Komplementäre Geschlechtsbestimmung bei Brackwespen: Inzuchtdepression und Inzuchtvermeidung

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. Nat.)

Dem Fachbereich der Biologie und Chemie (FB2) der

Universität Bremen

Vorgelegt von

Anne C. Weeda

November 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. T. S. Hoffmeister, Universität Bremen

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Ruther, Universität Regensburg

Kolloquium: 16.12.2014, UFT 1790

Inhalt

1. Allgemeine Einleitung 3

1.1 biologische Schädlingsbekämpfung, komplementäre Geschlechts-bestimmung und Inzucht 3

1.2 Charakterisierung der behandelten Organismen 8

1.2.1 Schmetterlinge 8

1.2.2 Parasitoide 9

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 13

2. Generelle Methoden 15

2.1 Zucht und Hälterung der verwendeten Organismen 15

2.1.1 Wirte 15

2.1.2 *Parasitoide* 16

2.2 Datenaufnahme und statistische Auswertung 18

2.2.1 Anmerkungen zur Durchführung der Versuche 18

2.2.2 Statistische Auswertung der Daten 22

3. Produktion diploider Männchen und Inzuchtdepression auf Art- und Populationsniveau 25

3.1 Material und Methoden 27

3.1.1 Temperaturabhängige Lebensdauer 27

3.1.2 Produktion diploider Männchen 28

3.1.3 Inzuchtdepression 31

3.1.4 Statistische Auswertung 32

3.2 Ergebnisse 34

3.2.1 Temperaturabhängige Lebensdauer 34

3.2.2 Produktion diploider Männchen 34

3.2.3 Inzuchtdepression 36

3.3 Diskussion 40

4. Verhalten und Fertilität polyploider Brackwespen 45

4.1 Diploide Männchen 45

4.1.1 Material und Methoden 47

4.1.2 Statistische Analyse 49
4.1.3 Ergebnisse 51
4.1.4 Diskussion 53
4.2 Triploide Weibchen 55
4.2.1 Material und Methoden 55
4.2.2 Statistische Analyse 56
4.2.3 Ergebnisse 58
4.2.4 Diskussion 60
4.3 Fazit 61
5. Strategien zur Vermeidung von Geschwisterverpaarungen 63
5.1 Material und Methoden 64
5.1.1 Postnatale Verbreitung 64
5.1.2 Altersbedingte Paarungsbereitschaft 65
5.1.3 Geschwistererkennung 67
5.1.4 Statistische Analyse 68
5.2 Ergebnisse 70
5.2.1 Postnatale Verbreitung 70
5.2.2 Altersbedingte Paarungsbereitschaft 71
5.2.3 Geschwistererkennung 72
5.3 Diskussion 73
6. Schlussbetrachtung 77
7. Zusammenfassung 83
8. Summary 85
9. Referenzen 87
9.1 Literatur 87
9.2 Danksagung 93
9.3 Erklärung 95

1. Allgemeine Einleitung

1.1 biologische Schädlingsbekämpfung, komplementäre Geschlechts-bestimmung und Inzucht

Moderne Intensivlandschaft und forstwirtschaftliche Monokulturen führen zum Verlust von Mikrohabitaten, wodurch die Bedingungen für phytophage Schädlinge, z.B. Pilze oder Schadinsekten, begünstigt werden (Dettner & Zwölfer, 2003). Die gleichzeitige Reduktion der Entomophagenfauna kann zu hohen Ernteeinbußen führen und im schlimmsten Fall sogar die Existenz des Landwirts gefährden (Dettner & Zwölfer, 2003). Um dies zu verhindern gibt es verschiedene Methoden zur Schädlingsbekämpfung, die einzeln oder als integrierter Pflanzenschutz in Kombination miteinander angewendet werden können (Dettner & Zwölfer, 2003, Townsend *et al.*, 2002). An dieser Stelle wird nur auf die Schädlingsbekämpfung eingegangen, die sich durch eine kontrollierte und vor allem chemikalienfreie Bekämpfung von Schadinsekten, d.h. Insektenarten, die Nutzpflanzen befallen und dadurch die Ernte reduzieren, auszeichnet (Begon *et al.*, 1990). Diese Methode basiert auf der populations-ökologischen Erkenntnis, dass Populationen von Herbivoren in Pflanzen-Herbivor-Parasitoidensystemen oft einer Top-down-Kontrolle durch Parasitoide unterliegen, d.h. die Abundanz der Hebivoren und somit auch die der Pflanzen wird durch den Top-Prädator reguliert (Begon *et al.*, 1990). Als Parasitoide bezeichnet man beispielsweise parasitische Insekten, denen der Körper eines anderen Arthropoden (Wirt), meist aus den Gruppen Lepidoptera und Diptera, während der Larvalentwicklung als Nahrungsgrundlage dient (Godfray, 1994). Je nach Art parasitieren die Weibchen der ausgebrachten Nützlinge (Parasitoide) unterschiedliche Entwicklungsstadien eines Schadinsektes und verhindern so dessen Weiterentwicklung zum adulten Tier (Godfray, 1994).

Im Rahmen der klassischen biologischen Schädlingsbekämpfung werden die Einführung und teilweise auch die Etablierung des natürlichen Feindes aus einer anderen geographischen Region angestrebt, wofür die Bedingungen im Zielhabitat zur Biologie der Nützlingsart passen müssen (Dettner & Zwölfer, 2003, Townsend *et al.*, 2002). Ist die Etablierung erfolgreich, so nutzt jede Folgegeneration der Parasitoide erneut die Schadinsekten als Wirte, bis diese nicht mehr bzw. nur noch minimal im Feld vorhanden sind (Dettner & Zwölfer, 2003, Townsend *et al.*, 2002). Verhindern die lokalen Bedingungen die Etablierung der Nützlinge, beispielsweise durch ein für die verwendete Art ungünstiges Klima (Chihrane & Laugé, 1996), so können in Massen gezüchtete Parasitoide entweder inokulativ oder inundativ appliziert werden (Townsend *et al.*, 2002). Bei der inokulativen Applikation werden Nützlinge immer wieder neu ausgebracht (Hoffmann *et al.*, 2006), wohingegen die inundative Applikation auf eine Überschwemmung der

Nutzpflanzen mit einer großen Menge von Nützlingen, die die anwesenden Schädlinge abtöten, setzt (Kuske *et al.*, 2003).

Um eine neue Nützlingsart einsetzten zu können ist es essenziell, dass dieser Parasitoid überhaupt unter Laborbedingungen gezüchtet werden kann. Dabei spielt die Züchtbarkeit des Wirtes auch eine große Rolle. Unter Umständen kann es durch eine Anpassung der Photoperiode und/oder der Temperatur gelingen eine Diapause des Wirtes zu vermeiden oder frühzeitig zu terminieren (Eizaguirre *et al.*, 1994). Schlagen alle Versuche den natürlichen Wirt zu züchten fehl, weil dieser eine lange Diapause macht und nur eine oder wenige Generationen pro Jahr hervorbringt, so ist ein Ersatzwirt von Nöten. Allerdings gibt es nur wenige Systeme bzw. Arten, die sich kommerziell auf Standardwirten züchten lassen (Thompson, 1999), z.B. Eiparasitoide der Gattung *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), die Schmetterlinge parasitieren (Tunçbilek & Ayvaz, 2003). Des Weiteren sind vornehmlich die Weibchen bzw. ein hoher Weibchenanteil für eine effiziente Zucht von Interesse, da nur weibliche Parasitoide Wirte parasitieren (Godfray, 1994). Vor allem parthenogenetische Arten, bei denen Weibchen sich nicht verpaaren müssen, um Töchter hervorzubringen (Godfray, 1994), sind vom Zeit- und Kostenaufwand besonders attraktiv für Massenzuchten, da jedes Individuum für die biologische Schädlingsbekämpfung verwendet werden kann.

Ein Anwendungsgebiet der biologischen Schädlingsbekämpfung ist das Maissystem. In diesem legen die Weibchen des Maiszünslers *Ostrinia (Pyrausta) nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae) ihre Eier an Maispflanzen (Eidmann, 1926). Die schlüpfenden Schmetterlingslarven höhlen Maiskolben und Stängel durch ihre Fraßtätigkeit aus, wodurch die Halme umknicken und es zu Ernteausfällen kommt (Eidmann, 1926). Um dem entgegen zu wirken wird *O. nubilalis* seit Jahren mit Endoparasitoiden der Gattung *Trichogramma* bekämpft, die ihre Eier in die Zünslereier legen (Hoffmann *et al.*, 2006). Seit 2006 sind jedoch zwei Generationen dieses Maisschädlings im Feld anzutreffen (Pölitz *et al.*, 2007). Teilweise überlappende Generationen erschweren hierbei die Bestimmung des zweiten Ausbringungstermins und können zu einem geringeren Wirkungsgrad führen, da sich ein Teil der Zünslereier unter Umständen schon zu Larven weiterentwickelt hat und von *Trichogramma* nicht mehr parasitiert werden kann (O. Zimmermann, Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg, Karlsruhe, pers. Mitteilung). Als potentielle Nützlingsart bietet sich hier die Brackwespe *Bracon* (*Habrobracon*) *brevicornis* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae) an, die bereits aus Maiszünslerlarven isoliert werden konnte (Pölitz *et al.*, 2007). Allerdings kam es bei der Zucht von *B. brevicornis* mehrfach zu Problemen durch sehr hohe Männchenanteile und Populationseinbrüche (O. Zimmermann, Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg, Karlsruhe, pers. Mitteilung), nach

dessen Ursachen in dieser Arbeit geforscht wurde, um Lösungswege für die Unterhaltung einer funktionierenden Massenzucht entwickeln zu können. Ein geringer Weibchenanteil erschwert nicht nur die Erhaltung der Zucht, sondern minimiert auch die Anzahl verfügbarer Nützlinge zur Bekämpfung von Schadinsekten, für die oftmals Hymenopteren-Weibchen verwendet werden (Austin *et al.*, 2005).

Die genetische Diversität einer Population, also die Anzahl vorliegender Gene, wird durch das verwendete Ausgangsmaterial begrenzt und kann zwischen frisch etablierten Zuchten variieren, da sich beprobte Freilandpopulationen verschiedener Standorte genetisch stark voneinander unterscheiden können (Kneeland *et al.*, 2012). Durch genetischen Drift und Inzucht kommt es im Laufe der Zeit zu einer Reduktion des vorhandenen Genpools (Charlesworth & Willis, 2009, Leberg, 1992). Eine daraus resultierende Inzuchtdepression führt zu einem höheren Anteil an Individuen mit einer verringerten Fitness (Charlesworth & Willis, 2009). Zusätzlich kann es aber auch zur Selektion bestimmter Eigenschaften kommen, die für die Zucht bzw. den Einsatz der Nützlinge unerwünscht sind. An die Nachkommen weitergegebene negative Mutationen treten bei diploiden Tieren nur auf, wenn das kodierende Gen rezessiv ist und die Allele heterozygot vorliegen (Goldstein, 1994). Bei haplodiploiden Hymenopteren, deren Weibchen aus befruchteten Eiern schlüpfen, während sich unbefruchtete Eier zu Männchen entwickeln (Cook, 1993), werden schädliche Gene in haploiden Männchen exprimiert wodurch solche Gene selektiv aus einer Population verschwinden (Goldstein, 1994). Im Vergleich zu diploiden Arten sollten haplodiploide Tiere demnach weit weniger unter Inzucht leiden (Henter, 2003).

Die Haplodiploidie ist jedoch nur ein Mechanismus, durch den das Geschlecht der Hymenopteren festgelegt werden kann. So ist bei einigen Hymenopterenarten die sogenannte komplementäre Geschlechtsbestimmung (CSD; Whiting, 1943) zu finden, bei der die Allelkomposition an einem (sl-CSD) oder mehreren (ml-CSD) csd-Loci entscheidend ist (de Boer *et al.*, 2008). Auch hier entwickeln sich unbefruchtete Eier zu haploide Männchen (hemizygot am csd-Locus) während aus diploiden Eiern entweder Weibchen (heterozygot am csd-Locus) oder diploide Männchen (homozygot am csd-Locus) hervorgehen (Cook, 1993). Diploide Männchen entstehen durch eine Übereinstimmungsverpaarung (matched mating; Cook & Crozier, 1995) bei der das csd-Allel des Männchens mit einem Allel des weiblichen Paarungspartners übereinstimmt (Abb. 1.1 A). Bis auf die Arten *Euodynerus foraminatus* Sassure (Hymenoptera: Vespidae) und *Cotesia glomerata* Linnaeus (Hymenoptera: Braconidae), bei denen diploide Männchen fast annähernd so fertil sind wie haploide (Cowan & Stahlhut, 2004, Elias *et al.*, 2009), sind diploide Männchen bei den meisten dokumentierten Parasitoidenarten nicht lebensfähig (Cook & Crozier, 1995) oder steril (Cook, 1993, Holloway *et al.*, 1999,

Stouthamer *et al.*, 1992). Weibchen, die sich mit solch einem Männchen verpaaren, sind anschließend gezwungen entweder nur noch haploide Söhne (Heimpel & de Boer, 2008) oder sterilen triploiden Nachwuchs hervorzubringen (Cournault & Aron, 2009, de Boer *et al.*, 2007b). Folglich können in kleinen Populationen mit single-locus CSD (sl-CSD) sehr schnell Inzuchtdepressionen sichtbar werden.

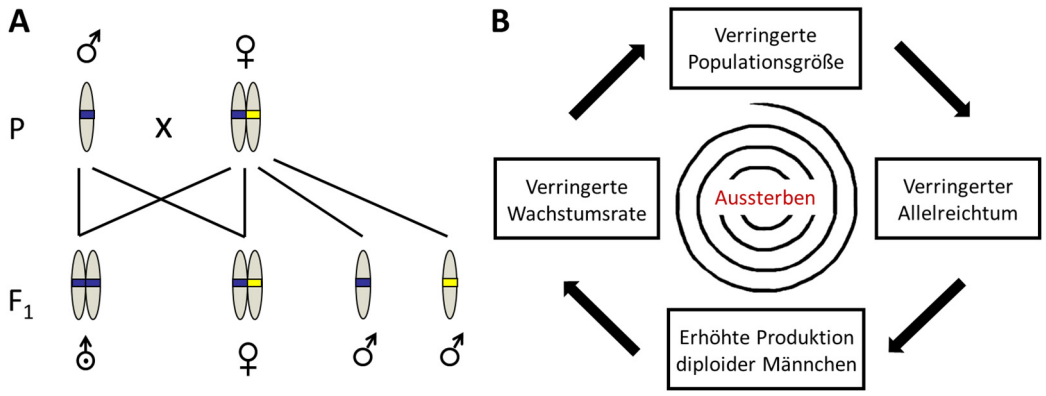

Abb. 1.1: (A) Übereinstimmungsverpaarungen (*matched matings*) in der Elterngeneration P führen zu drei verschiedenen Arten von Nachkommen: diploide homozygote Männchen (F1 links; gleichfarbige Bänder auf den Chromosomen), diploide heterozygote Weibchen (F1 Mitte; verschiedenfarbige Bänder auf den Chromosomen) oder haploide hemizygote Männchen aus unbefruchteten Eiern (F1 rechts). (B) Die Produktion diploider Männchen kann in kleinen Populationen den *diploid male vortex* initiieren (nach Zayed & Packer, 2005).

Die Produktion diploider Männchen (DMP) hängt vom Grad der Inzucht, der Populationsgröße sowie der Anzahl an Geschlechtsbestimmungsallelen und -loci ab (Cook & Crozier, 1995, de Boer *et al.*, 2008). Vor allem kleine isolierte Populationen mit sl-CSD haben ein hohes Aussterberisiko und können durch externe Faktoren, z.B. Habitatverlust und -fragmentierung, in den so genannten *diploid male vortex* (DMV) gelangen (Zayed & Packer, 2005). In diesem erniedrigt die geschrumpfte Populationsgröße nicht nur die Wachstumsrate und die Anzahl vorhandener csd-Allele sondern erhöht gleichzeitig die Produktion diploider Männchen, woraufhin es erneut zu einer Reduktion der Populationsgröße kommt (Abb. 1.1 B). Demnach sollten Arten, in denen lebensfähige diploide Männchen auftreten, eher vom Aussterben bedroht sein als solche, in denen diploide Männchen während ihrer Entwicklung absterben. Allerdings hängt die Aussterbewahrscheinlichkeit nicht allein von der Populationsgröße und dem Grad der genetischen Diversität ab. Tatsächlich ist ein DMV nur unter speziellen demographischen und landschaftsspezifischen Konstellationen, z.B. der totalen Isolation einer Population mit sl-CSD und lebensfähigen diploiden Männchen, zu erwarten (Hein *et al.*, 2009).

In Populationen, bei denen Inzucht sehr wahrscheinlich ist, sollte gegen genetisch zu ähnliche Partner diskriminiert werden. Je nach Art und Lebensweise können dafür unterschiedliche

Mechanismen zur Erkennung von Verwandten zum Tragen kommen. So nutzen soziale Arten die von Gruppenmitgliedern gelernten Merkmale, z.B. Gesichtsmuster, zur Wiedererkennung bekannter Individuen (Chittka & Dyer, 2012) oder zum phänotypischen Abgleich mit bisher unbekannten Artgenossen (Breed, 1998, van Zweden *et al.*, 2009). Nicht sozial lebende Arten können mit diesen Mechanismen nur bedingt etwas anfangen. Handelt es sich um gregäre Arten, d.h. Weibchen legen mehrere Eier an denselben Ort (Godfray, 1994), besteht die Möglichkeit Brutgefährten anhand des gemeinsamen Nest- oder Wirtsgeruchs zu erkennen (Ode *et al.*, 1995, Val-Laillet & Nowak, 2008). Solitäre Arten, die an jedem Ort nur ein einzelnes Ei platzieren (Godfray, 1994), können nahe Verwandte und Geschwister höchstens durch den Vergleich mit ihren eigenen Merkmalen erkennen (Metzger *et al.*, 2010, Flores-Prado & Niemeyer, 2010). Weitaus erstaunlicher ist die bei *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) beschriebene Fähigkeit zu erkennen, ob Artgenossen für ein bestimmtes Gen das gleiche Allele wie sie selbst tragen und das Verhalten ihrem Gegenüber dementsprechend anzupassen (Keller & Ross, 1998).

1.2 Charakterisierung der behandelten Organismen

1.2.1 Schmetterlinge

Ostrinia nubilalis

Abb. 1.2: *Ostrinia nubilalis* Falter und Eier auf einem Maisblatt. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 1 cm. ® AMW Nützlinge GmbH

Beim Maiszünsler *Ostrinia* (*Pyrausta*) *nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae) (Abb. 1.2) handelt es sich um eine nachtaktive Zünslerart (Skopik & Takeda, 1980), die sich neben einer Reihe von Pflanzen vornehmlich von Mais ernährt (Poos, 1927). *O. nubilalis* ist in Süd- und Mitteleuropa, Nordafrika sowie Klein- und Westasien verbreitet (Eidmann, 1926). Zudem kam es zu Beginn des 20. Jahrhunderts im Osten der USA mehrfach zur Einschleppung von befallenem Besenmais (Eidmann, 1926), so dass *O. nubilalis* heute auch in Nordamerika weit verbreitet ist (Qureshi *et al.*, 2005, Davidson *et al.*, 2007, Anderson *et al.*, 2003). Abhängig vom Klima sind im Sommer ein bis drei, sich zum Teil überlappende, Generationen des Maiszünslers anzutreffen (Eidmann, 1926, Pölitz *et al.*, 2007, Velasco *et al.*, 2007).

Während des Falterfluges kommt es zur Verpaarung und die Weibchen fangen 4 Tage später mit der Eiablage an (Eidmann, 1926). Die Eier werden als kompakte Gelege, bestehend aus 17-35 Eiern, an die Blattunterseite der Wirtspflanze gelegt, wobei ein einzelnes Weibchen bis zu 500 Eier haben kann (Eidmann, 1926). Die Larven schlüpfen nach 7-10 Tagen und fressen sich ins Innere der Pflanze (Eidmann, 1926). Im Laufe der 30-50 tägigen Larvalentwicklung, die aus fünf Larvenstadien besteht, höhlt *O. nublilalis* Stängel und Kolben der Maispflanze aus (Eidmann, 1926). Wird das letzte Larvenstadium erst im späten Herbst erreicht, so stellt die Zünslerlarve die Fraßtätigkeit ein und begibt sich zur Überwinterung in den bodennahen Teil der ausgehöhlten Pflanze (Eidmann, 1926). Bevor es im späten Frühjahr oder im Hochsommer zur Verpuppung kommt, wird ein Ausflugsloch in den Maisstängel gefressen und mit einem Gespinst verschlossen (Eidmann, 1926). Die Falter schlüpfen 12-18 Tage nach Verpuppung und mit dem darauf folgenden Falterflug beginnt der Lebenszyklus von Vorne (Eidmann, 1926).

Ephestia kuehniella

Abb. 1.3: *Ephestia kuehniella* Falter. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 2 mm.

Bei der Mehlmotte *Ephestia (Anagasta) kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) (Abb. 1.3) handelt es sich im einen nachtaktiven Vorratsschädling (Fölsch, 1926), der bis auf die Tropen weltweit anzutreffen ist (Burkhardt, 1920, Fölsch, 1926). Dass die Weibchen vor der Eiablage keine Nahrung zu sich nehmen müssen, trägt zum Erfolg dieses Schädlings in Lagerhallen und Mühlen bei (Calvert & Corbet, 1973). Über das Jahr verteilt können bis zu vier Mehlmotten-generationen auftreten, wobei vor allem im Sommer hohe Dichten der Mehlmotte anzutreffen sind (Burkhardt, 1920).

