.)

F. B. Kraus¹, R.F.A. Moritz¹

¹ *Institut für Zoologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06099 Halle/Saale, Germany*

Manuscript for submission to *Conservation Genetics*

Abstract

The natural distribution area of the western honeybee (*Apis mellifera* L.) stretches across Africa, the Near East and Europe. Over this immense distribution area the western honeybee has split into many subspecies and races, adapted to local environmental conditions. Nowadays even European countries which formerly traditionally used native races, more and more rely on import of foreign races, which are believed to be superior for beekeeping. As a result of this process many local populations and subspecies are increasingly threatened, since wild populations still share their gene pool with the domesticated ones. We evaluated the suitability of four areas for the establishment as conservation areas for honeybees. By using microsatellite markers we estimated the mating success of queens in the target areas which is essential for the maintaining of high effective population sizes. Further we calculated effective population sizes of the four populations and tested for recent bottlenecks. The mainland areas proved to be more suitable for conservation purposes than islands, because the low mating frequencies on Islands will result in lower effective population sizes. Secluded mountain areas might be preferable for conservation purposes since they provide both moderately good mating conditions as well as isolation from surrounding populations.

Zusammenfassung

Einfluss der Paarungsbiologie auf die Populationsökologie der Honigbiene (*Apis mellifera* L.).

Das Verbreitungsgebiet der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera* L.) erstreckt sich von Nordeuropa über den Nahen Osten bis hin zum Cap von Afrika. In Anpassung an lokale Umweltbedingungen hat sich die Westliche Honigbiene in zahlreiche Unterarten und Rassen aufgespalten. Seit Beginn des 20sten Jahrhunderts kam es in Mitteleuropa, insbesondere in Deutschland zu einer Verdrängung der einheimischen Honigbienen Populationen durch massive Importe der Carnica Rasse (*A. m. carnica*), die als für die Imkerei geeigneter betrachtet wurden. Heutzutage gilt aufgrund dieser "Zuchtbemühungen" die einst heimische Unterart *A. m. mellifera* in Deutschland als ausgestorben. In jüngerer Zeit importieren nun auch immer mehr europäische Staaten, die bisher traditionell auf ihre einheimischen Bienen zur Imkerei und Zucht zurückgriffen, fremde Bienenrassen. Hauptsächlich sind dies die italienische Honigbiene *A. m. ligustica*, aber auch *A. m. carnica*. Aufgrund der Paarungsbiologie der Honigbiene teilen domestizierte Populationen immer noch den Genpool mit wilden Populationen. Daraus resultierend geraten wilde Populationen in großen Teilen Europas immer mehr unter Druck und laufen Gefahr völlig durch importierte Unterarten ersetzt zu werden.

Zwei Komponenten der Biodiversität der europäischen Honigbienen sind durch diese Entwicklung gefährdet: Zum einen die Diversität der Unterarten und Populationen, die sich an die lokalen Umweltbedingungen angepaßt haben, zum anderen die genetische Variabilität innerhalb dieser Populationen und Unterarten. Die genetische Variabilität der europäischen Honigbiene ist sowohl als Teil des europäischen Naturerbes, als auch für die Imkerei selbst von großem Wert. Denn durch den Verlust genetischer Variabilität können auch für die Imkerei wünschenswerte Merkmale, wie Resistenzen gegenüber Krankheitserregern (z. B. gegen Varroa oder Faulbrut) verloren gehen.

Einer der wichtigsten Parameter für Artenschutz und Management bedrohter Populationen ist die effektive Populationsgröße. Kleine Populationen sind in weit größerem Ausmaß von stochastischen Umweltfaktoren wie Krankheiten, Predatordruck oder klimatische Schwankungen betroffen als große Populationen. Zusätzlich sind kleine Populationen auch stärker betroffen durch genetische Drift und den Verlust genetischer Variabilität, was wiederum das Risiko für Inzuchtdepressionen erhöht. Das Zusammenspiel dieser stochastischen und genetischen Faktoren erhöht somit das Extinktionsrisiko kleiner Populationen erheblich.