Frisch geschlüpfte *E. kuehniella* Weibchen investieren zunächst in die Reifung von bis zu 300 Eiern und in die Synthese eines Sexualpheromons (Calvert & Corbet, 1973). In der folgenden Nacht sind die Weibchen paarungsbereit und locken Männchen an, indem sie ihr Abdomen zwischen den Flügeln nach oben strecken und ihr Sexualpheromon verströmen (Dickins, 1936). Die Männchen folgen dieser Duftspur und kopulieren vor Ort mit dem jeweiligen Weibchen (Traynier & Wright, 1972). Während der folgenden Woche werden befruchteter Eier auf Getreide und Getreideprodukten abgelegt (Burkhardt, 1920). Kurz nachdem der Eivorrat aufgebraucht wurde, im Alter von 6-10 Tagen, verstirbt das Weibchen (Burkhardt, 1920).

Die Mehlmotte durchläuft sechs Larvenstadien, während denen sich die Tiere durch das Nährsubstrat fressen und vor Licht fliehen (Burkhardt, 1920). Dabei stabilisieren die Larven ihre Fraßgänge mit einem Seidenfaden und bauen das Nährsubstrat auch in ihre Wohnhöhlen mit ein (Burkhardt, 1920). Erst kurz vor der Verpuppung kommen die Larven an die Oberfläche, oder verlassen das Nährsubstrat sogar ganz, und spinnen sich an einem geschützten Ort in einen Seidenkokon ein (Burkhardt, 1920). Nach einer Weile schlüpfen die Falter und der Lebenszyklus beginnt von vorne.

1.2.2 Parasitoide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Brackwespenarten (Hymenoptera: Braconidae) verwendet, *Bracon brevicornis* Wesmael (Abb. 1.4) und *Bracon hebetor* Say (Details siehe unten). Obwohl beiden Arten sl-CSD haben, können sich diploide *B. brevicornis* Männchen zu Adulten entwickeln (Speicher & Speicher, 1940), während sie bei *B. hebetor* bereits während der Larvalentwicklung sterben (Whiting, 1943, Antolin *et al.*, 2003). Dieser Unterschied macht die beiden nah verwandten Arten besonders attraktiv, um die Auswirkungen von Inzucht auf

Abb. 1.4: *Bracon brevicornis* Weibchen beim parasitieren einer *Ephestia kuehniella* Larve. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 1 mm. ® Linek

geringfügig unterschiedliche Populationen zu vergleichen. Jedoch handelt es sich hierbei um morphologisch schwer voneinander zu unterscheidende Arten (van Achterberg, Naturalis Biodiversity Center, Leiden, NL, pers. Mitteilung), die bereits in der früheren Literatur (Speicher & Speicher, 1940) durch eine Verwechslung teilweise falsch benannt wurden. Um eine Falschbenennung in dieser Arbeit vermeiden zu können wurden einige Individuen der verwendeten Laborstämme unter anderem von K. van Achterberg (Naturalis Biodiversiy Center, Leiden, NL) vor Versuchsbeginn neu bzw. nachbestimmt (siehe unten).

Bracon brevicornis

Abb. 1.5: Verbreitungsgebiet von *Bracon brevicornis* Wesmael.

Die ursprünglich aus dem Mittelmeerraum stammende Brackwespe *Bracon (Habrobracon) brevicornis* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae), eine eurytherme Art, hat ihr Verbreitungsgebiet mittlerweile bis nach Mitteleuropa, Nordafrika und die indische Westküste erweitert (Temerak, 1983a, Elzinga *et al.*, 2007, Venkatesan *et al.*, 2009; Abb 1.5). Dabei können die Weibchen eine Vielzahl von Lepidoptera-Arten als Wirte verwenden, wobei sich die Larven des Maiszünslers *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae) besonders gut als Wirte eignen (Kares *et al.*, 2009, Temerak, 1984). Als idiobionte Parasitoide lähmen *B. brevicornis* Weibchen die Wirtslarven durch das Injizieren eines Nervengiftes und hindern diese dadurch an deren weiterer Entwicklung (Temerak, 1983b, Strand & Casas, 2007). Bei dieser Art handelt es sich um einen gregären Ektoparasitoiden, d.h. mehrere Eier werden außen an den Wirt gelegt (Godfray, 1994). Abhängig von der Wirtsgröße legt diese Brackwespenart zwischen einigen wenigen und bis zu 40 Eier an einen einzigen Wirt ab. Dabei stechen die Weibchen oftmals kleine Löcher in den Wirt und trinken die austretende Hämolymphe (*host feeding*), um ihren Energie- und Flüssigkeitsbedarf zu decken (Genieys, 1925, Buttelmann, 2009). Ob sich Parasitoide zu Adulten entwickeln oder bereits während der Entwicklung sterben, hängt jedoch stark von der Qualität der Wirte ab (Godfray, 1994). Kann eine Mindestgröße durch zu geringe Nahrungsressourcen,

z.B. bei sehr kleinen Wirten oder einer sehr hohen zwischenartlichen Konkurrenz verschiedener Parasiotidenlarven, nicht oder nur ganz knapp erreicht werden, so ist die Überlebenswahrscheinlichkeit eines Individuums recht gering (Hardy *et al.*, 1992, Taylor, 1988).

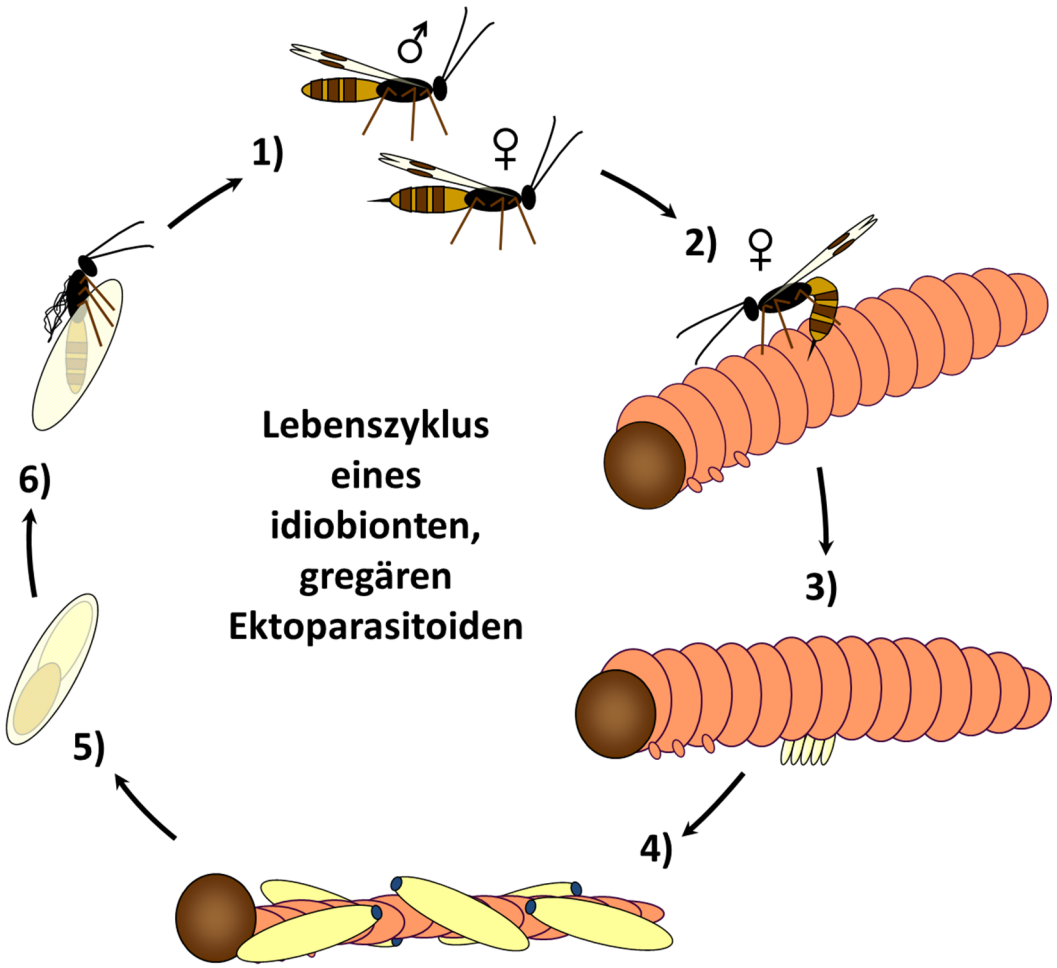

Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Bracon brevicornis*. 1) Die Adulten verpaaren sich. 2) Das Weibchen macht sich auf die Suche nach einem Wirt und paralysiert diesen (idiobiont). 3) An den Wirt (Ektoparasitoid) werden mehrere Eier (gregär) gelegt. 4) Die Larven entwickeln sich und saugen den Wirt dabei aus. 5) Sobald die Parasitoidenlarven groß genug sind, verpuppen sie sich. 6) Nach einer bestimmten Zeit schlüpft je eine neue Imago aus einer Puppe. (verändert nach Weeda, 2008)

Kurz nach der Eiablage schlüpfen die Parasitoiden-Larven und saugen den Wirt aus (Abb. 1.6). Haben die Larven eine bestimmte Größe erreicht so verpuppen sie sich und nach einer Weile schlüpft aus jeder Puppe eine neue Wespe. Da es sich bei *B. brevicornis* um eine Art handelt, die sich sexuell reproduziert, macht sich die Imago anschließend auf die Suche nach einem Paarungspartner und/oder Wirten. Was genau frisch geschlüpfte *B. brevicornis* Wespen machen wird in Kapitel 5 näher betrachtet. Das Paarungsverhalten der Männchen, das aus Annäherungs- und Besteigungsversuchen sowie Balzverhalten in Form von schnellen Flügelflattereinheiten besteht (Weeda, 2008), ähnelt dem anderer Parasitoidenarten (z.B. Field & Keller, 1993b, Joyce,

Bernal*, et al.*, 2010, Villagra *et al.*, 2011). Über das Paarungssystem dieser Art ist bisher nur bekannt, dass Weibchen zum Großteil monogam sind und die Männchen sich mehrfach verpaaren (Genieys, 1925). Generell können sowohl virgine als auch verpaarte Hymenopteren-Weibchen Eier legen, wobei unbefruchtete Eier zu Männchen werden während aus befruchteten Eiern Weibchen schlüpfen (Cook, 1993). Mit der Eiablage beginnt der Lebenszyklus von vorne.

Bracon hebetor

Die Brackwespe *Bracon (Habrobracon) hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) ist ein weltweit verbreiteter Ektoparasitoid (Bastami *et al.*, 2011, Gerling, 1969, Adashkevich & Saidova, 1987, Eliopoulos & Stathas, 2008, Gözüaçik *et al.*, 2009, Johnson *et al.*, 2000, Shoukat, 2012, Antolin *et al.*, 2003, Heimpel *et al.*, 1997), der häufig in Vorratsspeichern von Getreide, Nüssen und Früchten anzutreffen ist (Antolin *et al.*, 2003). Derzeit wird diese Art bereits in einer Vielzahl von Ländern zur Bekämpfung verschiedener vorratsschädigender Lepidoptera-Arten eingesetzt (z.B. Huang, 1986, Grieshop *et al.*, 2006, Saxena *et al.*, 2012, Adashkevich *et al.*, 1981, Brower & Press, 1990, Cline & Press, 1990). Bei dieser gregären Art handelt es sich wie bei *B. brevicornis* um einen polyphagen Parasitoiden, der eine Vielzahl von Lepidoptera-Arten nutzt (Ghimire & Phillips, 2010). Für die Wirtssuche verwendet *B. hebetor* chemische Botenstoffe, die von Wirtslarven, Insektenkot oder den adulten Faltern stammen (Darwish *et al.*, 2003, Fukushima *et al.*, 1989). Das Parasitierungsverhalten von *B. hebetor* Weibchen (Antolin *et al.*, 2003) ähnelt dem von *B. brevicornis*, wobei die Befruchtung von 70 % der *B. hebetor* Eier zu einem Weibchenüberschuss führt (Whiting, 1943, Ode *et al.*, 1997, Antolin *et al.*, 1995, Heimpel *et al.*, 1999). Auch Lebenszyklus und Entwicklungszeit von *B. hebetor* gleichen der von *B. brevicornis* (Ode *et al.*, 1995).

Innerhalb einer *B. hebetor* Population sind Geschwisterverpaarungen sehr unwahrscheinlich, zumal das Paarungssystem Auszucht in dieser Art fördert (Ode *et al.*, 1995, Antolin & Strand, 1992, Guertin *et al.*, 1996). Frisch geschlüpfte Brackwespen verlassen den Schlupfort meist virgin, aber auch zu einem späteren Zeitpunkt vermeidet *B. hebetor* die Kopulation mit Brutgefährten (Ode *et al.*, 1995). Zur Paarung sammeln sich die Männchen an leicht erhöhten Orten, an denen sich paarungswillige Weibchen einfinden (Antolin *et al.*, 2003, Antolin & Strand, 1992). Dort wählen die Weibchen einen oder mehrere Paarungspartner aus und verlassen den Ort nach erfolgter Kopulation (Antolin & Strand, 1992). *B. hebetor* Weibchen verpaaren sich meist nur einmal, während die Männchen mehrere Partnerinnen begatten (Ode *et al.*, 1997, Guertin *et al.*, 1996). Eine Mehrfachverpaarung der Weibchen erfolgt bevorzugt, wenn in der

betreffenden Population weniger als fünf verschiedene csd-Allele vorliegen (Antolin *et al.*, 2003). Eine Anpassung der Fertilisationsrate unter Inzucht ist nicht bekannt, zumal die unter diesen Umständen vermehrt auftretenden diploiden Männchen nur eine Überlebens-wahrscheinlichkeit von 0,1 haben (Whiting, 1943, Ode *et al.*, 1997). Über das Jahr verteilt unterliegt die Populationsgröße starken Fluktuationen, so dass *B. hebetor* vor allem im Spätsommer massenhaft auftritt, während im Frühling und nach Absinken der Temperaturen im Herbst nur wenige Individuen anzutreffen sind (Antolin & Strand, 1992).

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Anwendung theoretischer Vorhersagen zum Einfluss von CSD auf ingezüchtete Populationen im Labormaßstab zu testen. Hierfür wurde das oben vorgestellte Maissystem verwendet, wobei für die Zucht der Brackwespen statt des Maiszünslers die Mehlmotte verwendet wurde. In Kapitel 2 werden zunächst die generellen Methoden vorgestellt, bevor ich mich in den anschließenden Kapiteln mit folgenden Fragestellungen beschäftigt habe:

- Ist eine Inzuchtdepression bei *Bracon brevicornis*, einer Art mit lebensfähigen diploiden Männchen (Speicher & Speicher, 1940), stärker ausgeprägt als bei *Bracon hebetor*, einer Art bei der diploide Männchen zum Großteil während der Entwicklung sterben (Whiting, 1943)? Ist *B. hebetor* robuster gegenüber Inzucht als *B. brevicornis*? (Kapitel 3)
- Zeigen diploide *B. brevicornis* Männchen und triploide Weibchen derselben Art normales Paarungsverhalten und sind diese Tiere fertil? Diskriminieren haploide Männchen und diploide Weibchen gegen polyploide Paarungspartner? (Kapitel 4)
- Hat *B. brevicornis* Taktiken entwickelt, die die Wahrscheinlichkeit von Inzucht-verpaarungen vermindern können? (Kapitel 5)

Abschließend werden die im Laufe der Arbeit gesammelten Erkenntnisse kapitelübergreifend diskutiert (Kapitel 6) und die gesamte Arbeit zusammengefasst (Kapitel 7).

2. Generelle Methoden

2.1 Zucht und Hälterung der verwendeten Organismen

2.1.1 Wirte

In Massenzuchten ist die Wirtswahl von großer Bedeutung, da die Qualität zwischen verschiedenen Wirtsarten variieren kann und dadurch ein Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit und das Geschlechterverhältnis der gezüchteten Art möglich ist (Ghimire & Phillips, 2010, Kares *et al.*, 2009). So zeigte ein Vergleich zur Eignung verschiedener Wirtsarten für die Zucht von *Bracon brevicornis* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae), dass *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) nach *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae) am besten als Wirt besagter Brackwespenart geeignet ist (O. Zimmermann, pers. Mitteilung). Die Zucht von *O. nubilalis* ist sehr zeit- und kostenintensiv und die Etablierung einer Massenzucht dieser Art an der Universität Bremen schlug mehrfach fehl. Aus diesem Grund diente für die Massenzuchten der oben erwähnten *Bracon*-Arten *E. kuehniella* als Wirt.

Ephestia kuehniella

Abb. 2.1: *Ephestia kuehniella* Zucht-Box aus der sowohl Motten zum Ansetzen der Folgegeneration stammen als auch Larven für Versuche und die Zucht der Brackwespen entnommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 2 cm.

Die Zucht der Mehlmotte *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) erfolgte unter Langtagbedingungen (16 Std hell: 8 Std dunkel) bei 25 ± 1 °C, um das Einsetzen einer Diapause zu unterbinden (Cox *et al.*, 1981). Zum Ansetzen einer neuen Generation wurden *Ephestia*-Zuchtboxen (500 ml Verpackungsbehälter; Abb. 2.1) verwendet, deren Boden mit einer Mehl-Grieß-Mischung (1:1) und einer Prise Bierhefe bedeckt wurde. In jede *Ephestia*-Zuchtbox wurden 10-20 Falter gesetzt, wobei das Geschlechterverhältnis möglichst ausgeglichen war. Verpaarte Weibchen legten ihre Eier direkt auf das angebotene Substrat, von dem sich die schlüpfenden Larven ernährten. Mit der Zeit bauen die Larven immer mehr von dem sie umgebenden Material in ihr Gespinst ein, in dem sie sich schließlich verpuppen (Fölsch, 1926). Die Entwicklungszeit vom Ei zur Imago unterliegt starken Schwankungen, so dass eine Mottengeneration 1,5-3 Monate dauern kann. Schlüpfende Falter wurden mit einem Staubsauger aus den Ephestia-Zuchtboxen entnommen. Hierfür wurde ein Filtermechanismus

im Staubsaugerschlauch integriert, durch den die Falter in einem 75 ml Polystyrol-Röhrchen aufgefangen werden und die Luft durch einen Filter ins Staubsaugergehäuse weitergeleitet wird. Auf diese Weise sollte der Kontakt mit den Flügelschuppen von *E. kuehniella* weitestgehend vermieden werden, welche beim Einatmen allergen wirken können (Auerswald & Lopata, 2005). Anschließend wurden die Motten in eine wie oben beschriebene Ephestia-Zuchtbox überführt und im Klimaschrank inkubiert.

2.1.2 *Parasitoide*

Bracon brevicornis

Für die Zucht von *Bracon brevicornis* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae) wurden *E. kuehniella*-Larven im letzten Larvenstadium verwendet. Diese Lepidoptera-Art ist gegenüber dem natürlichen Wirt, *O. nubilalis*, einfacher und kostengünstiger zu züchten, während die Überlebenswahrscheinlichkeit des Parasitoiden, ähnlich wie bei *Trichogramma ostriniae* Pang et Chen (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Hoffmann *et al.*, 2001), recht hoch bleibt (O. Zimmermann, pers. Mitteilung). Jedoch führte die Verwendung von *E. kuehniella* zu einer hohen Grundmoratalität der Braconiden, d.h. auch bei kleinen Gelegen überleben im Schnitt nur die Hälfte der Individuen (Buttelmann, 2009).

Die in dieser Arbeit verwendeten *B. brevicornis* Stämme wurden von H. Schnee (Sächsische Landesanstalt für Umwelt und Landwirtschaft, Dresden) in den Sommermonaten der Jahre 2006 (BB1) und 2008 (BB2) aus *O. nubilalis* Larven im Leipziger Raum isoliert. Nach deren Bestimmung durch K. van Achterberg (Naturalis Biodiversity Center, Leiden, NL), M. Schöller und S. Prozell (Julius Kühn-Institut, Darmstadt) wurden die Tiere an die Firma AMW Nützlinge GmbH, Pfungstadt, übergeben und dort in Massenzuchten gehalten. Kurz vor Versuchsbeginn wurde der seit Oktober 2007 an der Universität Bremen gehaltene BB1-Stamm noch einmal mit BB1-Tieren besagter Firma aufgefrischt und zusätzlich ein BB2-Stamm an der Universität Bremen etabliert.

Die Zucht ist für BB1 und BB2 identisch und wird an dieser Stelle exemplarisch beschrieben. Der jeweilige Stamm wurde in eine *Bracon*-Zuchtbox (20x18x18 cm großer Käfig, Abb. 2.2) mit Wasser und Honig *ad libitum* gehalten. Die Zucht erfolgte in einem Klimaschrank bei

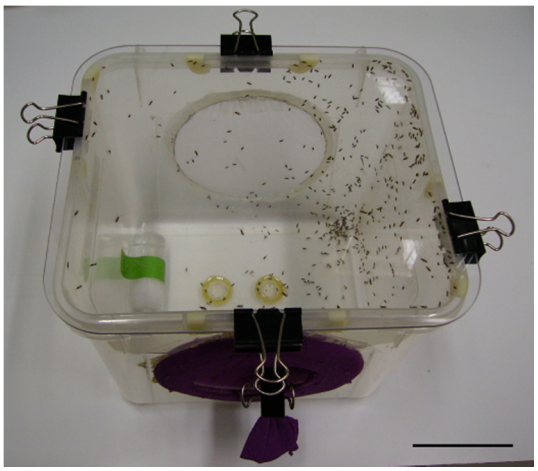

Abb. 2.2: Zucht-Box für Brackwespen, in der Wasser und Honig *ad libitum* angeboten wird. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 5 cm.

24,5 ± 0,5 °C und unter Langtagbedingungen (16 Std hell: 8 Std dunkel). Unter Laborbedingungen können Wespen beiderlei Geschlechts einen Monat alt werden, wenn sie Zugang zu Futter und Wasser haben (siehe Kapitel 3).

Alle zwei Tage wurden neue Wespen-Generationen (Ansätze) erstellt. Dafür wurden für jeden Ansatz je 40 *E. kuehniella*-Larven im letzten Larvenstadium aus der Mehlmotten-zucht entnommen, mit einer Federstahlpinzette von Mediumresten befreit, in eine Dose (200 ml Verpackungsbehälter) gesetzt und 10 Weibchen aus der Bracon-Zuchtbox hinzugesetzt. Der letzte Schritt erfolgte mittels eines Exhaustors, einem Schlauchstück an dessem Ende ein Mundstück und ein durch eine Gaze abgetrenntes Glasröhrchen angebracht war. Durch Ansaugen konnten die Wespen im Glasröhrchen von einem Behälter in den nächsten überführt werden, ohne dass diese verletzt wurden. Nach 48 Std im Klimaschrank wurden die Weibchen aus den Zucht-Ansätzen entfernt und in eine „benutzte Weibchen"-Box, ähnlich der *Bracon*-Zuchtbox, überführt. Dass jedes Weibchen auf diese Weise nur einmal die Gelegenheit zur Parasitierung von Wirten erhielt, sollte einer Reduktion der genetischen Vielfalt in der Zucht entgegenwirken.

Die Lähmung der parasitierten Wirtslarven wurde mit einem feinen Pinsel (000) überprüft, mobile Wirtslarven aus den Ansätzen entfernt und die Gelege anschließend im Klimaschrank inkubiert. Schlüpfende Wespen wurden entweder für Versuche verwendet (siehe unten) oder, nach dem Ansetzen einer neuen Generation, in die *Bracon*-Zuchtbox überführt. Da *B. brevicornis* Weibchen innerhalb der ersten 48 Std nach dem Schlupf nicht paarungswillig sind (Kapitel 5.2), sollte auf diese Weise die Verwendung verpaarter Weibchen gewährleistet werden.

Bracon hebetor

Auch die in dieser Arbeit verwendeten *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) Stämme wurden von Experten bestimmt und zunächst von der Firma AMW Nützlinge GmbH, Pfungstadt, in Zucht genommen. Dabei wurden zwei Stämme in der Nähe von Kairo, Ägypten, gesammelt und aus befallenen *Sesamia spec.* Larven (Lepidoptera: Pyralidae) in Mais (BH1) bzw. *E. kuehniella* Larven in Datteln (BH2) isoliert. Der dritte Stamm (BH3) stammt aus befallenen

E. kuehniella Larven, die in einem Weizensilo in Pfungstadt gefunden wurden. Im September 2009 wurden von allen drei Stämmen je 50-100 Weibchen an die Universität Bremen geholt und daraus Zuchten aufgebaut. Hierbei wurde die für *B. brevicornis* beschriebene Zuchtmethode verwendet. Für Massenzuchten eignen sich vor allem Zünslerlarven (Lepidoptera: Pyralidae), oftmals *E. kuehniella*, auf denen sich *B. hebetor* besonders gut entwickelt (Ghimire & Phillips, 2010). Darauf basierend dienten für die Zucht der drei *B. hebetor* Stämme *E. kuehniella* Larven als Wirte.

2.2 Datenaufnahme und statistische Auswertung

2.2.1 Anmerkungen zur Durchführung der Versuche

Sofern nicht anders beschrieben wurden die Versuchstiere kurz nach dem Schlupf aus der *Bracon*-Zucht isoliert und je nach Versuchsreihe entweder direkt verwendet oder zunächst für eine bestimmte Zeit separat gehalten. Zur Inkubation dienten Röhrchen (30 ml Polystyrol-Röhrchen), deren Boden 1 cm hoch mit 1,6 %igem Agar (8 g Agar-Agar, 500 ml Bremer Leitungswasser, 5 ml 10%ige Nipagin/Ethanol-Stammlösung) ausgegossen war. Jedes Röhrchen wurde mit einem luftdurchlässigen Schaumstoffstopfen verschlossen, auf dessen Innenseite ein Tropfen Honig angebracht war. In den meisten Fällen erfolgte die Inkubation unter Zuchtbedingungen. Ausnahmen sind an der entsprechenden Stelle gekennzeichnet.

In einigen Versuchsreihen wurden die Nachkommen der Versuchstiere benötigt. Das Ansetzen virginer oder verpaarter Einzelweibchen erfolgte in 15 ml Schnappdeckeldöschen, die ein oder zwei *E. kuehniella*-Larven im letzten Larvenstadium enthielten. Für die Parasitierung der Wirte hatten jede Wespe 24 Std Zeit. Anschließend wurden die Weibchen entfernt und entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll weiterverwendet. In den Döschen wurden die Wirte kontrolliert und die Gelegegröße(n) bestimmt. Befanden sich mehrere Wirtslarven, von denen nur eine paralysiert war, im gleichen Gefäß, so wurde das mobile Tier entfernt und eingefroren. Auf diese Weise sollte der Verzehr der Wespeneier bzw. das Verschieben der gelähmten Wirtslarve durch die gesunde vermieden werden. Die Gelege wurden unter Zuchtbedingungen ausgebrütet und je nach Versuchsprotokoll zwischendurch die Anzahl der Parasitoiden-Puppen bestimmt.

Das Zählen der Eier/Puppen gestaltete sich teilweise schwierig, so dass teilweise mehr Puppen/Nachkommen gezählt wurden als Eier/Puppen. Das heißt, während der Datenaufnahme mussten Eier/Puppen übersehen worden sein. Die Anzahl der Eier/Puppen wurde dementsprechend korrigiert.

Verhaltensbeobachtungen

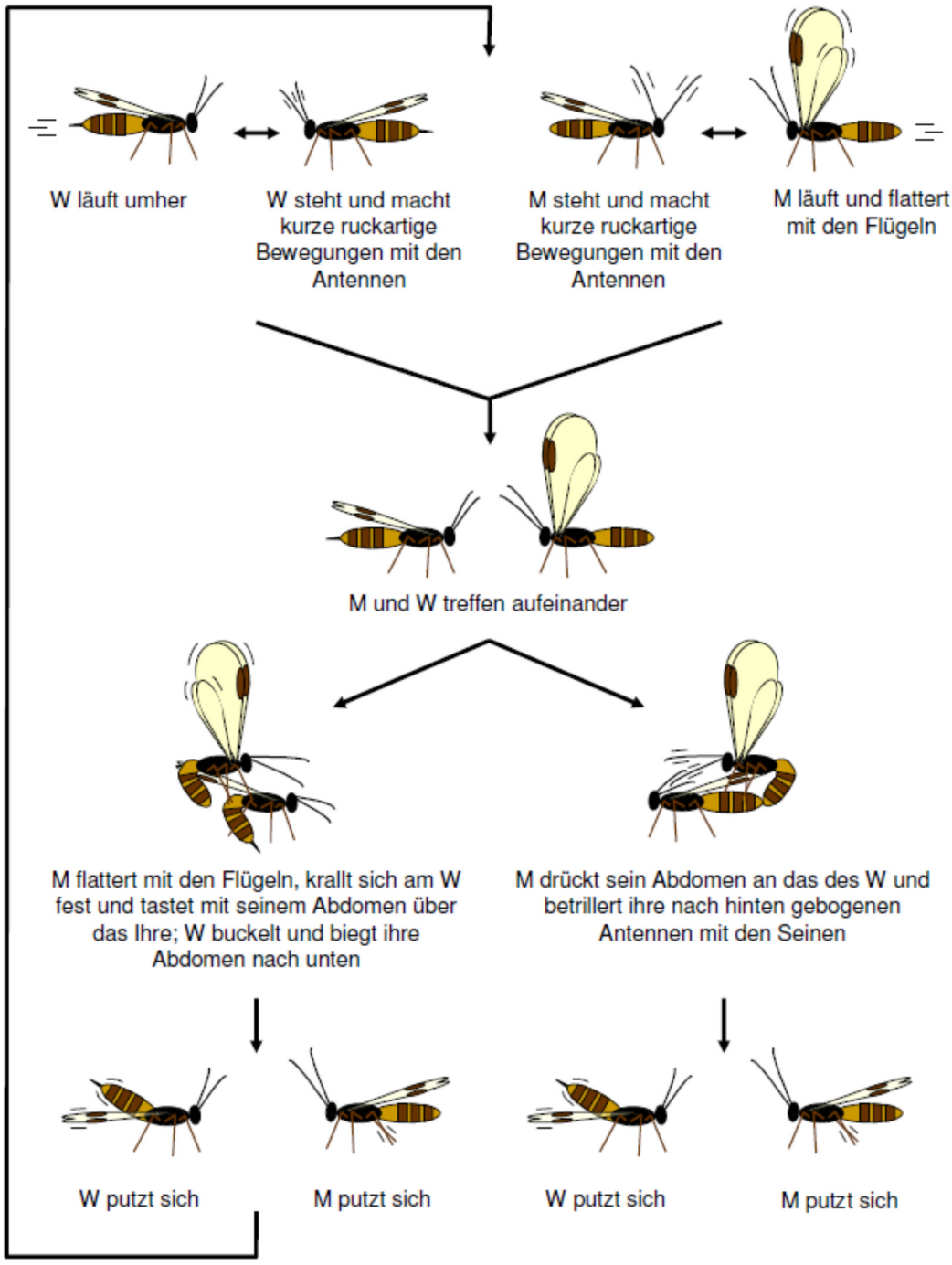

Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Paarungsverhaltens (Ethogramm) von *Bracon brevicornis* (M: Männchen, W: Weibchen) (aus Weeda, 2008)

In mehreren Versuchsteilen wurde das Paarungsverhalten von *B. brevicornis* beobachtet. Solange beide Geschlechter noch nicht direkt aufeinander getroffen sind, wechseln sowohl die Männchen als auch die Weibchen ab zwischen laufen, stehen, meist verbunden mit kurz zuckenden Antennen, und sich putzen (Abb. 2.3). Wird das Männchen auf eine potentielle Partnerin aufmerksam, so beginnt es mit dem Balzen in Form schneller Flügelflattereinheiten.

Kommen beide Partner in direkten Kontakt, so versucht das Männchen das Weibchen zu besteigen. Nun hat das Weibchen die Wahl seinen Partner zu akzeptieren, woraufhin es zur Kopulation kommt, oder diesen zurückzuweisen. Für Letzteres kann das Weibchen a) weglaufen sobald das Männchen einen Besteigungsversuch startet, b) nach dem Männchen treten und versuchen dieses durch buckeln abzuwerfen und wegzulaufen oder c) sein Abdomen unter sich krümmen und versuchen wegzulaufen. Für diese Arbeit waren vor allem die Besteigungsversuche, das Balzverhalten in Form schneller Flügelflattereinheiten und das Zurückweisen des Männchens bzw. die Kopulation von Bedeutung. Diese und einige zusätzliche Verhaltensweisen wurden mit der Software *The Observer*® (Noldus, Wageningen) aufgezeichnet. Dabei sind einige Verhaltensweisen geschlechtsspezifisch und werden ausschließlich von Männchen bzw. Weibchen ausgeführt (Tab. 2.1). Von beiden Geschlechtern gleichermaßen verwendete Verhaltensweisen wurden für das jeweilige Fokustier aufgenommen.

Tab. 2.1: Während Verhaltensbeobachtungen zum Paarungsverhalten von *Bracon brevicornis* aufgezeichnete Verhaltensweisen

Verhalten	Beschreibung
Besteigen[M]	das Männchen klettert auf das Weibchen und versucht dieses zu begatten
Flügelflattern[M]	das Männchen flattert mit den Flügeln und steht oder läuft dabei zwischen einem Schritt und 5 cm
Kopulation	die Genitalbereiche beider Wespen berühren sich für mindestens 5 s
Laufen	laufen
Putzen	putzen
Stehen	stehen
Zurückweisen[W]	das Weibchen läuft weg, sobald das Männchen versucht es zu besteigen oder das Weibchen tritt nach dem Männchen und versucht es durch buckeln abzuwerfen und wegzulaufen oder das Weibchen krümmt sein Abdomen unter sich und versucht wegzulaufen

[M] ausschließlich von Männchen ausgeführte Verhaltensweise
[W] ausschließlich von Weibchen ausgeführte Verhaltensweise

Sofern nicht anders beschrieben, wurden für Versuche zum Paarungsverhalten nicht direkt miteinander verwandte Wespen vom Stamm BB1 verwendet. Über die Spermatogenese bei *B. brevicornis* ist bisher noch nichts bekannt. Die Samenbläschen der nahverwandte Art *B. hebetor* sind bereits direkt nach dem Schlupf mit Spermien gefüllt (Gerling & Rotary, 1973). Um sicher zu stellen, dass die verwendeten Männchen reife Spermien besaßen und paarungswillig waren, wurden mindestens 24 Std alte virgine Männchen benutzt. Nachdem für die Weibchen von einer 48 Std langen Paarungslatenz wahrscheinlich ist (Weeda, 2008), wurden virgine Weibchen im Alter von 48-72 Std verwendet. Jedes Pärchen wurde in einer frischen Petrischale (ø = 3,5 cm) getestet, die mit einer, zuvor gereinigten, Glasplatte abgedeckt war.

Mittels eines Exhaustors wurde der Paarungspartner hierfür immer vor dem Fokustier eingesetzt. Die Beobachtung startete, sobald das Fokustier die Petrischale von selbst betreten hatte und endete entweder nach 10 min oder nach erfolgter Kopulation.

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Kopulation erhielten verpaarte Weibchen 24 Std lang die Gelegenheit zwei Wirte zu parasitieren. Anschließend wurden die Gelege unter Zuchtbedingungen inkubiert und das Geschlecht des Nachwuchses bestimmt. Schlüpften Töchter, so konnte davon ausgegangen werden, dass bei der Kopulation Sperma übertragen und zur Befruchtung der Eier genutzt wurde.

Beobachtungen, in denen kein direkter Kontakt zwischen den Wespen erfolgte und kein Balzverhalten gezeigt wurde oder die Aufzeichnungen der Beobachtung fehlten, wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen.

Durchflusszytometrie

Mehrere Kapitel dieser Arbeit drehen sich um die Bestimmung des Ploidiegrades einzelner Wespen. Mittels Durchflusszytometrie lassen sich einzelne Zellen bzw. Zellkerne auf bestimmte Inhalte hin überprüfen. Dabei werden Zellen mit einem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff angefärbte und das davon abgestrahlte Licht bzw. die Lichtintensität zur Bestimmung der Desoxyribonukleinsäure-Menge in einer Zelle benutzt (Beckman Coulter Inc, 2003). Je intensiver das abgestrahlte Licht ist, desto höher ist der DNS-Gehalt im Zellkern (Beckman Coulter Inc, 2003).

In dieser Arbeit wurde Propidiumiodid (PI), ein spezifisch an DNS bindender Fluoreszenz-farbstoff, verwendet (Krishan, 1975). Die Bindung dieses Farbstoffes an Nukleinsäure verschiebt das Exitationsmaximum der PI-Fluoreszenz um 30-40 nm nach rechts und liegt dadurch bei 617 nm (Arndt-Jovin & Jovin, 1989). Die Analysen erfolgten mit einer Exitationswellenlänge von 488 nm und dem FL2-Bandfilter mit 580 nm (Beckman Coulter Inc, 2003). Bei Problemen mit den ausgegebenen Histogrammen kam teilweise auch die Verwendung des FL3-Bandfilters mit 670 nm zum Einsatz, durch den noch ein Teil der PI-Fluoreszenz gemessen werden kann (Rothe, 2007). Hierdurch konnte in einigen Fällen ein deutlicheres Histogramm erhalten werden, dass zur Zuordnung des Ploidiegrades verhalf. Die alternative Verwendung des FL3-Filters ist an den entsprechenden Stellen erwähnt.

Hymenopteren-Männchen haben in den meisten Körperteilen, vor allem in Muskelzellen, einen höheren Ploidiegrad als im Kopf (Aron *et al.*, 2005). Darauf basierend diente nur die Kopfkapsel der einzelnen Versuchstiere zur Bestimmung des Ploidiegrades. Auf die Präparation der Wespen wird in den entsprechenden Kapiteln näher eingegangen. Für jede Probe wurden Nuclei in einer

FSlog/FL2-log definierten Region, die haploide, diploide und tetraploide Zellen enthielt, analysiert. Mittels eines Schwellenwertes am FL2-Bandfilter konnten zu kleine Zelltrümmer (debris) von der Messung ausgeschlossen werden. Ein an den Durchflusszytometer angeschlossener Computer zeigte die Ergebnisse durch die Software *CellQuest* (Beckton Dickinson Biosciences) unter anderem als Histogramme an, mit dessen Hilfe der Ploidiegrad eines Tieres bestimmt wurde (Abb. 2.4). Die Anwesenheit eines haploiden Peaks (N) indizierte ein haploides Männchen. Fehlte dieser und es war nur ein diploider Peak (2N) vorhanden so handelte es sich um ein diploides Tier.

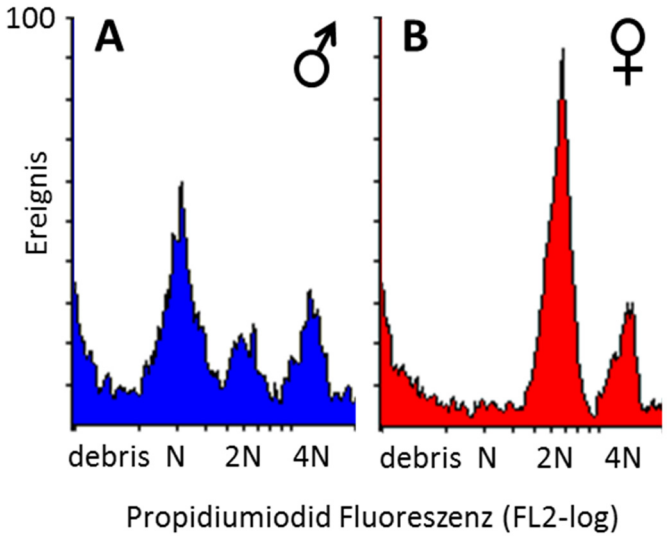

Abb. 2.4: Von einem Durchflusszytometer ausgegebene DNA-Histogramme für *B. brevicornis*: (A) Ein repräsentatives haploides Männchen und (B) ein diploides Weibchen. In beiden Histogrammen sind auch kleine Peaks polyploider Zellen zu sehen, z.B. diploide und tetraploide Zellen im Histogramm des haploiden Männchens (A).

2.2.2 Statistische Auswertung der Daten

Die Auswertung meiner Daten erfolgte mittels verschiedener statistischer Methoden, die an dieser Stelle nacheinander vorgestellt werden. Sofern nicht anders beschrieben wurde das Statistikprogramm R 2.13.1 (R Development Core Team, 2011) verwendet. Die jeweils verwendeten Software-Pakete werden in den Versuchskapiteln separat aufgeführt.

Für die statistische Auswertung wurden generalisierte lineare Modelle (GLMs; Nelder & Wedderburn, 1972) verwendet, mit denen auch Daten analysiert werden können, deren Residuen keiner Normalverteilung unterliegen. Diese Modelle können individuell an die eigenen Daten angepasst werden, da ein linearer Zusammenhang zwischen den abhängigen und den unabhängigen Variablen nicht vorausgesetzt wird (Hoffmeister *et al.*, 2006). Für binäre und

prozentuale Daten wurde eine binomiale bzw. quasibinomiale Verteilung verwendet und mit einer logit Linkfunktion ausgewertet, Poisson verteilte Zähldaten mit einer log Linkfunktion und Gamma verteilte Zeitdaten mit einer reziproken Linkfunktion.

Für die Auswertung musste zusätzlich berücksichtigt werden, ob es sich bei den erhobenen Messwerten um voneinander abhängige Daten handelte. War dies der Fall, z.B. durch das mehrfache Beproben der gleichen Linie, so kamen je nach Verteilung der Residuen lineare gemischte Modelle *(linear mixed model*: LMM) oder generalisierte lineare gemischte Modelle (*generalized linear mixed model*: GLMM) zum Einsatz. In diesem Fall wurde beispielsweise die Variable Linie als Zufallsvariable (*random variable*) verwendet, wodurch mehrfach erhobene Parameter der gleichen Linie miteinander korreliert wurden und Pseudoreplikate vermieden werden konnten (Zuur *et al.*, 2009). Variablen, die einen Effekt auf die zu erklärende Variable hatten, aber nicht im Fokus der Analyse standen, z.B. der Beobachter, kamen ebenfalls als Zufallsvariable ins entsprechende Modell. Auf diese Weise konnte der Effekt besagter Variable bei der Berechnung der Signifikanzen für die erklärenden Variablen mit berücksichtigt werden ohne zusätzliche Freiheitsgrade zu verbrauchen (Zuur *et al.*, 2009).