Im Falle der Honigbienen (wie ebenso bei allen anderen sozialen Insekten) wird die effektive Populationsgröße nicht durch die Anzahl der Individuen, sondern durch die Anzahl der Kolonien bestimmt. Zum Beispiel kann eine Population von einer Millionen Honigbienen auf lediglich 20 Kolonien und somit auf 20 Königinnen zurückgeführt werden. Bei sozialen Hymenopteren stellt darüber hinaus das

haplo/diploide Geschlechtsbestimmungssystem eine weitere Begrenzung der effektiven Populationsgröße dar (im Gegensatz zu den Termiten die ein diplo/diploides Geschlechtsbestimmungssystem haben). Die maximale effektive Populationsgröße bei sozialen Hymenopteren ist das 2.25 -fache der Anzahl der Königinnen in Abhängigkeit von der durchschnittlichen Anzahl von Paarungen pro Königin. Neben der Begrenzung der effektiven Populationsgröße hat das haplo/diploide Geschlechtsbestimmungssystem bei der Honigbiene einen weiteren Nachteil. Das Geschlecht eines Individuums wird lediglich durch einen einzigen Locus bestimmt (complementary sex determination locus, *csd*), und folglich entwickeln sich nicht nur haploide Individuen, sondern auch an diesem Locus homozygote Individuen zu Drohnen. Diese Drohnen sind nicht lebensfähig und werden von den Arbeiterinnen kanibalisiert. Wenn diploide Drohnen in hoher Frequenz auftreten reduziert das die Reproduktion und Fitness einer Kolonie. Die Wahrscheinlichkeit daß sich eine Königin mit einem Drohn verpaart der das gleiche Geschlechts bestimmende Allel trägt wie sie selbst ist um so höher je kleiner die Population ist, der beide entstammen. Der Anteil an diploiden Drohen ist in kleinen Population somit erhöht. Da das Paarungssystem einer Art unmittelbaren Einfluss auf die effektive Populationsgröße hat, sind detaillierte Kenntnisse der Paarungsbiologie essentiell für den Artenschutz und das Management gefährdeter Populationen. Darüber hinaus hat das Paarungssystem auch direkten Einfluß auf weitere für den Artenschutz wichtige Parameter wie Genfluss und Ausbreitungspotential.

Die Westliche Honigbiene (*A. mellifera* L.) hat, wie alle Vertreter der Gattung *Apis*, ein komplexes Paarungssystem bei dem sich alle Drohnen einer Population an sogenannten Drohnensammelplätzen einfinden um sich dort mit den Königinnen zu verpaaren. Das Geschlechterverhältnis ist bei *Apis* extrem verschoben. Während eine einzige Kolonie mehrere tausend Drohnen in einer Saison produziert, sind es nur einige wenige Königinnen. Die Produktion solch großer Mengen Drohnen ist für eine Kolonie mit hohen Kosten verbunden und schwache Kolonien verzichten gegebenenfalls ganz darauf Drohnen zu produzieren. Der männliche Teil der Paarungsbiologie bei sozialen Insekten wurde bisher allerdings nur wenig beachtet, und nur wenige Studien haben sich bisher mit ihm beschäftigt.

Ein weiterer sehr erstaunlicher Aspekt der Paarungsbiologie der Honigbiene ist die extreme Polyandrie der Königinnen. Königinnen von *A. mellifera* paaren sich mit bis zu 45 Drohnen und für Königinnen der Riesenhonigbiene *A. dorsata* wurden sogar bis zu 100 Paarungen beschrieben. In den letzten Jahrzehnten wurde viele Hypothesen formuliert um dieses Verhalten zu erklären, aber empirische Daten die eine dieser Hypothesen unterstützen sind eher selten. Die meisten dieser Hypothesen beruhen auf der durch Polyandrie erhöhten genetische Variabilität innerhalb des Bienenvolkes, die wiederum eine erhöhte Fitness auf der Kolonieebene zur Folge haben soll. Die erhöhte genetische Variabilität könnte z. B. eine effizientere Arbeitsteilung, einen besseren Schutz gegen Parasiten oder Reduzierung des Risikos der Produktion diploider Drohnen (s.o.) zur Folge haben. Eine weitere Hypothese, die "Spermienlimitierungs-Hypothese", erklärt die Polyandrie der Königinnen mit der Notwendigkeit einen ausreichend großen Spermienvorrat für entsprechend große und langlebige Kolonien zu erhalten. Diese Hypothese wurde bisher allerdings im Falle der Honigbiene als unplausibel erachtet, obwohl sie die intuitiv einfachste Erklärung darstellt.