Bei allen Analysen setzte sich das jeweilige Ausgangsmodell aus Termen erster und teilweise auch zweiter Ordnung zusammen. Die Vereinfachung komplexer Modelle erfolgte durch die Eliminierung von Interaktionen und erklärenden Variablen, wenn diese Parameter nicht signifikant waren. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde das dadurch erhaltene minimal adäquate Modell verwendet. Die Grafiken wurden mit der Software *SigmaPlot 11.0* (Systat Software Inc., Erkrath) erstellt.

Cox-Regression

Da die Verhaltensbeobachtungen in Kapitel 4 und 5 nach einer bestimmten Zeit beendet wurden, kam es bei diesen Versuchen vermehrt zu zensierten Daten, d.h. ob ein bestimmtes Verhalten zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt wäre, kann nicht gesagt werden. Um solche Daten dennoch auswerten zu können, wurde ein *cox proportional hazard model* verwendet (Cox, 1972). Diese ursprünglich in der Medizin zur Erstellung von Überlebenskurven verwendete Methode basiert auf einer multiplen Regressionsanalyse, weshalb sie auch als Cox-Regression bezeichnet wird (Cox, 1972). Hierbei wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass ein Ereignis nach einer bestimmten Zeit eintritt (Cox, 1972). Durch die Integration verschiedener erklärender Parameter ins Modell, kann durch die Cox-Regression zudem ermittelt werden, ob bestimmte Faktoren mit der Zeit bis zum Auftreten des Ereignisses korrelieren (Cox, 1972).

Kaplan-Meier-Regression

Bei der Kaplan-Meier-Regression handelt es sich, ähnlich wie bei der Cox-Regression, um eine Überlebensanalyse (Kaplan & Meier, 1958). Diese Methode verwendet jedoch Zeitintervalle und keinen kontinuierlichen Zeitverlauf (Kaplan & Meier, 1958). Damit eignet sich die Kaplan-Meier-Regression hervorragend für die Analyse der in Kapitel 3 untersuchten Auswirkungen von Inzucht über vier Generationen. Hierbei wird die Wahrscheinlichkeit ermittelt, dass ein Ereignis zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht erfolgt (Kaplan & Meier, 1958), wobei die erklärenden Variablen hierbei als kategorische Kovariate in das Model einfließen. Zudem kann diese Methode mit kleineren Datenmengen besser umgehen (Kaplan & Meier, 1958).

Zero-inflated Model

In einigen Versuchsreihen enthielten die Datensätze eine große Anzahl an Nullen. In solchen Fällen muss zunächst überprüft werden, ob es sich bei diesen Datenpunkten um korrekte oder inkorrekte Nullen handelt. Zur Veranschaulichung wollen wir die Artenzusammensetzung in unterschiedlichen Habitaten betrachten. Wenn eine Art in einem Habitat nicht gefunden werden konnte, da es sich z.B. um eine seltene Art handelt oder die beprobte Art vor Ort ausgestorben ist (Martin *et al.*, 2005), spricht man von korrekten Nullen. Inkorrekte Nullen werden z.B. durch eine temporäre Abwesenheit der gesuchten Art oder einen zu kurzen Beobachtungszeitraum hervorgerufen (Tyre *et al.*, 2003), in dem eine anwesende Art nicht entdeckt wird (MacKenzie *et al.*, 2003).

Sind so viele Nullen vorhanden, dass weder eine negativ binomiale noch eine Poisson-Verteilung den Daten entspricht, so sollte ein *Zero-inflated model* (ZIM) für die Auswertung verwendet werden. Mit dieser Methode kann verhindert werden, dass die vielen Nullen den Mittelwert kleiner machen als er tatsächlich ist und Schätzwerte und Standardfehler (SE) falsch berechnet werden (Zuur *et al.*, 2009).

ZIMs werden auch als zusammen gesetzte Modelle (mixture model) bezeichnet, da für die Berechnung der Nullen zwei Modelle verwendet werden. Das Zählmodell wendet ein GLM mit einer Poisson oder negativ binomialen Verteilung an (Zuur *et al.*, 2009) und nimmt an, dass korrekte Nullen vorliegen. Der logistische Modellteil unterscheidet auf Grund der Verteilung zwischen korrekten und inkorrekten Nullen, deren Wahrscheinlichkeit mit einem binomialen GLM berechnet werden, bei dem auch Kovariaten berücksichtig werden können (Zuur *et al.*, 2009).

3. Produktion diploider Männchen und Inzuchtdepression auf Art- und Populationsniveau

Die Keimbahn eines jeden Individuums unterliegt dem Risiko für das Auftreten negativer Mutationen. Diese können sich durch Weitergabe in Genen manifestieren und durch Inzucht angehäuft und expremiert werden (Reed & Bryant, 2001, Shabalina *et al.*, 1997). Eine daraus resultierende Inzuchtdepression ist oftmals die Folge der Expression besagter Gene und führt zu einem höheren Anteil an Individuen mit einer verringerten Fitness (Charlesworth & Willis, 2009). Die verdeckte Weitergabe selbst lethal negativer Mutation an die Nachkommen kann bei diploiden Tieren erfolgen, wenn das kodierende Gen rezessiv ist und die Allele heterozygot vorliegen (Goldstein, 1994). Bei haplodiploiden Hymenopteren, deren Weibchen aus befruchteten Eiern schlüpfen, während sich unbefruchtete Eier zu Männchen entwickeln (Cook, 1993), ist dies nur bei den diploiden Weibchen möglich. Rezessive Allele werden in haploiden Männchen immer exprimiert, so dass schädliche Allele durch diese Männchen aus einer Population verschwinden können (Goldstein, 1994), wenn der Fitnessverlust hoch genug ist. Im Vergleich zu diploiden Arten sollten haplodiploide Tiere demnach weit weniger unter Inzuchtdepression leiden (Henter, 2003).

Eine vermehrte Expression lethaler negativer Mutationen, z.B. unter Inzucht, und eine dadurch erhöhte Mortalität haploider Männchen sollte in einer Population zu einem erhöhten Weibchenanteil führen. In genetisch diversen Populationen sollte das Geschlechterverhältnis ausgeglichen sein, wenn Männchen und Weibchen für die Reproduktion von gleichem Wert sind und sich die Produktion beider Geschlechter nicht in den benötigten Ressourcen unterscheidet (Fisher, 1930). Dies zu erzielen, kann allerdings bei Arten mit CSD schwierig sein. So resultieren homozygote Eier aus Übereinstimmungsverpaarungen (matched mating; Cook & Crozier, 1995), d. h. beide Paarungspartner haben das gleiche csd-Allel, und entwickeln sich anschließend zu diploiden Männchen (Cook & Crozier, 1995, Heimpel & de Boer, 2008), wodurch das Geschlechterverhältnis zu Gunsten der Männchen verschiebt. Wie wahrscheinlich es zu solch einer Verpaarung kommt und wie weit das Geschlechterverhältnis dadurch zu den Männchen verschoben wird, hängt von

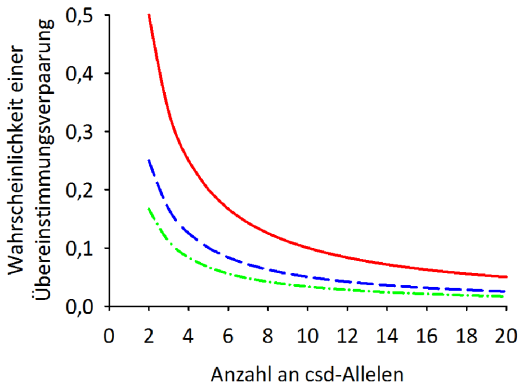

Abb. 3.1: Auftreten von Übereinstimmungsverpaarungen in Abhängigkeit der Allel-Vielfalt und des CSD-Modus (durchgezogene rote Linie: sl-CSD mit 1 Locus; gestrichelte blaue Linie: ml-CSD mit 2 Loci; strichgepunktete grüne Linie: ml-CSD mit 3 Loci) (nach Cook & Crozier, 1995)

der Anzahl an csd-Loci und der Vielfalt an csd-Allelen in einer Population ab (Cook & Crozier, 1995, Heimpel & de Boer, 2008). Liegt bei der komplementären Geschlechtsbestimmung nur ein Genlocus vor (sl-CSD), so beträgt das Risiko einer Übereinstimmungsverpaarung bei 20 verschiedenen Allelen 0,05, während es bei 5 unterschiedlichen Allelen auf 0,2 ansteigt (van Wilgenburg *et al.*, 2006; Abb. 3.1, Cook & Crozier, 1995).

Die Anzahl der in einer Population vorhandenen Allele, also die genetische Diversität, kann durch genetische Drift bei Isolation stark reduziert werden, z.B. indem der Austausch zwischen Metapopulationen durch Habitatfragmentierung oder -verlust unterbrochen wird (Saccheri *et al.*, 1998, Higgins & Lynch, 2001). Beispielsweise hängt die genetische Diversität bei der Etablierung von Massenzuchten zunächst vom verwendeten Ausgangsmaterial ab, das bei Sammlungen an verschiedenen Standorten genetisch stark zwischen unterschiedlichen Freiland-populationen variieren kann (Kneeland *et al.*, 2012). Anschließend führen genetische Drift und Inzucht zur Reduktion des vorhandenen Genpools (Charlesworth & Willis, 2009, Leberg, 1992). Bei Arten mit CSD verstärkt sich die Inzuchtproblematik im Vergleich mit solchen ohne CSD, da hier vermehrt diploide Männchen auftreten und daraufhin der *diploid male vortex* (DMV) in Gang gesetzt werden kann (Cook & Crozier, 1995, Zayed & Packer, 2005). Liegt sl-CSD vor, so zieht eine geringe Anzahl verbleibender csd-Allele eine erhöhte Produktion diploider Männchen nach sich und das Geschlechterverhältnis wird zu den Männchen verschoben (Cook & Crozier, 1995, Zayed & Packer, 2005, Hein *et al.*, 2009). Der dadurch verringerte Weibchenanteil vermindert das Populationswachstum und die Population wird noch kleiner (Zayed & Packer, 2005). Besonders für Massenzuchten ist diese doppelt belastend, da neben Problemen bei der Erhaltung der Zucht auch eine Minimierung der Anzahl verfügbarer Nützlinge auftritt, da oftmals Hymenopteren-Weibchen zur Bekämpfung von Schadinsekten verwendet werden (Austin *et al.*, 2005). Ob diploide Männchen der verwendeten Art lebensfähig sind oder nicht, kann zudem einen großen Einfluss auf das Bestehen einer Population haben. Kommt es zur Paarung mit diploiden Männchen, so sind die Weibchen, vor allem wenn diese sich nur einmal im Leben verpaaren, nach der Kopulation gezwungen nur noch haploide Söhne (Heimpel & de Boer, 2008) oder sterilen triploiden Nachwuchs (Cournault & Aron, 2009, de Boer *et al.*, 2007b) hervorzubringen. Sterben diploide Männchen noch vor dem Schlupf, so verbleiben ausschließlich haploide Männchen als Paarungspartner und zumindest ein Teil der befruchteten Eier kann sich zu diploiden Töchtern entwickeln (Hein *et al.*, 2009, Harpur *et al.*, 2012).

Bisher wurde der Einfluss diploider Männchen auf die Dynamik von Populationen, von einer Freilandstudie abgesehen (Whitehorn *et al.*, 2009), rein theoretisch bearbeitet (Hein *et al.*, 2009, Stouthamer *et al.*, 1992, Zayed & Packer, 2005). Inwiefern die erstellten Szenarien auf

Laborzuchten und Freilandpopulationen übertragbar sind, ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss diploider Braconiden-Männchen auf die Populationsdynamik zu ermitteln und die Ergebnisse mit den theoretischen Vorhersagen zu vergleichen. Hierfür wurden verschiedene Laborstämme der nah verwandten Arten *Bracon hebetor*, deren diploide Männchen zum Großteil während der Entwicklung sterben (Whiting, 1943, Antolin *et al.*, 2003), und *Bracon brevicornis*, bei der lebensfähige diploide Männchen auftreten (Speicher & Speicher, 1940), in Bezug auf das Geschlechterverhältnis und die Entwicklungsmortalität untersucht. Gegenüber genetisch diversen Stämmen sind unter Inzucht ein stärker zu den Männchen verschobenes Geschlechterverhältnis sowie eine höhere Entwicklungsmortalität zu erwarten. Zudem ist anzunehmen, dass *B. hebetor* robuster gegenüber Inzucht ist als *B. brevicornis*. Fraglich ist auch, ob sich das Risiko in den DMV einzutreten zwischen verschiedenen Populationen einer Art unterscheidet und eine Population beispielswiese inzuchtrobuster ist als eine andere. Hierfür wurden ingezüchtete und genetisch diverse Linien der fünf Brackwespen-Stämme über vier Generationen gezogen und nach innerartlichen Unterschieden in der Ausprägung von der Inzuchtdepression gesucht.

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Temperaturabhängige Lebensdauer

Für einige Versuche mussten die verwendeten Brackwespen ein bestimmtes Alter haben oder konnten erst einige Wochen nach dem Schlupf weiterverwendet werden. Dabei soll vor allem ein möglicher Einfluss einer zu weit fortgeschrittenen Seneszenz auf das Verhalten oder die Reproduktion der Versuchstiere vermieden werden. Während die temperaturabhängige Lebenserwartung von *B. hebetor* bereits untersucht wurde (Ahmed *et al.*, 1985), gab es für *B. brevicornis* bisher keine Daten. Um für die zweite Art eine Aussage über die Lebensdauer von Männchen und Weibchen bei verschiedenen Temperaturen treffen zu können, wurden Tiere des Stammes BB1 verwendet (siehe Kapitel 2.1.2). Die Versuche erfolgten unter Langtag-bedingungen (16 Std hell: 8 Std dunkel) und bei fünf verschiedenen Temperaturen, die in 5 °C-Schritten von 5-25 °C anstiegen. Für jede Temperatur wurde die Lebensdauer von 7-10 männlichen bzw. weiblichen Wespen gemessen. Hierfür wurden frisch geschlüpfte Wespen separat in je ein Röhrchen mit Futter und Agar gesetzt (siehe Kapitel 2.2.1). Einmal wöchentlich wurde jede Wespe in ein frisches Röhrchen überführt, so dass diese über den gesamten Versuchszeitraum ausreichend Futter und Wasser zur Verfügung hatten. Die Versuchstiere hatten keinen Zugang zu Wirten, um einen möglichen Effekt des Fressens am Wirt auf die Lebensdauer ausschließen zu können. Neben dem Geschlecht der Wespe und der Temperatur

wurden auf jedem Röhrchen der ermittelte Schlupf- und der Todestag notiert. Für letzteres wurden die Röhrchen mehrmals täglich kontrolliert, so dass das Ableben einzelner Tiere nach spätestens 16 Std festgestellt werden konnte. Verstorbene Tiere wurden separat in 250 µl Mikroreaktionsgefäßen eingefroren.

3.1.2 Produktion diploider Männchen

Im Gegensatz zu *B. hebetor* war von *B. brevicornis* bis zum Beginn meiner Untersuchungen nur bekannt, dass diploide Männchen vorkommen (Speicher & Speicher, 1940). In dieser Studie erfolgte für verschiedene Stämme beider Arten neben der Quantifizierung der Produktion diploider Männchen unter Inzucht auch eine Erhebung der Lebensfähigkeit diploider Männchen.

Abb. 3.2: Herkunftsorte der von mir untersuchten Parasitoidenstämme (gelber Punkt: *B. brevicornis*, rote Punkte: *B. hebetor*)

Für die Versuche wurden zwei deutsche *B. brevicornis* Stämme (BB1 und BB2) sowie zwei ägyptische (BH1 und BH2) und ein deutscher (BH3) *B. hebetor* Stamm verwendet (siehe Kapitel 2.1.2). Ihre Herkunftsorte sind in Abb. 3.2 dargestellt. Die *B. brevicornis*-Stämme gehören zur selben Ausgangspopulation, in der in unterschiedlichen Jahren Wespen isoliert und in Zucht genommen wurden. Die ägyptischen *B. hebetor* Stämme stammen von Tieren ab, die aus unterschiedlichen Wirten in verschiedenen Habitaten isoliert wurden. Ob es sich bei diesen Wespen um Nachfahren getrennter Populationen oder derselben Metapopulation handelt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden, da mir keine Daten einer vergleichenden genetischen Analyse vorliegen.

Um möglichst viele Übereinstimmungsverpaarungen zu gewährleisten, wurden für die Inzuchtbehandlung Mutter-Sohn-Verpaarungen durchgeführt. Dafür durften virgine Weibchen (Parentalgeneration) kurz nach dem Schlupf je zwei *Ephestia kuehniella* Larven im letzten Larvenstadium (Wirte) für 24 Std parasitieren. Anschließend wurden die Weibchen separat bei 10 °C und unter Langtagbedingungen (16 H : 8 D) gehalten. Das Ausbrüten der Eier erfolgte unter Zuchtbedingungen und schlüpfende haploide Söhne wurden zunächst nach Mutter und Schlupftag getrennt gehalten. Sobald aus allen Gelegen mindestens eine Wespe geschlüpft war, wurden die Muttertiere zur Akklimatisierung 24 Std lang bei 25 °C gehalten und anschließend

mit einem ihrer Söhne verpaart. Verweigerte ein Weibchen die Paarung, so erfolgte eine Zwangsverpaarung, für die das Muttertier zunächst 8 min in einem 250 µl Mikroreaktionsgefäß auf Eis gelegt wurde. Das so immobilisierte Tier wurde erneut demselben Männchen angeboten, woraufhin in den meisten Fällen unmittelbar eine Paarung erfolgte (für Details siehe Kitthawee, 2008). Schlug die Zwangsverpaarung fehl, wurde am Folgetag ein erneuter Paarungsversuch mit einem anderen Sohn durchgeführt. Verpaarte Weibchen durften sukzessive je fünf Wirte parasitieren. Die Weibchen und einige ihrer haploiden Söhne wurden schließlich als Referenztiere für genetische Analysen separat in 250 µl Mikroreaktionsgefäßen bei -20 °C eingefroren.

Als Kontrolle dienten Weibchen, die mit einem nicht direkt verwandten Männchen verpaart wurden. Nach Möglichkeit stammte der Paarungspartner dabei von einem anderen Stamm aus dem gleichen Ursprungsland. So gehörte das Männchen z.B. zum Stamm BB1 während das Weibchen vom Stamm BB2 kam. Vom Partner abgesehen wurden die Weibchen der Kontrolle genauso behandelt wie die der Inzuchtbehandlung.

Parasitierte Wirte wurden nach Bestimmung der Gelegegröße unter Zuchtbedingungen inkubiert. Die Anzahl der Puppen wurde 10 Tage nach Parasitierung der Wirte bestimmt und die Gelege anschließend dreimal täglich auf frisch geschlüpfte Wespen (F_1) untersucht. Waren Parasitoide vorhanden, so wurden diese zunächst nach Mutter, Schlupftag und Geschlecht getrennt in Röhrchen, die mit einem Schaumstoffstopfen verschlossen waren und Futter und Agar enthielten, gesetzt. Für jede Mutter wurde die kumulative Anzahl der Eier, Puppen, Söhne und Töchter notiert und aus diesen Parametern das Geschlechterverhältnis und die Entwicklungsmortalität der Nachkommen (F_1) berechnet. Frühzeitig verstorbene Tiere wurden innerhalb von 16 Std nach ihrem Ableben separat in 250 µl Mikroreaktionsgefäßen bei -20 °C eingefroren. Die verbleibenden Nachkommen wurden erst kurz vor den genetischen Analysen eingefroren, wobei einige Männchen und Weibchen zuvor noch für weitere Versuche (siehe Kapitel 3.1.3) verwendet wurden.

Um mit Sicherheit von einer Verpaarung der Weibchen ausgehen zu können, wurden für die spätere Auswertung nur Nachkommen von Weibchen verwendet, unter denen sich mindestens eine Tochter befand. Insgesamt konnten die Daten von 96 Tieren (50 %) verwendet werden, von denen jeweils zwischen 18 und 20 Individuen zum selben Stamm gehörten.

Die Bestimmung des Ploidiegrades der F_1-Männchen erfolgte mittels Durchflusszytometrie, einer Methode zur Quantifizierung der DNA-Menge einzelner Zellen. Die Präparation der gefrorenen Wespen, von denen Dr. Jetske de Boer (Evolutionary Genetics, Universität Groningen, NL) sechs Stück durchführte, und die Messungen an einem Durchflusszytometer

(Coulter Epics XL-MCL, Beckman Coulter, Miami, FL, USA) erfolgten an der Universität Groningen. Für jede Probe wurden Nuclei in einer FSlog/FL2-log definierten Region, die haploide, diploide und tetraploide Zellen enthielt, analysiert und zu kleine Zelltrümmer (debris) mittels eines Schwellenwertes am FL2-Bandfilter ausgeschlossen (für Details siehe Kapitel 2.2.1). Nach 300 s oder der Messung von 2500 Nuclei wurde die jeweilige Analyse beendet. Die Anwesenheit eines haploiden Peaks (N) indizierte ein haploides Männchen (Abb. 3.3). Fehlte dieser und es war nur ein diploider Peak (2N) vorhanden, so handelte es sich um ein diploides Tier. Für 12 Männchen ließ das Histogramm des FL2-Filters keine Aussage über dessen Ploidiegrad zu. Hier brachte die abweichende Verwendung des FL3-Filters (für Details siehe Kapitel 2.2.1) eine Klärung ihrer DNS-Menge. Als Referenztiere dienten zum einen von virginen Weibchen produzierte haploide Männchen und zum anderen diploide Weibchen.