Die dieser Dissertation zu Grunde liegenden fünf Publikationen/Manuskripte beschäftigen sich zum einen mit der Paarungsbiologie der Westlichen Honigbiene (*A. mellifera*) und zum anderen mit ihrer Populationsökologie und den daraus folgenden Konsequenzen für den Schutz ihrer Biodiversität in Europa.

I. Reproduktiver Erfolg von Drohenvölkern der Honigbiene (*A. mellifera* L.)

Male fitness of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.)

Kraus FB, Neumann P, Scharpenberg H, van Praagh J, Moritz RFA

Die Honigbiene (*Apis mellifera* L.) hat ein extrem polyandrisches Paarungssystem, bei dem sich die Drohnen und Königinnen einer Population an sogenannten Drohnensammelpätzen treffen um sich zu verpaaren. Arbeiterinnenbrut von 19 natürlich verpaarten Königinnen wurde mittels DNA Mikrosatelliten genotypisiert um den Paarungserfolg von 16 Drohenvölkern zu ermitteln. Auf diese Weise war es möglich den männlichen Paarungserfolg sowohl auf der Kolonieebene als auch auf der Ebene individueller Drohnen abschätzen zu können. Das Experiment wurde in einer geschlossenen Population auf einer isolierten Nordsee Insel durchgeführt um Beeinträchtigungen durch Drohnen unbekannter Herkunft auszuschließen. Obwohl alle Drohnenkolonien eine annähernd gleiche Anzahl von Drohnen produzierten, überstiegen die Unterschiede im Paarungserfolg (Anzahl der Paarungen/Volk) eine Größenordnung. Diese Unterschiede wurden durch den individuellen Paarungserfolg der Drohnen (Anzahl der Nachkommen pro Drohn) sogar noch vergrößert. Der Individuelle Paarungserfolg eines Drohns war positiv mit dem Paarungserfolg auf Kolonieebene korreliert. Das bedeutet, daß erfolgreiche Kolonien nicht nur Drohnen hervorbringen die eine größere Chance zur Paarung haben sondern auch durchschnittlich mehr Nachkommen erzeugen als Drohnen weniger erfolgreicher Kolonien. Obwohl der Lebenszyklus einer Honigbienenkolonie sehr auf das weibliche Geschlecht zentriert ist, scheint der Paarungserfolg der Drohnen eine nicht zu unterschätzende Rolle für die natürlichen Selektion der Honigbiene zu spielen.

II. Spermienlimitierung und die Evolution der Polyandrie bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.)

Sperm limitation and the evolution of polyandry in honeybees (*Apis mellifera* L.)

FB Kraus, P Neumann, J van Praagh, RFA Moritz

Honigbienen Königinnen sind extrem polyandrisch, aber die evolutiven Ursachen dieses Verhaltens sind nach wie vor noch ungeklärt. Die "Spermienlimitierung-Hypothese" erklärt die Entstehung der Polyandrie damit, daß Königinnen sich mehrfach paaren müssen um einen ausreichenden Spermiovorrat anzulegen mit dem es möglich ist große und langlebige Kolonien hervorzubringen. Im Falle der Honigbiene wurde diese Hypothese jedoch meist abgelehnt, weil ein einziger Drohn genügend Sperma besitzt um die Spermatheca einer Königin komplett zu füllen. Allerdings benötigt eine Königin, aufgrund eines mangelhaften postkopulatorischen Spermien Transfermechanismus von den lateralen Oviducten in die Spermatheca, trotzdem mehrere Paarungen um ihre Spermatheca ausreichend zu füllen. Drohnen der afrikanischen Unterart *A. m. capensis* besitzen durchschnittlich weniger Spermien als die der europäischen Unterart *A. m. carnica*. Sollte also die Spermienlimitierung eine der Ursachen für die Evolution der Polyandrie bei der