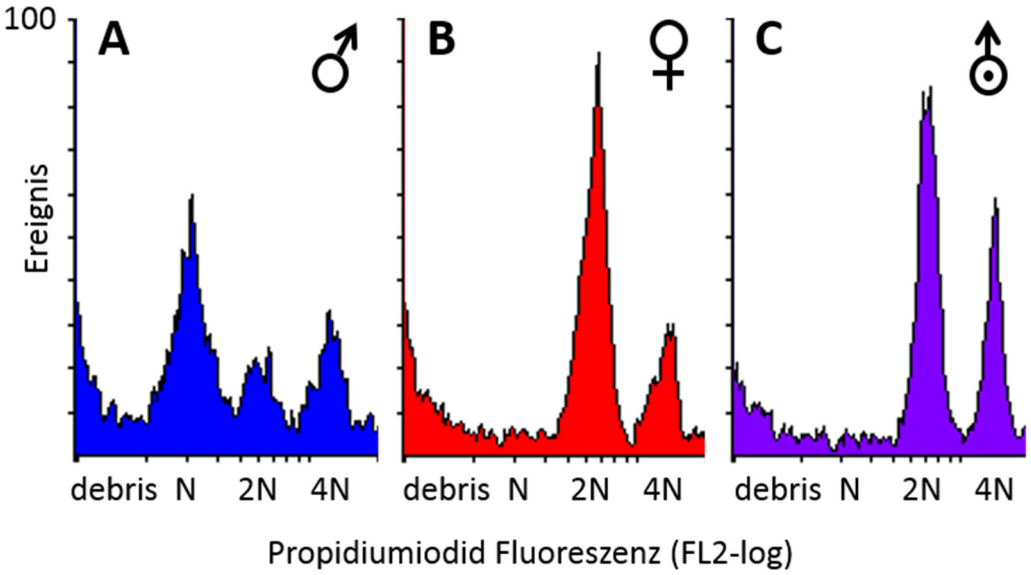

Abb. 3.3: Von einem Durchflusszytometer ausgegebene DNA-Histogramme für *B. brevicornis*: (A) Ein repräsentatives haploides Männchen, (B) ein diploides Weibchen und (C) ein diploides Männchen. In allen Histogrammen sind auch kleine Peaks polyploider Zellen zu sehen, z.B. diploide und tetraploide Zellen im Histogramm des haploiden Männchens (A).

Aufgrund technischer Probleme mussten 98 Proben, von denen Dorothee Blattner (Masterstudentin der AG Hoffmeister, Universität Bremen) und Dr. Andra Thiel (AG Populations- und Evolutionsökologie, FB2, Universität Bremen) 40 Messungen durchführten, mit einem anderen Gerät (BD FACSAria™ II Special Order System, Becton Dickinson, Breda, NL) analysiert werden. Dabei wurde der mCherry-Bandfilter verwendet und die jeweilige Analyse konnte aufgrund eines fehlenden Schwellenwertes erst nach Messung von 10.000 Zellen beendet werden.

Von 735 F_1-Männchen konnte der Ploidiegrad für 660 Tiere (90 %) zugeordnet werden. Als unbekannt deklarierte Männchen waren entweder entkommen oder das ihnen zugeordnete Histogramm war auch nach der alternativen Verwendung des FL3-Filters nicht eindeutig.

3.1.3 Inzuchtdepression

Dieser Versuchsteil beschäftigt sich zum einen mit der Auswirkung von Inzucht auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von *B. brevicornis* und *B. hebetor* und einem möglichen Eintritt in den DMV. Des Weiteren sollte die Stärke der Inzuchtdepression beider Arten quantifiziert und miteinander verglichen werden und eine mögliche Robustheit gegenüber Inzucht durch die Suche nach innerartlichen Unterschieden in der Ausprägung der Inzuchteffekte ermittelt werden. Dafür wurden die oben genannten Stämme (siehe Kapitel 3.1.2) verwendet und über vier Generationen gezüchtet. Für jeden Stamm wurden bis zu 20 Isofemale-Linien erstellt, bei denen die Nachkommen einer Linie alle auf ein Muttertier zurück gehen und jeweils eine Tochter für die Weiterzucht verwendet wurde. Von diesen Linien gehörte die eine Hälfte zur Inzuchtbehandlung und die andere repräsentierte eine genetisch diverse Population. Die Parentalgeneration entsprach hierbei den bereits in Kapitel 3.1.2 angesprochenen virginen Weibchen und auch die Zucht der F_1-Generation wurde oben bereits beschrieben. Zur Weiterzucht einer Linie wurde jeweils eine virgine Tochter zufällig ausgewählt und entweder mit einem Bruder (Inzucht) oder mit einem nicht direkt verwandten Männchen des gleichen Stammes (divers) verpaart. Verweigerte das Weibchen die Paarung, so erfolgte eine Zwangsverpaarung mit dem zuvor abgelehnten Männchen. Anschließend durfte das Weibchen sukzessive fünf Wirte parasitieren und wurde danach, ebenso wie zuvor sein Paarungspartner, separat in einem 250 µl Mikroreaktionsgefäß eingefroren.

In jeder Generation (F_1-F_4) wurden die kumulative Anzahl der Eier, Puppen, Männchen und Weibchen notiert und daraus das Geschlechterverhältnis und die Entwicklungsmortalität der Nachkommen berechnet. Frisch geschlüpfte Wespen wurden zunächst nach Geschlecht und Schlupftag separiert und nach Abschluss des Brutzeitraumes, drei Wochen nach Parasitierung der Wirte, für die Weiterzucht verwendet. Spätestens nach Erhalt der F_4-Generation wurden die Versuche beendet. War in einer Linie keine Tochter vorhanden so galt diese ab der entsprechenden Generation als ausgestorben.

Linien für die keine Folgegeneration gezüchtet werden konnte, z.B. durch das Entfliegen des einzigen Weibchens, mussten von den statistischen Analysen ausgeschlossen werden. Von anfänglich 96 Linien konnten 88 (92 %) zur Auswertung verwendet werden.

3.1.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Anteile an Tieren, die ein bestimmtes Verhalten zeigten, erfolgte mit Hilfe generalisierter linearer Modelle (GLM; Nelder & Wedderburn, 1972). Auf diese Weise konnten die Modelle an nicht normal verteilte Daten angepasst werden. Eine ausführliche Beschreibung der Methode ist in Kapitel 2.2.2 zu finden. Zur Analyse diente das Statistikprogramm R 2.13.1 (R developmental core team 2011) mit den Paketen „car" (Fox & Weisberg, 2011) und „lme4" (Bates *et al.*, 2011), wobei die jeweilige Linkfunktion der entsprechenden Daten-verteilung angepasst wurde. Die Auswertung binärer und prozentualer Daten erfolgte mit einer binomialen bzw. quasibinomialen Verteilung und der logit Linkfunktion, während für Poisson-verteilte Zähldaten eine log Linkfunktion verwendet wurde. Binäre Daten mit zu hoher Varianz (*overdispersion*) wurden mit der Funktion *data$resid<-as.factor(1:dim(data)[1])* angepasst und die erhaltene Variable als Zufallsfaktor (random factor) ins Modell integriert (R help, 2010).

Die Daten zur temperaturabhängigen Lebensdauer von BB1 wurden mit einem GLM ausgewertet. Da es sich hierbei um kontinuierliche rechtsschiefe Daten handelte wurde eine Gamma-Verteilung verwendet.

Die statistische Auswertung beider Versuchsteile erfolgte auf zwei Ebenen. Zum einen wurde nach zwischenartlichen Unterschieden gesucht, indem die Variable **Art** verwendet wurde. Dabei diente die Integration der Variable **Stamm** als Zufallsfaktor zur Vermeidung von Pseudo-replikaten. Für die Analysen zu innerartlichen Unterschieden wurden die Variable **Stamm** verwendet und der Datensatz auf die jeweilige Art, *B. brevicornis* oder *B. hebetor*, reduziert.

Die statistische Auswertung zur Produktion diploider Männchen erfolgte ausschließlich mit den Daten der F_1-Generation. Ein möglicher Einfluss von Inzucht wurde durch die Verwendung der Variable **Behandlung**, die codierte, ob das Weibchen (Parentalgeneration) mit einem seiner Söhne (Inzucht) oder einem nicht direkt verwandten Männchen (divers) verpaart wurde, getestet. Konnte ein Einfluss der Anzahl parasitierter Wirte auf die zu erklärende Variable nicht ausgeschlossen werden, so floss die Variable **Wirte** als Zufallsfaktor (random factor) ins GLMM ein. In die Analysen zum Geschlechterverhältnis der Nachkommen flossen nur die Daten der Weibchen ein, die bis zum Versuchsende überlebten, während die Tests zur Produktion diploider Männchen und zur Mortalität während der Entwicklung vom Ei zur Imago alle Daten umfassten. Die Verwendung der *cbind*-Funktion ermöglichte hierbei eine Gewichtung der zu testenden Proportionen, durch die die zugrunde liegenden Stichprobenumfänge ins Modell einfließen (Crawley, 2007). Die Analysen zu zwischenartlichen Unterschieden besagter Parameter wurden mit GLMMs durchgeführt. Für etwaige innerartliche Unterschiede wurden GLMs verwendet.

Um zu klären, wie wahrscheinlich der Eintritt in den DMV für die fünf Brackwespen-Stämme war und ob die Stärke der Inzuchtdepression zwischen den Stämmen variierte, wurden alle Daten von der F_1 bis zur F_4 verwendet. Inwiefern die Behandlung und die Art bzw. der Stamm die Überlebenswahrscheinlichkeit der Isofemale-Linien über vier Generationen beeinflusste, wurde mit der in SPSS für Windows (Version 11.0) enthaltenen Kaplan-Meier-Regression untersucht (für Details siehe Kapitel 2.2.2). Als ausgestorben galt eine Linie, wenn eine Tochter gar keinen oder ausschließlich männlichen Nachwuchs produzierte. Linien, in denen in der F_4 noch weiblicher Nachwuchs auftrat, galten entsprechend als überlebend. Basierend auf der Behandlung wurde untersucht, ob es zwischen Arten bzw. Stämmen zu unterschiedlichen Entwicklungen in der Eiproduktion, der Entwicklungsmortalität oder dem Geschlechterverhältnis der Nachkommen kam. Zur Vermeidung von Pseudoreplikaten floss die Variable **Linie** als Zufallsfaktor (random factor) in die verwendeten GLMMs ein, wobei diese Variable auf Artebene zusätzlich im Stamm genestet war.

Bei allen Analysen setzte sich das jeweilige Ausgangsmodell aus Termen erster und teilweise auch zweiter Ordnung zusammen. Interaktionen und erklärende Variablen wurden rückwärtig aus dem Modell entfernt, wenn die entsprechende Variable nicht signifikant war. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde das dadurch erhaltene minimal adäquate Modell verwendet.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Temperaturabhängige Lebensdauer

Je nach Temperatur variierte das erreichte Alter virginer Brackwespen (Alter: $\chi^2$1;86=17,45; p<0,01; GLM Gamma; Abb. 3.4). So lebte B. brevicornis bei Temperaturen von 10 und 15 °C ein halbes Jahr oder länger während Tiere dieser Art bei höheren und niedrigeren Temperaturen nur wenige Monate alt wurden. Dabei erreichten Weibchen ein höheres Alter als Männchen (Geschlecht: $\chi^2$1;86=9,98; p<0,001; GLM Gamma). Die Lebensdauer wurde bei beiden Geschlechtern in gleicher Weise von der Temperatur beeinflusst (Alter*Geschlecht: $\chi^2$1;86=0,34; p=0,56; GLM Gamma).

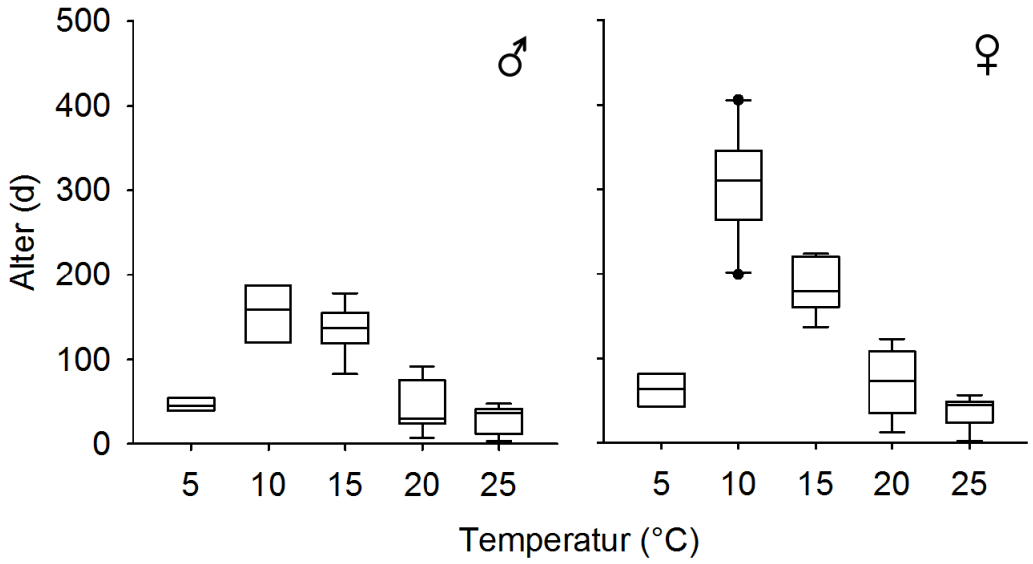

Abb. 3.4: Temperaturabhängige Lebensdauer von virginen B. brevicornis Männchen und Weibchen des Stammes BB1, die unter Langtagbedingungen (16 Std hell: 8 Std dunkel) gehalten und ad libitum mit Honig und Wasser versorgt wurden.

3.2.2 Produktion diploider Männchen

Bei *B. brevicornis* wurden mehr Söhne produziert als bei *B. hebetor* (Art: $\chi^2_{1;96}$=9,56; p<0,01; GLMM binomial; Abb. 3.5 A), wobei das Geschlechterverhältnis der Nachkommen unter Inzucht stärker zu den Männchen verschoben war als in genetisch diversen Linien (Behandlung: $\chi^2_{1;96}$=18,14; p<0,001; GLMM binomial). Dabei wirkte sich die Inzuchtbehandlung bei beiden Arten in gleicher Weise auf das Geschlechterverhältnis aus (Art*Behandlung: $\chi^2_{1;96}$=1,26; p=0,26). Unter den Männchen konnten bei *B. brevicornis* mehr diploide Tiere gefunden werden als bei *B. hebetor* (Art: $\chi^2_{1;96}$=6,59; p<0,01; GLMM binomial; Abb. 3.5 B), wobei Mutter-Sohn-Verpaarungen zu einer höheren Produktion diploider Männchen führten als die Verpaarung

nicht direkt verwandter Tiere (Behandlung: $\chi^2_{1;96}$=9,05; p<0,01; GLMM binomial). Das Auftreten diploider Männchen wurde bei beiden Arten gleichermaßen von der Behandlung beeinflusst (Art*Behandlung: $\chi^2_{1;96}$=0,02; p=0,88). Bei *B. brevicornis* starben 46 ± 4 % der Individuen während der Entwicklung vom Ei zur Imago wohingegen es bei *B. hebetor* 63 ± 2 % waren (Art: $\chi^2_{1;96}$=14,68; p<0,001; GLMM binomial). Zwischen den Behandlungen konnte nur ein Trend für eine höhere Entwicklungsmortalität unter Inzucht gefunden werden (Behandlung: $\chi^2_{1;96}$=3,08; p=0,08; GLMM binomial; Abb. 3.5 C). Einen übergeordneten Einfluss von Art und Behandlung gab es jedoch nicht (Art*Behandlung: $\chi^2_{1;96}$=0,85; p=0,36; GLMM binomial).

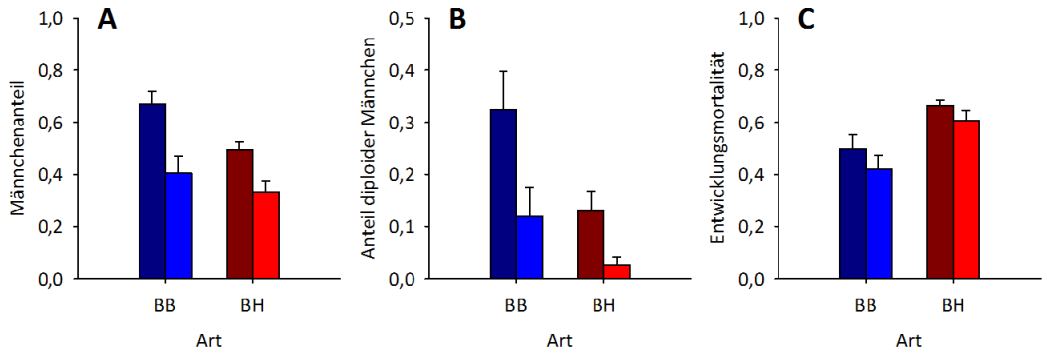

Abb. 3.5: (A) Geschlechterverhältnis, (B) mittlerer Anteil (+ SE) diploider Männchen und (C) Mortalität der F_1-Generation während der Entwicklung vom Ei zur Imago (dunkle Balken: Inzucht, helle Balken: genetisch diverse Linien, BB: *Bracon brevicornis*, BH: *Bracon hebetor*)

Eine Betrachtung auf Stammesebene zeigte, dass sich das Geschlechterverhältnis der Nachkommen nicht zwischen BB1 und BB2 unterschied (Stamm: $\chi^2_{1;39}$=0,59; p=0,44; GLM quasibinomial), unter Inzucht aber mehr Söhne auftraten (Behandlung: $\chi^2_{1;39}$=6,01; p<0,05; GLM quasibinomial). Der Anteil diploider Söhne unterschied sich weder zwischen den *B. brevicornis* Stämmen (Stamm: $\chi^2_{1;39}$=0,56; p=0,46; GLM quasibinomial) noch gab es einen Inzuchteffekt (Behandlung: $\chi^2_{1;39}$=2,83; p=0,09; GLM quasibinomial). Jedoch gab es für die Mortalität während der Entwicklung vom Ei zur Imago einen Trend, dass bei BB2 mehr Individuen vor dem Schlupf verstarben als bei BB1 (Stamm: $\chi^2_{1;39}$=3,11; p=0,08; GLM quasibinomial; Abb. 3.6 A links). Zudem entwickeln sich unter Inzucht tendenziell weniger Tiere zu Imagines (Behandlung: $\chi^2_{1;39}$=3,20; p=0,07; GLM quasibinomial).

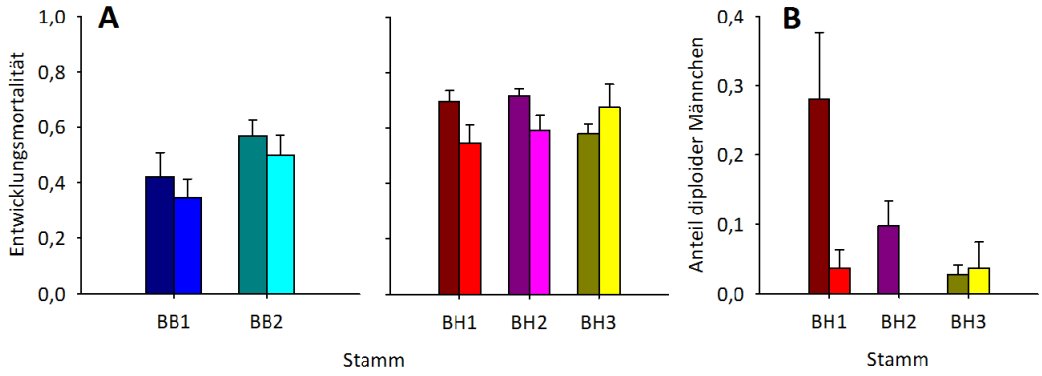

Abb. 3.6: (A) Mortalität der F_1-Generation während der Entwicklung vom Ei zur Imago und (B) mittlerer Anteil (+ SE) diploider Männchen (dunkle Balken: Inzucht, helle Balken: genetisch diverse Linien, BB1 & BB2: deutsche *B. brevicornis* Stämme, BH1 & BH2: ägyptische *B. brevicornis* Stämme, BH3: deutscher *B. hebetor* Stamm)

Beim Vergleich der *B. hebetor* Stämme ergab sich ein anderes Bild. Zunächst unterschied sich das Geschlechterverhältnis auch bei dieser Art nicht zwischen den einzelnen Stämmen (Stamm: $\chi^2_{2;57}$=1,38; p=0,50; GLM quasibinomial) und war unter Inzuchtbedingungen ebenfalls stärker zu den Männchen verschoben (Behandlung: $\chi^2_{1;57}$=9,32; p<0,01; GLM quasibinomial). Jedoch war zwischen den Stämmen ein deutlicher Unterschied in der Produktion diploider Männchen zu sehen (Stamm: $\chi^2_{2;57}$=17,59; p<0,001; GLM quasibinomial; Abb. 3.6 B). Während in BH3 kaum diploide Männchen gefunden wurden, entsprach das vermehrte Auftreten solcher Männchen bei ingezüchteten BH1 der Produktion diploider Männchen bei ingezüchteten *B. brevicornis* (vergl. Abb. 3.5 B). Auch bei *B. hebetor* traten unter Inzucht mehr diploide Männchen auf als bei der Verpaarung nicht direkt verwandter Eltern (Behandlung: $\chi^2_{1;57}$=9,36; p<0,01; GLM quasibinomial). Dabei wirkte sich die Inzuchtbehandlung bei den drei Stämmen in gleicher Weise auf die DMP aus (Stamm*Behandlung: $\chi^2_{2;57}$=4,69; p=0,10; GLM quasibinomial). Abhängig von der Stammeszugehörigkeit und der Behandlung, d.h. ob Inzucht vorlag oder nicht, unterschied sich die Mortalität während der Entwicklung vom Ei zur Imago (Stamm*Behandlung: $\chi^2_{2;57}$=8,98; p<0,05; GLM quasibinomial). So gab es zwischen ingezüchteten und genetisch diversen BH3 Stämmen keinen Unterschied in der Entwicklungsmortalität, während die Überlebens-wahrscheinlichkeit der BH1 und BH2 Stämme unter Inzucht geringer war (Abb. 3.6 A rechts).