Honigbiene sein würde wir erwarten daß Königinnen von *A. m. capensis* höhere Paarungsfrequenzen aufweisen als Königinnen von *A. m. carnica*. In dieser Untersuchung konnten wir zeigen, daß Königinnen von *A. m. capensis* in der Tat höhere Paarungsfrequenzen als Königinnen von *A. m. carnica* aufweisen, sowohl in ihren endemischen Verbreitungsgebieten als auch in einem Experiment auf einer Nordsee Insel. Daraus schließen wir daß Königinnen eine Mindestanzahl von Paarungen anstreben um einen ausreichend großen Spermienvorrat zu erhalten. Es erscheint somit ungerechtfertigt die Spermienlimitierungs Hypothese als eine Ursache für die Polyandrie bei der Westlichen Honigbiene abzulehnen.

III. Heritabilität von Paarungsfrequenzen bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.)

Heritability of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.)
FB Kraus , P Neumann , RFA Moritz and SE Radloff

Die Heritabilität der Paarungsfrequenz von Königinnen der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera*) wurde untersucht. Dazu wurde Arbeiterinnenbrut (N=966) von 28 natürlich verpaarten Geschwisterköniginnen ($r=0.25$) aus sieben unverwandten Zuchtlinien mittels vier DNA Mikrosatelliten genotypisiert. Die Paarungsfrequenzen der Königinnen wurden aus den Genotypen ihrer Arbeiterinnen abgeleitet. Die Anzahl der beobachteten Paarungen reichte von 10 bis 28 Paarungen pro Königin mit einem Durchschnitt von 17.32 ± 1.10 (Anzahl der geschätzten Paarungen: 24.94 ± 2.51). Halbgeschwister Analysen der Zuchtlinien ergaben einen Schätzwert für die Heritabilität von $h^2=0.45 \pm 0.14$ für die Anzahl der geschätzten Paarungen. Wir schließen daraus daß die hohe genetische Varianz für die Paarungsfrequenzen bei der Honigbiene begünstigt wird durch eine balancierende Selektion zwischen der Ebene der individuellen Königin und der Kolonieebene.

IV. Abschätzung der Populationsgröße bei sozialen Insekten mittels Mikrosatelliten Analyse von haploiden Männchen. Ein Beispiel für *Apis mellifera*.

Estimating population sizes in social insects using microsatellite DNA analyses of haploid males. An example for *Apis mellifera*.
RFA Moritz, FB Kraus

Bei sozialen Insekten bestimmt eher die Anzahl der Kolonien als die Anzahl der Individuen in einer Population die effektive Populationsgröße. Wir stellen hier eine Methode vor, bei der Mikrosatellitenanalysen von haploiden Männchen dazu benutzt werden können die Populationsgröße abzuschätzen. Mittels einer auf der allelischen Identität zwischen den Genotypen der Männchen basierenden Clusteranalyse wurden die Männchen zu potentiellen Bruderclustern gruppiert. Für jedes Brudercluster wurde der Genotyp der zugehörigen Mutterkönigin mittels der Mendelschen Regeln hergeleitet. Mit Hilfe von Simulationen konnten wir zeigen daß die Genauigkeit der Abschätzung sehr schnell mit der Anzahl der verwendeten Loci ansteigt, auch wenn eine begrenzte Anzahl Loci zu leicht verzerrten Abschätzungen führen kann. Empirische Daten einer Population der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera* L.) werden präsentiert um das Verfahren zu verdeutlichen.