3.2.3 Inzuchtdepression

Über vier Generationen nahm die Überlebenswahrscheinlichkeit von *B. brevicornis* stärker ab als die von *B. hebetor* (Art: $\chi^2_{1;88}$=4,85; p<0,05; Log Rang Test; Abb. 3.6). Auch hatten ingezüchtete Linien eine höhere Wahrscheinlichkeit zu sterben als genetisch diverse Linien (Behandlung: $\chi^2_{1;88}$=4,70; p<0,05; Log Rang Test).

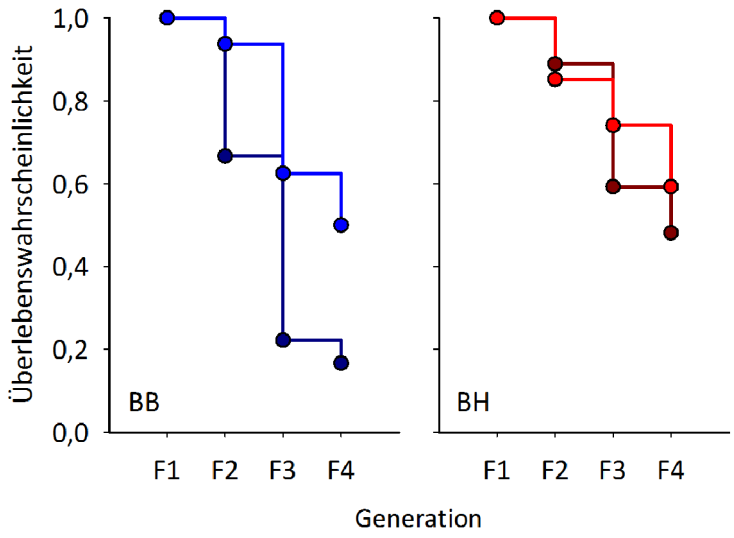

Abb. 3.6: Durchschnittliche Wahrscheinlichkeit von Brackwespen in den Generationen F_1-F_4 noch zu leben (dunkle Punkte/Linie: ingezüchtete Linien, helle Punkte/Linie: genetisch diverse Linien, BB: *Bracon brevicornis*, BH: *Bracon hebetor*)

Weder für *B. brevicornis* (Stamm: $\chi^2_{1;34}$=0,28; p=0,60; Log Rang Test) noch für *B. hebetor* (Stamm: $\chi^2_{2;54}$=2,25; p=0,33; Log Rang Test) gab es zwischen den einzelnen Stämmen Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit. Während ingezüchtete *B. brevicornis* Stämme schneller ausstarben als genetisch diverse *B. brevicornis* Stämme (Behandlung: $\chi^2_{1;34}$=5,67; p<0,05; Log Rang Test), stieg das Aussterberisiko der *B. hebetor* Stämme in beiden Behandlungen gleichmäßig über vier Generationen an (Behandlung: $\chi^2_{1;54}$=1,48; p=0,22; Log Rang Test).

Die durchschnittliche Anzahl an Eiern, die ein Weibchen pro Generation an bis zu fünf angebotene Wirte legte, veränderte sich abhängig von der Art und der Generation (Art*Generation: $\chi^2_{1;88}$=39,58; p<0,001; GLMM poisson). *B. brevicornis* Weibchen legten weniger Eier als *B. hebetor* Weibchen (Abb. 3.7 A). Während die Eiproduktion bei *B. hebetor* über vier Generationen konstant blieb, nahm sie bei *B. brevicornis* ab. Die Behandlung, d.h. ob Inzucht vorlag oder nicht, hatte keinen Einfluss auf die Anzahl gelegter Eier (Behandlung: $\chi^2_{1;88}$=0,16; p=0,69; GLMM poisson). Wie viele Individuen während der Entwicklung vom Ei zur Imago starben, hing neben der Art auch davon ab, ob die Eltern direkt miteinander verwandt waren (Art*Behandlung: $\chi^2_{1;88}$=8,15; p<0,01; GLMM binomial). Unabhängig von der Behandlung schlüpften bei *B. hebetor* nur aus 40-45 % der Eier Wespen, während bei *B. brevicornis* unter Inzucht mit 55,5 ± 3,7 % mehr Individuen während der Entwicklung starben als die 37,4 ± 3,2 % in genetisch diversen Linien dieser Art. Dabei blieb die Entwicklungsmortalität über vier Generationen konstant (Generation: $\chi^2_{1;88}$=0,23; p=0,63; GLMM binomial).

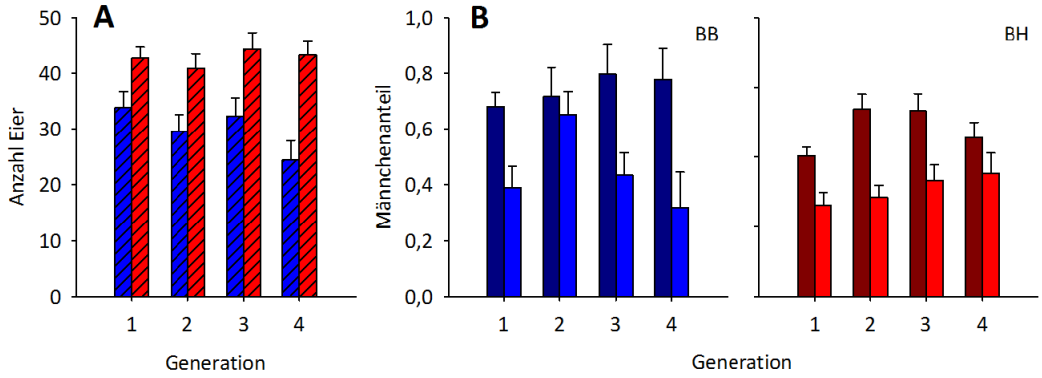

Abb. 3.7: (A) kumulative Anzahl Eier, die im Schnitt von einem Weibchen gelegt wurden und (B) Geschlechterverhältnis über vier Generationen (gestreifte blaue Balken: *Bracon brevicornis* (BB), gestreifte rote Balken: *Bracon hebetor* (BH), dunkle Balken: Inzucht, helle Balken: genetisch diverse Linien)

Betrachtet man das Geschlechterverhältnis, so konnten bei *B. brevicornis* im Verhältnis weniger Weibchen gefunden werden als bei *B. hebetor* (Art: $\chi^2_{1;88}$=13,61; p<0,001; GLMM binomial; Abb. 3.7 B). Dabei war das Geschlechterverhältnis in ingezüchteten Linien stärker zu den Männchen verschoben als in genetisch diversen Linien (Behandlung: $\chi^2_{1;88}$=37,51; p<0,001; GLMM binomial). Bei beiden Arten wirkte sich die Behandlung, d.h. ob die Eltern direkt miteinander verwandt waren oder nicht, in gleicher Weise auf den Männchenanteil aus (Art*Behandlung: $\chi^2_{1;88}$=0,79; p=0,38; GLMM binomial). Über vier Generationen veränderte sich das Geschlechterverhältnis und es kam zu einer Verringerung des Weibchenanteils (Generation: $\chi^2_{1;88}$=3,97; p<0,05; GLMM binomial). Dabei wurde die Entwicklung des Geschlechterverhältnisses über vier Generationen weder von der Art (Art*Generation: $\chi^2_{1;88}$=0,43; p=0,51; GLMM binomial) noch von der Behandlung (Behandlung*Generation: $\chi^2_{1;88}$=0,81; p=0,37; GLMM binomial) beeinflusst.

Abhängig von der Stammeszugehörigkeit variiert die Anzahl der pro Weibchen gelegten Eier zwischen den Generationen (Generation*Stamm: $\chi^2_{1;34}$=8,44; p<0,01; GLMM poisson; Tab. 3.1). Während die Anzahl der Eier in BB1 über vier Generationen abnahm, blieb sie bei BB2 weitgehend konstant. Allerdings hatte auch der Verwandtschaftsgrad des Weibchens mit seinem Paarungspartner einen Einfluss auf die Menge gelegter Eier pro Generation (Behandlung*Generation: $\chi^2_{1;34}$=16,94; p<0,001; GLMM poisson). So legten ingezüchtete Weibchen trotz kleiner Schwankungen über vier Generationen gleich viele Eier, während die Eiproduktion von Weibchen der genetisch diversen Behandlung mit der Zeit langsam abnahm. Von den Eiern der ingezüchteten *B. brevicornis* Stämme starben 55,5 ± 3,7 % während der Entwicklung zur Imago, wogegen bei der anderen Behandlung nur 37,4 ± 3,2 % der Individuen

eingingen (Behandlung: $\chi^2_{1;34}$=14,33; p<0,001; GLMM binomial). Dabei hatten weder der Stamm (Stamm: $\chi^2_{1;34}$=0,36; p=0,55; GLMM binomial) noch die Generation (Generation: $\chi^2_{1;34}$=0,00; p=1,00; GLMM binomial) einen Einfluss auf die Entwicklungsmortalität.

Tab.3.1: Kumulative Anzahl Eier, die durchschnittlich pro ingezüchtetem bzw. genetisch diversem Brackwespen-Weibchen (Mittelwert ± SE) in den Generationen F_1-F_4 gelegt wurden

	Inzucht				Divers			
Stamm	**F_1**	**F_2**	**F_3**	**F_4**	**F_1**	**F_2**	**F_3**	**F_4**
BB1	25±7	25±6	31± 2	23±0	44±8	36±5	27±6	22±5
BB2	36±4	21±7	50±11	40±6	32±2	36±4	32±2	22±7
BH1	43±3	36±7	29±15	51±0	49±2	48±5	44±5	44±6
BH2	53±4	52±3	53± 7	48±3	43±7	47±5	50±9	43±9
BH3	42±2	35±7	39± 5	39±4	25±4	26±7	39±4	39±4

BB: *Bracon brevicornis*
BH: *Bracon hebetor*

Abhängig von der Stammeszugehörigkeit variierte die mittlere Anzahl pro *B. hebetor* Weibchen gelegter Eier auf verschiedene Weise zwischen den Behandlungen (Behandlung*Stamm: $\chi^2_{1;54}$=7,63; p<0,05; GLMM poisson; Tab. 3.1). Über vier Generationen veränderte sich die Eizahl zudem unter den Einflüssen des Stammes (Generation*Stamm: $\chi^2_{1;54}$=11,64; p<0,01; GLMM poisson) und der Behandlung (Behandlung*Generation: $\chi^2_{1;54}$=13,01; p<0,001; GLMM poisson). Erstaunlicherweise legten ingezüchtete BH1 Weibchen in der F_4 mehr Eier als in der F_1, während die Eiproduktion genetisch diverser Weibchen desselben Stammes über vier Generationen konstant blieb. Für BH3 waren die Befunde anders herum, so dass die Eiproduktion unter Inzucht über vier Generationen konstant blieb und bei genetisch diversen Linien von der F_1 zur F_4 anstieg. Für BH2 konnten weder zwischen den Behandlungen noch zwischen den Generationen Unterschiede in der Eizahl gefunden werden. Die Mortalität während der Entwicklung vom Ei zur Puppe unterschied sich nicht zwischen den drei *B. hebetor* Stämmen (Stamm: $\chi^2_{1;54}$=1,10; p=0,58; GLMM binomial). Sowohl unter Inzucht als auch bei Verpaarungen nicht direkt verwandter Tiere starben über 60 % der Nachkommen (Behandlung: $\chi^2_{1;54}$=0,87; p=0,35; GLMM binomial) und die Entwicklungsmortalität blieb über vier Generationen konstant (Effekt der Generation: $\chi^2_{1;54}$=0,39; p=0,53; GLMM binomial).

Bei ingezüchteten *B. brevicornis* war das Geschlechterverhältnis stärker zu den Männchen verschoben als bei genetisch diversen Stämmen (Behandlung: $\chi^2_{1;34}$=14,32; p<0,001; GLMM binomial; Tab. 3.2). Über vier Generationen blieb das Verhältnis von Männchen und Weibchen unter Inzucht nahezu konstant, wohingegen bei genetisch diversen *B. brevicornis* in der F_2

zunächst mehr Männchen auftraten, bevor das Geschlechterverhältnis in der F_4 wieder den Ausgangswert erreichte (Behandlung*Generation: $\chi^2_{1;34}$=14,53; p<0,001; GLMM binomial).

Tab.3.2: Prozentualer Männchenanteil (Mittelwert ± SE) ingezüchteter und genetisch diverser Brackwespen über vier Generationen (F_1-F_4)

	Inzucht				Divers			
Stamm	**F_1**	**F_2**	**F_3**	**F_4**	**F_1**	**F_2**	**F_3**	**F_4**
BB1	64±9 %	62±16 %	75±25 %	100± 0 %	37±11 %	60±12 %	38±10 %	29±14 %
BB2	72±5 %	87± 8 %	84± 2 %	67± 0 %	41±12 %	70±13 %	50±14 %	38±31 %
BH1	56±6 %	75± 7 %	59±11 %	57±11 %	32± 7 %	24±12 %	32±11 %	25± 4 %
BH2	51±4 %	76±12 %	98± 3 %	-	26± 5 %	43± 6 %	45± 9 %	71±13 %
BH3	44±6 %	54± 8 %	65± 7 %	57± 5 %	40±10 %	35± 6 %	44±11 %	31± 5 %

BB: *Bracon brevicornis*
BH: *Bracon hebetor*

Das Geschlechterverhältnis der drei *B. hebetor* Stämme unterschied sich in der Entwicklung über vier Generationen (Generation*Stamm: $\chi^2_{1;54}$=22,82; p<0,001; GLMM binomial; Tab. 3.2). Zudem beeinflusste die Behandlung, d.h. ob Inzucht vorlag oder nicht, die Richtung, in die sich der Männchenanteil über die Generationen veränderte (Behandlung*Generation: $\chi^2_{1;54}$=3,96; p<0,05; GLMM binomial). So nahm der Weibchenanteil bei ingezüchteten BH2 stärker ab als bei ingezüchteten BH3, während das Geschlechterverhältnis ingezüchteter BH1 über vier Generationen konstant blieb. Bei genetisch diversen BH2 traten in der F_4 erstaunlicherweise sehr viel mehr Männchen auf als in den vorherigen Generationen. Genetisch diverse Weibchen der BH1 und BH3 produzierten über vier Generationen gleichbleibend einen leichten Überschuss an Töchtern.

3.3 Diskussion

Obwohl es schon länger theoretische Studien zum Einfluss diploider Männchen auf die Populationsdynamik gibt (Zayed & Packer, 2005, Hein *et al.*, 2009, Stouthamer *et al.*, 1992), beschäftigen sich empirische Studien bisher fast ausschließlich mit der Produktion und Fertilität solcher Männchen und den daraus resultierenden Fitnesseinbußen bei ihren Paarungspartnern oder auf Populationsebene (Heimpel & de Boer, 2008, van Wilgenburg *et al.*, 2006). Mit dieser Versuchsreihe wurde getestet, inwiefern die theoretischen Szenarien auf Laborzuchten angewendet werden können. So führten lebensfähige diploide *B. brevicornis* Männchen schnell zu einer starken Abnahme des Populationswachstums, während diploide *B. hebetor* Männchen, die bereits während der Entwicklung absterben (Whiting, 1943, Antolin *et al.*, 2003), eine weniger starke Wachstumsreduktion hervorriefen. Dieser Befund bestätigt die theoretischen Vorhersagen (Hein *et al.*, 2009) und zeigt, dass *B. brevicornis* unter Inzuchtbedingungen ein

höheres Risiko hat in den DMV zu geraten, und dadurch stärker vom Aussterben bedroht ist als *B. hebetor*. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt auch eine Feldstudie mit *Bombus terrestris* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae), bei der ingezüchtete Kolonien mit diploiden Vätern kaum Nachwuchs produzieren und schneller aussterben als in- bzw. ausgezüchtete Kolonien mit haploiden Vätern (Whitehorn *et al.*, 2009).

Bei Hymenopteren wird CSD als ursprünglicher Geschlechtsbestimmungsmechanismus angesehen, der bei einer Reihe von Arten innerhalb der Aculeata, Braconidae, Ichneumonoidea und Symphyta vorliegt (Cook & Crozier, 1995, Cook, 1993, Heimpel & de Boer, 2008, Asplen *et al.*, 2009, van Wilgenburg *et al.*, 2006). Auch *B. brevicornis* gehört zu dieser Gruppe, zumal das Vorliegen von CSD bei dieser Art (Speicher & Speicher, 1940) durch das Auftreten lebensfähiger diploider Männchen in dieser Studie bestätigt werden konnte. Der unter Inzucht ermittelte Männchenanteil besagter Brackwespenart in Relation zur Entwicklungsmortalität lässt laut einer Simulation von de Boer et al. (2007a) auf sl-CSD schließen. Jedoch kann eine Variante von ml-CSD mit gekoppelten Loci, die unter Inzucht faktisch wie sl-CSD wirkt (Heimpel & de Boer, 2008), nicht ausgeschlossen werden. Bis auf *Cotesia vestalis* Haliday (Hymenoptera: Braconidae), für die ml-CSD nachgewiesen wurde (de Boer *et al.*, 2008), sind bisher hauptsächlich Arten mit sl-CSD bekannt (van Wilgenburg *et al.*, 2006). Dabei unterscheidet sich die Anzahl der csd-Loci nicht nur zwischen Familien (van Wilgenburg *et al.*, 2006) sondern kann sogar innerhalb einzelner Gattungen variieren (Niyibigira *et al.*, 2004a, Niyibigira *et al.*, 2004b, Zhou *et al.*, 2006, Gu & Dorn, 2003, de Boer *et al.*, 2008, de Boer *et al.*, 2007a). Um zwischen den verschiedenen CSD-Ausprägungen unterscheiden zu können, müsste die Anzahl der vorliegenden csd-Loci bei *B. brevicornis* mittels Mikrosatelliten ermittelt werden.

Betrachtet man die einzelnen Stämme, so variiert die Intensität der Inzuchtdepression nicht nur zwischen sondern auch innerhalb der Arten. Erstaunlicherweise ähnelt der hohe Anteil lebensfähiger diploider Männchen des Stammes BH1 den Werten von *B. brevicornis* statt denen der anderen *B. hebetor* Stämme. Während die hohe Entwicklungsmortalität diploider BH2 und BH3 Männchen mit den Literaturwerten von *B. hebetor* übereinstimmen (Petters & Mettus, 1980), entspricht die vergleichsweise hohe Überlebensrate diploider BH1 Männchen dem Befund der nah verwandten Art *Bracon sp. near hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) (Holloway *et al.*, 1999). Diese beiden Arten lassen sich jedoch nur durch ihre reproduktive Isolation und nicht durch morphologische Vergleiche voneinander trennen (Heimpel *et al.*, 1997). Dass gemischte Pärchen von BH1 und BH2 in den genetisch diversen Linien Töchter hervorbrachten, spricht eindeutig für die Zugehörigkeit beider Stämme zur selben Art. Generell können Unterschiede in der Lebensfähigkeit diploider Männchen durch Umweltbedingungen, z.B.

Feuchtigkeit (Petters & Mettus, 1980) und Temperatur (Whiting & Anderson, 1932), oder bestimmte Geschlechtsbestimmungsallele, die sich unter Homozygotie letal auswirken (Holloway *et al.*, 1999), bedingt sein. Ob einer dieser Faktoren auf die innerartlichen Unterschiede der hier untersuchten *B. hebetor* Stämme zutrifft, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Um eine Aussage über das Bestehen von Arten in stark fragmentierten Habitaten treffen zu können, muss neben dem Paarungssystem und dem Geschlechtsbestimmungsmechanismus, vor allem bei Arten mit CSD, auch die genetische Komponente berücksichtigt werden. Üblicherweise haben Hymenopteren mit CSD sechs oder mehr csd-Allele (Whiting, 1943, Adams *et al.*, 1977, Periquet *et al.*, 1993, Ross *et al.*, 1993, Butcher *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2011). Während für *B. hebetor* von 10-16 unterschiedlichen csd-Allelen ausgegangen wird (Antolin *et al.*, 2003) ist die Anzahl dieser Allele bei *B. brevicornis* derzeit noch unbekannt. Aber auch ein anfänglich großer Genpool kann bei stark isolierten Freilandpopulationen durch genetische Drift und Inzucht reduziert werden (Charlesworth & Willis, 2009, Leberg, 1992). Eine vorliegende Inzuchtdepression wird dann vor allem durch ein zu den Männchen verschobenes Geschlechterverhältnis und das vermehrte Auftreten diploider Männchen sichtbar (van Wilgenburg *et al.*, 2006, Heimpel & de Boer, 2008, Cook, 1993), wie es für ingezüchtete Brackwespen dieser Studie gezeigt werden konnte. Dem kann durch eine Auffrischung mit Wildtieren aus anderen Populationen oder mit Individuen aus Laborstämmen entgegen gewirkt werden (Stouthamer *et al.*, 1992, Hein *et al.*, 2009), wobei jedoch die Gefahr besteht, dass Wespen aus verschiedenen Regionen nicht oder nur schwer miteinander gekreuzt werden können (Hoy & Cave, 1988, Pinto *et al.*, 1991). Dies könnte bei den diversen Linien der Fall gewesen sein, so dass die Überlebenswahrscheinlichkeit wie bei den ingezüchteten Linien abnahm.