V. Auswahl von Schutzgebieten für die Westliche Honigbiene (*Apis mellifera* L.)

Choice of protection areas for the Western Honeybee (*Apis mellifera* L.)
FB Kraus, RFA Moritz

Das natürliche Verbreitungsgebiet der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera* L.) erstreckt sich über Europa, den Nahen Osten und Afrika. In diesem gewaltigen Verbreitungsgebiet hat sich die Honigbiene, in Anpassung an lokale Umweltbedingungen, in viele Unterarten und Rassen aufgespalten. Allerdings importieren heutzutage immer mehr europäische Länder, die traditionell einheimische Bienenrassen nutzen, fremde Bienenrasse, die für die Bienenhaltung als geeigneter angesehen werden. Eine Folge dieses Prozesses ist, daß immer mehr lokale Populationen und Unterarten verdrängt werden, da wilde Populationen immer noch den Genpool mit den von Menschen gehaltenen Populationen teilen.

Insgesamt vier Gebieten wurden im Hinblick auf ihre Eignung für die Errichtung von Schutzgebieten für die Westliche Honigbiene bewertet. Dazu wurde der Paarungserfolg von Königinnen in diesen Gebieten, der eine der Grundvoraussetzungen für den Erhalt hoher effektiver Populationsgrößen ist, mittels Mikrosatelliten bestimmt. Die effektiven Größen der dort ansässigen Populationen wurden berechnet, und ein Test auf kürzlich erfolgte genetische Flaschenhalse (Bottleneck) durchgeführt. Die Festlandgebiete erwiesen sich als geeigneter für die Etablierung von Schutzgebieten, weil die auf Inseln vorherrschenden geringen Paarungsfrequenzen in geringeren effektiven Populationsgrößen resultieren. Abgeschiedene Bergregionen erwiesen sich als der wohl beste Kompromiß zwischen reproduktiver Isolation von umliegenden Populationen und moderat guten Paarungsfrequenzen.

Appendix

Curriculum vitae of Frank Bernhard Kraus

Personal Data:

Date of birth: 03.07.1971
Place of birth: Mannheim
Parents: Heinz and Christa Kraus
Nationality: German

School education:

1978 - 1982 Diesterweg Grundschule (Mannheim)
1983 - 1991 Johann Sebastian Bach Gymnasium (Mannheim)
1991 Abitur

1992 - 1993 Civil Service

Academic education:

1994 - 2000 Study of Biology (Zoology, Botany, Anorganic Chemistry)
at the J. W. Goethe-Universität Frankfurt a. Main
Jan. 2000 Diplom in Biology.
Title of Diplom thesis:
"Populationsökologische und -genetische Untersuchungen
am Kleinen Blaupfeil (*Orthetrum coerulescens*)"
since November 2000 Research assistant at the MLU Halle/Wittenberg

F. Bernhard Kraus

Halle/Saale, den 07.07. 2003

Eigener Anteil an den eingereichten Publikationen:

I. Male fitness of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.)

Kraus FB, Neumann P, Scharpenberg H, van Praagh J & Moritz RFA (2003)

Projektidee, Genetische Analysen (Proben aus Jahr 2000), Datenanalysen, Manuskript.

II. Sperm limitation and the evolution of polyandry in honeybees (*Apis mellifera* L.)

Kraus FB, Neumann P, van Praagh J & Moritz RFA (2003)

Projektidee, Genetische Analysen (Proben von Neuwerk 2000, Schwarzenau), Datenanalysen, Manuskript.

III. Heritability of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.).

Kraus FB, Neumann P, Moritz RFA & Radloff SA (2003)

Projektidee, Genetische Analysen (Zuchtlinie G), Datenanalysen, Manuskript.

IV. Estimating population sizes in social insects using microsatellite DNA analyses of haploid males. An example for *Apis mellifera*.

Kraus FB & Moritz RFA (2003)

Projektidee, Genetische Analysen, Datenanalysen, Manuskript.

V. Choice of protection areas for the Western Honeybee (*Apis mellifera* L.)

Kraus FB & Moritz RFA (2003)

Projektidee, Freilandarbeit, Genetische Analysen, Datenanalysen, Manuskript.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Promotionsarbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur erstellt zu haben.

F. Bernhard Kraus

Halle/Saale, den 07.07. 2003