Kleine Populationen mit einer hohen genetischen Diversität haben nicht automatisch ein geringeres Aussterberisiko gegenüber genetisch weniger diversen Populationen (Elias *et al.*, 2010). Vor allem wenn diploide Männchen bereits während der Entwicklung absterben (Hein *et al.*, 2009) oder in Ausnahmefällen vollständig fertil sind (Elias *et al.*, 2009, Cowan & Stahlhut, 2004) reduziert dies das Risiko einer Population in den DMV zu geraten. Ansonsten wachsen Populationen, in denen Weibchen gegen diploide Männchen als Paarungspartner diskriminieren, schneller als solche, in denen Weibchen sich auch mit sterilen diploiden Männchen verpaaren und anschließend zur Produktion haploider Söhne oder triploider Nachkommen gezwungen sind (Stouthamer *et al.*, 1992). Generell könnte die zusätzliche Integration haploider Männchen die Wahrscheinlichkeit von Kopulationen mit diploiden

Männchen verringern und einem möglichen Eintritt in die durch diploide Männchen bedingte Abwärtsspirale vorbeugen (Schneider & Viñuela, 2007, Hein *et al.*, 2009). Die in dieser Studie gefundenen innerartlichen Unterschiede bei *B. hebetor* lassen zudem darauf schließen, dass sich Populationen in ihrer Robustheit gegenüber Inzucht stark unterscheiden können.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass das Vorkommen diploider Männchen die Inzuchtproblematik bei kleinen Populationen mit CSD verstärken kann. Vor allem lebensfähige diploide Männchen stellen dabei ein erhöhtes Risiko für den Eintritt in den DMV dar. Die Überlebenswahrscheinlichkeit einer Population wird neben der Populationsgröße, der Allele-Vielfalt und der Produktion diploider Männchen (Cook & Crozier, 1995, Zayed & Packer, 2005) auch durch andere Faktoren wie die Konkurrenz um Paarungspartner, die Abwanderungswahrscheinlichkeit vom Schlupfort und der Wahrscheinlichkeit diploide Männchen als Paarungspartner abzuweisen beeinflusst (Hein *et al.*, 2009). Das vermehrte Auftreten lebensfähiger diploider Männchen, vor allem bei ingezüchteten *B. brevicornis* Stämmen, wirft die Frage auf, wie sich virgine Weibchen dieser Art bei der Konfrontation mit einem diploiden Paarungspartner verhalten. Um den Einfluss solcher Männchen auf das Überleben einer Population richtig einschätzen zu können, ist zudem zu klären, ob diploide *B. brevicornis* Männchen fertil sind und inwiefern sie sich gegenüber haploiden Männchen bei der Partnerwahl durchsetzen können. Fraglich ist auch, ob besagte Brackwespenart über Strategien verfügt, mit denen das Risiko für Verpaarungen mit Geschwistern oder diploiden Männchen minimiert und im besten Fall sogar verhindert werden können. Auf diese Thematik wird in den nächsten Kapiteln ausführlich eingegangen.

4. Verhalten und Fertilität polyploider Brackwespen

4.1 Diploide Männchen

Bei Parasitoiden mit CSD (komplementäre Geschlechtsbestimmung) ist die Anwesenheit diploider Männchen in einer Population nicht immer leicht zu erkennen und bei einigen Arten sind Männchen mit unterschiedlichen Ploidiegraden visuell nicht zu trennen (z.B de Boer *et al.*, 2007b, Beukeboom, 2001). Bei anderen Arten ist die Präsenz diploider Männchen durch morphologische Unterschiede zu haploiden Männchen auszumachen, z.B. sind diploide *Bombus terrestris* Linneaus (Hymenoptera: Apidae) Männchen kleiner als haploide (Duchateau & Mariën, 1995, Ayabe *et al.*, 2004) während haploide *Apis mellifera* Linneaus (Hymenoptera: Apidae) Drohnen mehr Flügelhaken haben als diploide (Herrmann *et al.*, 2005). Verschiedene Ausprägungen des Phänotyps sind jedoch nicht zwangsläufig auf das äußere Erscheinungsbild begrenzt. So haben diploide Männchen einiger Arten z.B. kleinere Hoden (Duchateau & Mariën, 1995, Tavares *et al.*, 2003) und/oder diploide Spermien (Cournault & Aron, 2009, Yamauchi *et al.*, 2001) bzw. können fast keine Spermien produzieren (Krieger *et al.*, 1999). Bei einigen Hymenopteren können Männchen mit diploiden Spermien triploiden Nachwuchs zeugen (Cournault & Aron, 2009, Krieger *et al.*, 1999, Naito & Suzuki, 1991), während bei anderen Arten Probleme während der Produktion bzw. Übertragung von Spermien (Holloway *et al.*, 1999) oder bei der Befruchtung von Eizellen (MacBride, 1946, Holloway *et al.*, 1999) zur Sterilität diploider Männchen führen. Von zwei bekannten Arten abgesehen, bei denen fast vollständig fertile diploide Männchen vorkommen (Cowan & Stahlhut, 2004, Elias *et al.*, 2009), sind Weibchen, die sich mit einem diploiden Männchen verpaaren, anschließend gezwungen entweder nur noch haploide Söhne (Heimpel & de Boer, 2008) oder sterilen triploiden Nachwuchs (Cournault & Aron, 2009, de Boer *et al.*, 2007b) hervorzubringen (Abb. 4.1).

Bei Arten mit CSD verschiebt sich das Geschlechterverhältnis unter Inzucht zu Gunsten der Männchen, da ein Teil der befruchteten Eier zu diploiden Männchen statt zu Weibchen wird (Cook, 1993, Heimpel & de Boer, 2008). Dies führt seinerseits zu einem verschärften Konkurrenzkampf der Männchen um die verbleibenden weiblichen Paarungspartner (Hein *et al.*, 2009). Vor allem wenn Weibchen sich nur einmal verpaaren, kann die Akzeptanz des falschen Partners ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis der eigenen Nachkommen verhindern (Godfray, 1990) und in kleinen Populationen unter bestimmten Bedingungen eine Aussterbespirale durch diploide Männchen (diploid male vortex) in Gang setzen (Hein *et al.*, 2009, Zayed & Packer, 2005). Wie Weibchen auf nicht direkt verwandte diploide Männchen reagieren, ist bisher weitgehend unbekannt (für eine Isofemale-Studie siehe de Boer *et al.*,

2007b). Eine Möglichkeit der Weibchen die Qualität ihres potentiellen Paarungspartners zu bewerten wäre, deren Ploidiegrad erkennen zu können.

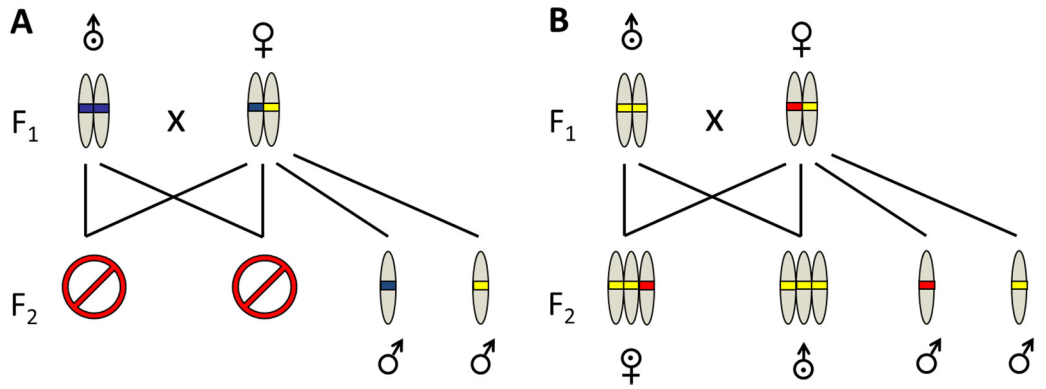

Abb. 4.1: (A) Nach Paarungen mit sterilen diploiden Männchen (F1) können nur haploide hemizygote Männchen (F2 rechts) aus unbefruchteten Eiern hervorgebracht werden. (B) Übereinstimmungsverpaarungen (*matched matings*) mit diploiden Männchen, die diploide Spermien produzieren, können zu drei verschiedenen Arten von Nachkommen führen: triploide heterozygote Weibchen (F2 links: verschiedenfarbige Bänder auf den Chromosomen), triploide homozygote Männchen (F2 Mitte: gleichfarbige Bänder auf den Chromosomen) oder haploide hemizygote Männchen aus unbefruchteten Eiern (F2 rechts).

Dies könnte direkt z.B. über kutikuläre Kohlenwasserstoffe (Herrmann *et al.*, 2005) oder indirekt über das Verhalten bzw. einzelne Fertigkeiten diploider Männchen (Borges *et al.*, 2012) geschehen. Bei letzterem ist vor allem das Paarungsverhalten als Interaktion zwischen beiden Geschlechtern von Interesse (Krebs & Davies, 1993). Dabei ist für männliche Parasitoide neben Annäherungs- und Besteigungsversuchen vor allem das Balzverhalten in Form von schnellen Flügelflattereinheiten von großer Bedeutung (Weeda, 2008, Joyce, Aluja*, et al.*, 2010). Männchen unterschiedlicher Arten stimulieren Weibchen, indem sie durch Flügelflattern niederfrequente Töne über die Luft (Danci *et al.*, 2010, Villagra *et al.*, 2011) und/oder Vibrationen über das Substrat (Joyce *et al.*, 2008, Field & Keller, 1993b) aussenden. Die akustischen Signale können sich jedoch inner- und zwischenartlich unterscheiden, z.B. in der Dauer und Frequenz von Flügelflattereinheiten (Joyce, Bernal*, et al.*, 2010). Sollte ein erhöhter Ploidiegrad der Männchen zu einer Veränderung der Flügelflattereinheiten führen, z.B. durch eine leicht abgewandelte Flügelmorphologie (Herrmann *et al.*, 2005), so wäre das Balzen dieser Tiere wirkungslos. Eine Kopulation könnte in diesem Fall nur noch erfolgen, indem sich ein diploides Männchen mit einem Weibchen verpaart, das von einem haploiden Männchen stimuliert wird, bevor der Konkurrent dieses Weibchen erreicht (Field & Keller, 1993a).

Nachdem bei *Bracon brevicornis* unter Inzuchtbedingungen lebensfähige diploide Männchen produziert werden (Speicher & Speicher, 1940, Kapitel 3) war das Ziel dieser Arbeit zu klären, ob

diploide Männchen 1) von Weibchen erkannt und als Paarungspartner vermieden werden, 2) normales Paarungsverhalten zeigen und 3) zeugungsfähig sind.

4.1.1 Material und Methoden

Für diese Versuchsreihe wurden *B. brevicornis* Wespen des BB1-Stammes verwendet (siehe Kapitel 2.1.2). Um möglichst viele diploide Männchen für die Versuche zu erhalten, durften 39 virgine Weibchen (Parentalgeneration) direkt nach dem Schlupf je zwei *Ephestia kuehniella* Larven im letzten Larvenstadium (Wirte) für 24 Std parasitieren. Anschließend hielt ich die Weibchen bei 10 °C und unter Langtagbedingungen (16 Std hell: 8 Std dunkel) und inkubierte deren Eier unter Zuchtbedingungen. Schlüpfende haploide Söhne wurden zunächst nach Mutter (Ansatz) und Schlupftag getrennt gehalten und die jeweilige Entwicklungszeit vom Ei zum Adulten berechnet. Sobald aus allen Ansätzen mindestens eine Wespe geschlüpft war, verpaarte ich jedes Muttertier mit einem seiner Söhne. Verweigerte das Weibchen die Paarung, erfolgte eine Zwangsverpaarung. Hierfür wurde das Muttertier für 8 min in einem 250 µl Mikroreaktionsgefäß auf Eis gelegt. Das so immobilisierte Tier wurde erneut demselben Männchen angeboten, woraufhin in den meisten Fällen unmittelbar eine Paarung erfolgte (für Details siehe Kitthawee, 2008). Schlug die Zwangsverpaarung fehl, so wurde am Folgetag ein erneuter Paarungsversuch mit einem anderen Sohn durchgeführt. Insgesamt konnten 28 Weibchen verpaart werden, die anschließend je fünf weitere Wirte sukzessive parasitieren durften. Abschließend wurden die Weibchen und einige ihrer haploiden Söhne als Referenztiere für genetische Analysen separat in 250 µl Mikroreaktionsgefäßen bei -20 °C eingefroren.

Aus den Mutter-Sohn-Verpaarungen gingen insgesamt 162 Söhne (F_1) hervor, die am Schlupftag zunächst separiert wurden. Frühzeitig verstorbene Männchen fror ich innerhalb von 15 Std nach ihrem Tod zur späteren Bestimmung ihres Ploidiegrades ein, während alle anderen Männchen frühestens am Folgetag für Paarungsversuche verwendet wurden. Als Paarungspartner dienten hierbei 48 - 72 Std alte virgine Weibchen, die nicht direkt mit den zu testenden Männchen verwandt waren und ungefähr gleich groß waren. Die Beobachtung eines Pärchen erfolgte in einer frischen Petrischale (ø = 3,5 mm), die mit einer Glasplatte abgedeckt war (für Details siehe Kapitel 2.2.1). Hatten die Versuchstiere 20 min nach dem Einsetzen in die Petrischale keinen Kontakt, so wurde eine neue Partnerin verwendet. Die Beobachtung begann, sobald das Männchen, z.B. durch Flügelflattern, auf das vorhandene Weibchen reagierte. Mit der Software *The Observer*® 2.0 (Noldus, Wageningen) wurden paarungsrelevante Verhaltensweisen, z.B. Flügelflattern, aufgezeichnet (Tab. 2.1). Jede Beobachtung wurde entweder nach 10 min abgebrochen oder nach erfolgter Kopulation beendet. Von den Weibchen abgelehnte

Männchen wurden während der folgenden Tage erneut mit jeweils neuen Paarungspartnerinnen getestet und deren Verhalten aufgezeichnet. Nach der dritten Ablehnung erfolgte eine Zwangsverpaarung mit dem zuvor verwendeten Weibchen, um später eine Aussage über die Fertilität des getesteten Männchens treffen zu können. Im Anschluss an die Paarung wurde jedes Männchen in ein 250 µl Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

Für die statistische Auswertung verwendete ich von jedem Tier nur die Aufzeichnungen zum ersten Paarungsversuch, in dem es zu einem Kontakt beider Geschlechter kam. Insgesamt konnten 153 Beobachtungen (94,4 %) verwendet werden, von denen 14 von Dr. Andra Thiel (AG Populations- und Evolutionsökologie, FB2, Universität Bremen), 58 von Anastasia L. Roberts (Masterstudentin MSC Ecology, Universität Bremen) und 81 von mir durchgeführt wurden.

Zur Fertilität diploider *B. brevicornis* Männchen sind mir keine Studien bekannt. Jedoch wurde über eine nicht näher benannte Art der Gattung *Habrobracon* berichtet, dass die Spermien diploider Männchen nicht in Eier eindringen können (MacBride, 1946). Sollte dies auch bei *B. brevicornis* der Fall sein, so ist zu erwarten, dass diploide Männchen ebenfalls steril sind. Die Fertilität der Männchen bestimmte ich anhand dessen Nachwuchses, wofür jedes verpaarte Weibchen sukzessive fünf Wirte parasitieren durfte. Für jede Wespe wurde die kumulative Anzahl der Eier, Söhne und Töchter notiert und aus diesen Parametern das Geschlechterverhältnis und die Entwicklungsmortalität der Nachkommen (F_2) berechnet. Getestete Männchen (F_1) wurden als fertil gewertet, wenn sie mindestens eine Tochter zeugten. Wenn Männchen und Weibchen für die Reproduktion von gleichem Wert sind und sich die Produktion beider Geschlechter nicht in den benötigten Ressourcen unterscheidet, so sollten in einer Population genauso viele Männchen wie Weibchen vorhanden sein (Fisher, 1930). Befruchten verpaarte Weibchen 50 % ihrer Eier, so kann davon ausgegangen werden, dass sich unter sieben Nachkommen zu 99,2 % ($=(1-0{,}5^7)*100$) mindestens eine Tochter befindet. Demnach wurden getestete Männchen als steril gewertet, wenn keine Tochter aber mindestens sieben Söhne schlüpften. Über die Fertilität von zehn Männchen, dessen Paarungspartnerinnen entweder gar keinen Nachwuchs oder nur wenige Söhne hervorbrachten, konnte keine Aussage getroffen werden.

Die Bestimmung des Ploidiegrades der aus den Mutter-Sohn-Verpaarungen hervorgegangenen F_1-Männchen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Kapitel 2.2.1). Die gefrorenen Tiere wurden hierfür an der Universität Bremen präpariert, wobei jede Probe kurz vor der Messung zusätzlich mit 250 µl ultrareinem Wasser (Milli-Q) verdünnt wurde, um ein ausreichend großes Volumen für die Analyse zur Verfügung zu haben. Dabei präparierte Dr. Andra Thiel 26 Tiere, während ich

die verbleibenden Wespen für die genetischen Analysen vorbereitete. Die Messungen wurden anschließend mit einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, BD Bioscience, Oxford, UK) am MPI Bremen durchgeführt, wobei Dr. Andra Thiel die Analyse eines Drittels der Versuchstiere ausführte und ich die verbleibenden Wespen testete. Die Anwesenheit eines haploiden Peaks (N) im Histogramm indizierte ein haploides Männchen (Abb. 4.2). Fehlte dieser und es war nur ein diploider Peak (2N) vorhanden so handelte es sich um ein diploides Tier. Bei 153 von insgesamt 162 Tieren (94,4 %) konnte der Ploidiegrad bestimmt werden.

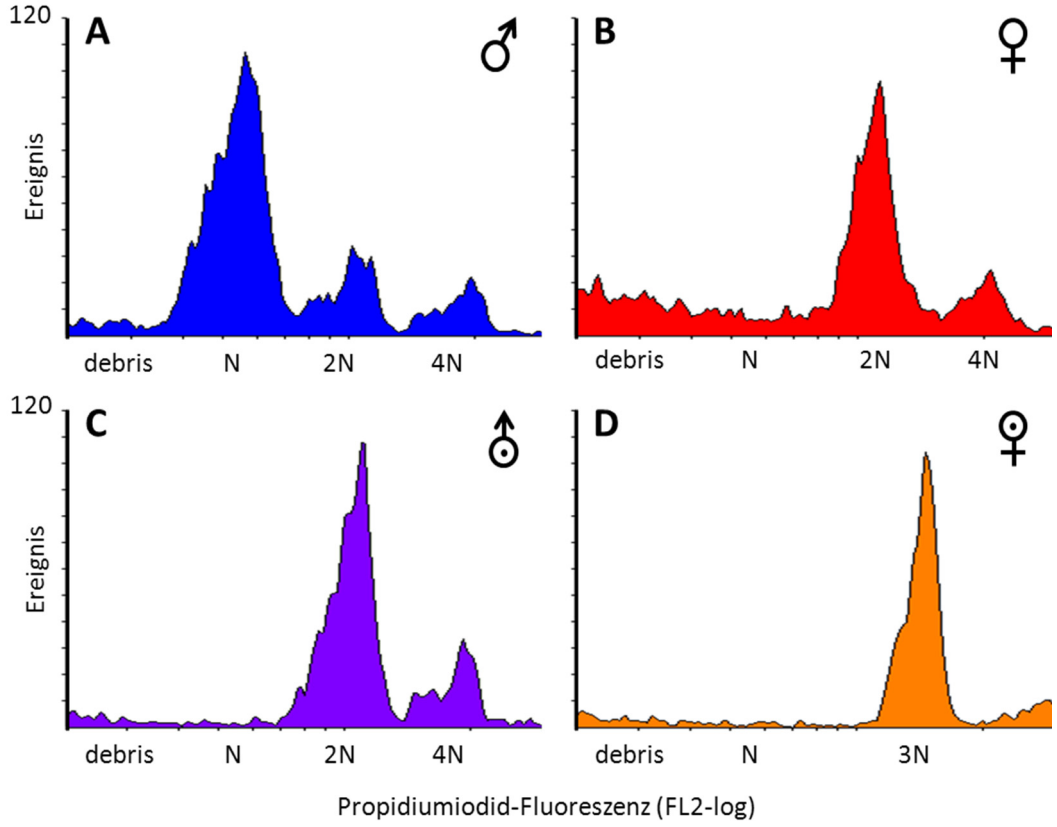

Abb. 4.2: Von einem Durchflusszytometer ausgegebene DNA-Histogramme für *B. brevicornis*: (A) Ein repräsentatives haploides Männchen, (B) ein diploides Weibchen, (C) ein diploides Männchen und (D) ein triploides Weibchen. In allen Histogrammen sind auch kleine Peaks polyploider Zellen zu sehen, z.B. diploide und tetraploide Zellen im Histogramm des haploiden Männchens (A).

4.1.2 Statistische Analyse

Ich benutzte generalisierte lineare Modelle (GLM; Nelder & Wedderburn, 1972) zur statistischen Auswertung der Anteile an Tieren, die ein bestimmtes Verhalten zeigten. Auf diese Weise konnte ich die Modelle an meine nicht normal verteilten Daten anpassen. Eine ausführliche Beschreibung der Methode ist in Kapitel 2.3.2 zu finden. Für die Analysen nutzte ich das Statistikprogramm R 2.13.1 (R developmental core team 2011) mit den Paketen „car“ (Fox & Weisberg, 2011), „lme4“ (Bates *et al.*, 2011), „pscl“ (Jackman, 2011) und „lmtest“ (Zeileis &

Hothorn, 2002). Die jeweilige Linkfunktion wurde der entsprechenden Datenverteilung angepasst. Binäre und prozentuale Daten mit einer binomialen bzw. quasibinomialen Verteilung wertete ich mit einer logit Linkfunktion aus, Poisson verteilte Zähldaten mit einer log Linkfunktion und Gamma verteilte Zeitdaten mit einer reziproken Linkfunktion.

Ob der Ploidiegrad einen Effekt auf die Entwicklungszeit vom Ei zur Imago hatte, untersuchte ich mit einem GLM. Bei den Analysen der Verhaltensversuche integrierte ich die Variable **Beobachter** als Zufallsfaktor (random factor) in die verwendeten LMMs, um etwaige beobachterspezifische Effekte zu korrigieren. Den **Ploidiegrad** des Männchens verwendete ich als erklärende Variable. Die zu testenden Variablen waren binär und beinhalteten, ob eine bestimmte Verhaltensweise (Flügelflattern, Besteigungsversuch, Kopulation) beobachtet werden konnte. Zusätzlich testete ich, ob es in der Anzahl der gezeigten Verhaltensweisen durch den Ploidiegrad bedingte Effekte gab. Da ein Teil der Männchen gar kein Balzverhalten zeigte und somit recht viele Nullen für die Anzahl der Flügelflattereinheiten und der Besteigungsversuche entstanden, verwendete ich an dieser Stelle ein Zero-inflated Modell (ZIM; für Details siehe Kapitel 2.2.2). Diese Methode verhindert, dass die vielen Nullen den Mittelwert kleiner machen als er tatsächlich ist sowie Schätzer und Standardfehler falsch berechnet werden (Zuur *et al.*, 2009). Um zu testen, ob sich haploide und diploide Männchen in der Dauer der einzelnen Verhaltensweisen unterschieden, wurden GLMs verwendet. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Zeit, die Wespen bis zur Verpaarung benötigten, wurde mit Hilfe einer Cox-Regression untersucht (für Details siehe Kapitel 2.2.2). Die Analyse führte ich mit SPSS für Windows (Version 11.0) durch. Hierbei nutzte ich den Zeitraum vom ersten Kontakt der Paarungspartner bis zur Kopulation bzw. dem Beobachtungsende. In den Modellen wurden der **Ploidiegrad** des Fokusmännchens und der **Beobachter** als erklärende Variablen verwendet. Ob der Ploidiegrad einen Effekt auf die Akzeptanz des ersten Paarungspartners hatte oder die Notwendigkeit einer Zwangsverpaarung bestand, analysierte ich mit GLMs.

Inwiefern die Nachkommen und die Fertilität eines Männchens durch dessen Ploidiegrad beeinflusst wurden, untersuchte ich mithilfe von GLMs. Um die Entwicklungsmortalität vom Ei zur Imago bzw. das Geschlechterverhältnis der Nachkommen analysieren zu können, verwendete ich die *cbind*-Funktion, durch die eine Gewichtung der zu testenden Proportionen möglich ist, da die zugrunde liegenden Stichprobenumfänge ins Modell einfließen (Crawley, 2007). Abschließend untersuchte ich noch, ob die durchgeführten Zwangsverpaarungen durch die Fertilität der Männchen beeinflusst wurden.

Bei allen Analysen setzte sich das jeweilige Ausgangsmodell aus Termen erster und teilweise auch zweiter Ordnung zusammen. Interaktionen und erklärende Variablen wurden rückwärtig

aus dem Modell entfernt, wenn die entsprechende Variable nicht signifikant war. Das dadurch erhaltene minimal adäquate Modell verwendete ich für die Darstellung der Ergebnisse.

4.1.3 Ergebnisse

Je nach Ploidiegrad ($\chi^2_{1;153}$=16,67; p<0,001; GLM Gamma) dauerte die Entwicklung der Männchen vom Ei bis zum Adulten zwischen 11,9 ± 0,1 d (haploid) und 12,4 ± 0,1 d (diploid). Auf den ersten Blick unterschieden sich die beiden Typen von Männchen nicht in der Größe.

Während in über 90 % der Versuche Balzverhalten und Besteigungsversuche beobachtet werden konnten, kopulierte nur die Hälfte der getesteten Tiere (Abb. 4.3 A). Der Anteil haploider Männchen, die Flügelflattern (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;152}$=0,05; p=0,83; LMM binomial), Besteigungsversuche (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;153}$=0,53; p=0,47; LMM binomial) oder Kopulationen (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;153}$=1,10; p=0,29; LMM binomial) zeigten, unterschied sich nicht von dem diploider Männchen. Im Mittel vollführten beide Typen von Männchen 9 ± 1 Flügel-flattereinheiten (Ploidiegrad im Zählmodel: $\chi^2_{3;152}$=3,18; p=0,07; ZIM negativ binomial), wobei eine Einheit durchschnittlich 1,7 ± 0,3 s dauerte (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;142}$=1,09; p=0,30; GLM Gamma). Erstaunlicherweise machten haploide Männchen im Mittel drei Besteigungsversuche, während diploide Männchen durchschnittlich nur zwei Versuche durchführten (Ploidiegrad im Zählmodel: $\chi^2_{3;153}$=6,02; p<0,05; ZIM negativ binomial). Allerdings unterschieden sich beide Typen von Männchen mit einer durchschnittlichen Besteigungsdauer von 11,4 ± 0,7 s (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;153}$=1,35; p=0,25; GLM Gamma) nicht voneinander. Auch die Kopulationsdauer haploider und diploider Männchen (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;70}$=0,29; p=0,59; GLM Gamma) war mit durchschnittlich 10,7 ± 0,7 s gleich lang.

Der zeitliche Verlauf zwischen dem ersten Kontakt und der Paarung bzw. dem Beobachtungsende gestaltete sich für haploide und diploide Männchen recht ähnlich (Ploidiegrad: β=0,21; Exp(B)=1,24; $Wald_{1;153}$=0,65; p=0,42; Cox-Regression). So verpaarten sich jeweils 40 % der Männchen eines Ploidiegrades innerhalb von 300 s (Abb. 4.3 B), wobei eine Beobachtung im Mittel 371,2 ± 20,2 s dauerte.

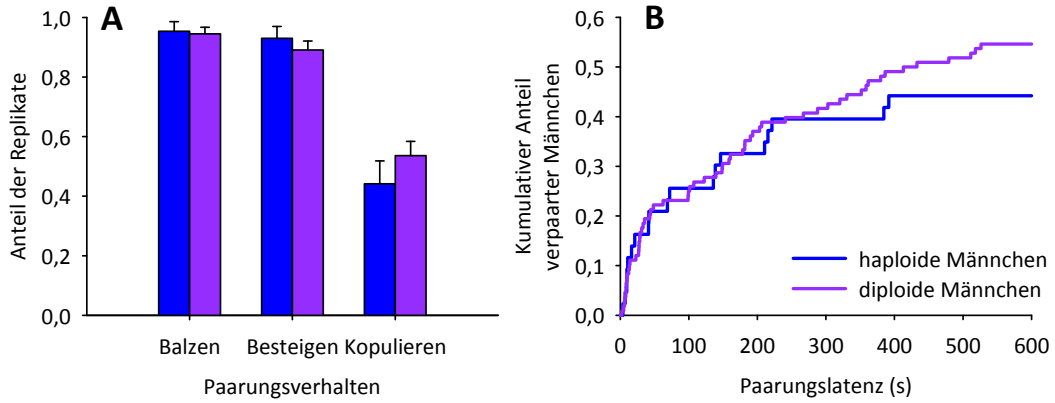

Abb. 4.3: (A) Beobachtetes Paarungsverhalten (Mittelwerte + SE) in Ansätzen mit haploiden (blaue Balken) bzw. diploiden Männchen (lila Balken) und (B) kumulativer Anteil an Männchen, die sich zu einem bestimmten Zeitpunkt nach dem ersten Kontakt mit einem virginen Weibchen verpaart hatten

Ob sich ein Männchen bereits mit dem ersten Weibchen verpaarte, oder erst mit der zweiten bzw. dritten Partnerin, hing nicht vom Ploidiegrad des Männchens ab ($\chi^2_{1;150}$=0,83; p=0,36; GLM poisson). Insgesamt erfolgten nur 22 Zwangsverpaarungen (14,7 %), die bei Männchen beider Ploidiegrade ($\chi^2_{1;150}$=2,01; p=0,16; GLM binomial) gleich häufig angewendet wurden.

Zur Ermittlung der Fertilität diploider Männchen wird nun der Nachwuchs (F_2) sämtlicher Männchen näher betrachtet. Unabhängig vom Ploidiegrad ihres Paarungspartners ($\chi^2_{1;140}$=1,26; p=0,26; GLM poisson) legten Weibchen im Mittel 39 ± 1 Eier, von denen sich 20 ± 1 Individuen (51,3 %) zu Adulten entwickelten. Die Entwicklungsmortalität unterschied sich dabei nicht zwischen den Nachkommen haploider und diploider Väter (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;140}$=1,89; p=0,17; GLM quasibinomial).

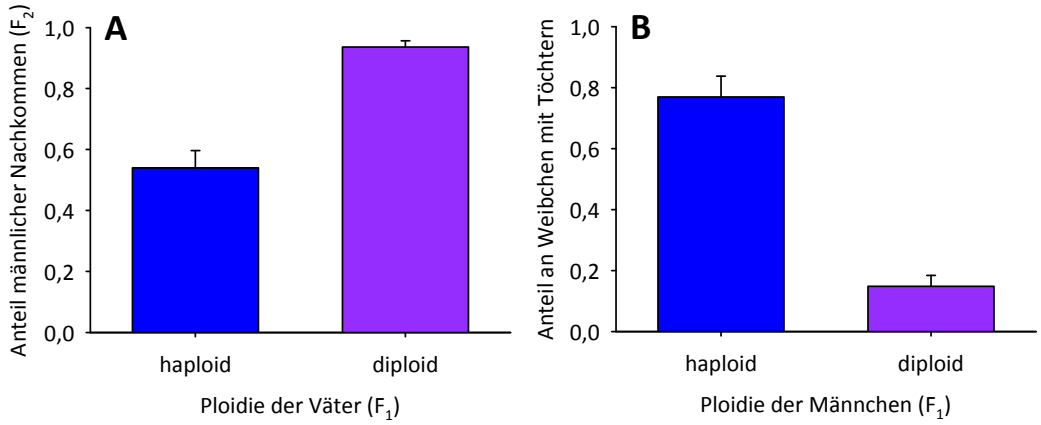

Abb. 4.4: (A) Geschlechterverhältnis der Nachkommen haploider und diploider Väter und (B) mittlerer Anteil (+ SE) fertiler *B. brevicornis* Männchen

Während das Geschlechterverhältnis der Nachkommen haploider Männchen nahezu ausgeglichen war (Abb. 4.4 A), brachten Weibchen, die sich mit einem diploiden Männchen verpaart hatten, fast ausschließlich Söhne hervor (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;140}$=61,34; p<0,001; GLM quasibinomial). Betrachtet man nur die Männchen, deren Fertilität eindeutig zugeordnet werden konnte (s. Kapitel 4.1.1), so zeigt sich, dass ein viel größerer Teil haploider Männchen in der Lage war Töchter zu zeugen als bei den diploiden (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;140}$=51,53; p<0,001; GLM quasibinomial). Erstaunlicherweise wurden sterile Männchen, die keine Töchter hervorbrachten, nicht häufiger zwangsverpaart als fertile (Fertilität: $\chi^2_{1;140}$=0,02; p=0,90; GLM binomial). Obwohl die meisten diploiden Männchen steril waren (Abb. 4.4 B), zeugten 14,9 % von ihnen eine oder sogar mehrere Töchter. Insgesamt brachten 15 diploide Männchen 72 Töchter hervor, von denen 68 (94,4 %) triploid und zwei diploid waren. Der Ploidiegrad von zwei Weibchen konnte nicht bestimmt werden.

4.1.4 Diskussion

Obwohl es eine Reihe von Arbeiten zur Lebensfähigkeit und Fertilität diploider Hymenopterenmännchen gibt (z.B. Heimpel & de Boer, 2008, Harpur *et al.*, 2012), ist bisher nur sehr wenig über das Verhalten der Weibchen gegenüber diploiden Paarungspartnern bekannt. Mit dieser Studie wurden das Paarungsverhalten diploider Männchen und die Reaktion ihrer nicht direkt verwandten Paarungspartnerinnen detailliert untersucht. Wie in einer Isofemale-Studie an der Braconidae *Cotesia vestalis* Haliday gezeigt (de Boer *et al.*, 2007b), unterschieden sich haploide und diploide *Bracon brevicornis* Männchen während der Paarungsversuche kaum in Häufigkeit und Dauer einzelner Verhaltensweisen. Auch wurden Männchen beider Ploidiegrade gleichermaßen als Paarungspartner akzeptiert, was gegen eine Diskriminierung der Weibchen gegenüber diploiden Brackwespenmännchen spricht. Die Fähigkeit, den Ploidiegrad eines Männchens erkennen zu können, wurde bisher nur für die Honigbiene *Apis mellifera* beschrieben, bei der sich haploide und diploide Drohnen im frühen Larvenstadium in der quantitativen Zusammensetzung ihrer Kohlenwasserstoffe voneinander unterscheiden (Herrmann *et al.*, 2005).

Früher schlüpfende *Hypoponera opacior* Forel (Hymenoptera: Formicidae) Männchen verpaaren sich häufiger als später schlüpfende (Kureck *et al.*, 2013a). Sollte dies auch auf andere Hymenopterenarten zutreffen, so könnten haploide *B. brevicornis* Männchen durch ihre kürzere Entwicklungszeit (Kapitel 4.3.1) möglicherweise eine größere Anzahl Weibchen begatten als diploide. Allerdings ist nicht bekannt, ob haploide Brackwespenmännchen im gleichen Alter wie ihre diploiden Brüder paarungswillig werden. So verpaaren sich diploide Männchen einiger

Arten früher als haploide (Harpur *et al.*, 2012). Auch geht ein früherer Schlupf nicht automatisch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit virginen Weibchen zu begegnen einher. Allerdings könnte ein verringertes Flugvermögen diploider Männchen (Borges *et al.*, 2012) deren Suchradius verkleinern und somit die Wahrscheinlichkeit Weibchen zu begegnen verringern.

Die Zeugung triploider Töchter lässt darauf schließen, dass einige diploide *B. brevicornis* Männchen, ähnlich wie in anderen Hymenopteren (Cournault & Aron, 2009, Krieger *et al.*, 1999, Naito & Suzuki, 1991), diploide Spermien produzieren konnten. Ob der hohe Anteil Söhne von einer fehlerhaften Produktion bzw. Übertragung von Spermien herrührt (Holloway *et al.*, 1999), nur ein Teil der Spermien die Eizellen befruchtete (MacBride, 1946, Holloway *et al.*, 1999) oder auch triploide Söhne gezeugt wurden (Ayabe *et al.*, 2004, Naito & Suzuki, 1991), ist unklar. Die stark reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit triploider Männchen gegenüber triploiden Weibchen (Cook, 1993, de Boer *et al.*, 2007b) spricht jedoch eher für die Produktion haploider Söhne, da sich der Nachwuchs diploider Väter genauso gut entwickelte wie der haploider (Kapitel 4.1.3). Das Anlegen eines genetisch diversen Spermienvorrats durch Mehrfach-verpaarungen (Yasui, 1998) könnte die Wahrscheinlichkeit einer Beschränkung auf haploide Söhne oder triploiden Nachwuchs verringern und helfen das Geschlechterverhältnis in einer Population auszugleichen. Dies trifft vor allem auf polygame Weibchen zu, die sich häufig in gregären Arten finden, während Weibchen solitärer Arten oft monogam sind (Ridley, 1993). Davon abweichend sollten monogame *B. brevicornis* Weibchen (Genieys, 1925) bei der Partnerwahl sehr wählerisch sein, um eine Übereinstimmungsverpaarung und die damit einhergehende Fitnesseinbuße durch die Beschränkung auf haploide Söhne und/oder triploide Nachkommen (Zhou *et al.*, 2007, Whitehorn *et al.*, 2009) zu vermeiden.

Mit dieser Studie konnte ich zeigen, dass diploide *B. brevicornis* Männchen normales Paarungsverhalten zeigen und problemlos als Paarungspartner akzeptiert werden. Dass nur ein kleiner Teil dieser Wespen in der Lage war, lebensfähigen Nachwuchs hervorzubringen, entspricht den Paarungsmisserfolgen anderer Hymenopterenarten (Harpur *et al.*, 2012). Das Auftreten lebensfähiger triploider Brackwespenweibchen wirft Fragen zu deren Fertilität und ihrer Akzeptanz als Paarungspartnerinnen haploider Männchen auf, die im nächsten Kapitel behandelt werden.

4.2 Triploide Weibchen

Die Wahrscheinlichkeit triploide Töchter zu zeugen sollte bei einer Übereinstimmungsverpaarung eines diploiden Männchens mit einem diploiden Weibchen genauso hoch sein wie die Zeugungswahrscheinlichkeit triploider Söhne (Cook, 1993). Das geringe Auftreten triploider Männchen im Vergleich zu triploiden Weibchen (Ayabe *et al.*, 2004, Naito & Suzuki, 1991) spricht jedoch für eine höhere Entwicklungsmortalität solcher Männchen. So ist es nicht verwunderlich, dass sich Studien an triploiden Hymenopteren bislang mit polyploiden Weibchen beschäftigen. Die wenigen Kenntnisse daraus beziehen sich meist auf die Produktion solcher Weibchen (Cournault & Aron, 2009, Darvill *et al.*, 2012, Liebert *et al.*, 2004) und in Einzelfällen auf deren Fertilität (de Boer *et al.*, 2007b, Ayabe *et al.*, 2004).

Ob das Verhalten triploider Weibchen, z.B. bei der Wirtssuche oder der Paarung, dem diploider entspricht, ist bisher weitestgehend unbekannt. Beispielsweise konnten triploide *Cotesia vestalis* Weibchen im Labor Wirte parasitieren, aus denen jedoch keine Nachkommen hervorgingen (de Boer *et al.*, 2007b). Nach bisherigen Erkenntnissen stellen triploide Weibchen eine genetische Sackgasse dar, da die Tiere der bisher getesteten Arten ausnahmslos steril sind (Harpur *et al.*, 2012). Die Begattung eines triploiden Weibchens hätte demnach keinen Fitnessgewinn für den Paarungspartner. Da sich Hymenopteren-Männchen oftmals mehrfach verpaaren (Boomsma *et al.*, 2005, Gordh & DeBach, 1978), könnten die Folgen einer solchen Partnerwahl durch die Begattung weiterer diploider Weibchen minimiert werden.

Nachdem in *B. brevicornis* unter Inzuchtbedingungen lebensfähige triploide Weibchen produziert werden (Kapitel 4.1.3) war das Ziel dieses Teils der Arbeit zu klären, ob triploide Weibchen 1) Eier legen können, 2) von haploiden Männchen erkannt und als Paarungspartner vermieden werden und 3) lebensfähigen Nachwuchs hervorbringen können.

4.2.1 Material und Methoden

Um die Fertilität triploider *B. brevicornis* Weibchen (BB1) und deren Akzeptanz als Paarungspartner zu untersuchen, wurden alle weiblichen Nachkommen (F_2) von diploiden Vätern verwendet. Als Kontrollgruppe dienten Töchter haploider Männchen, bei denen ich davon ausgehen konnte, dass es sich um diploide Weibchen handelte. Die insgesamt 150 verwendeten Nachkommen haploider und diploider Männchen wurden nach dem Schlupf nach Vater und Geschlecht separiert und bis zum nächsten Morgen unter Zuchtbedingungen inkubiert. Jede virgine Tochter (F_2) durfte zunächst sukzessive fünf Wirte parasitieren. Parasitierte Wirte wurden innerhalb von 24 Std kontrolliert und die vorhandenen Eier gezählt.

Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob triploide Weibchen überhaupt Eier produzieren können.

Um die Akzeptanz triploider Weibchen als Paarungspartner zu klären, wurden die nun wirtserfahrenen Wespen in Paarungsversuchen verwendet. Hierfür diente jeweils ein nicht direkt verwandtes haploides Männchen als Paarungspartner. Die Beobachtung verlief ähnlich wie die der diploiden Männchen (Kapitel 4.1.1), wobei der Fokus diesmal auf dem Weibchen lag und ich nur das Verhalten für den ersten Paarungsversuch codierte. Wurde der angebotene Paarungspartner abgewiesen, so hatte das Weibchen zunächst die Chance sich freiwillig mit einem andern Männchen zu verpaaren, bevor es mit diesem zwangsverpaart wurde. Von 129 Weibchen, die in Paarungsversuchen verwendet wurden, konnten 126 Aufzeichnungen für die statistische Analyse verwendet werden.

Während der folgenden Tage durfte jedes Weibchen erneut fünf Wirte parasitieren. Die in Kapitel 4.1.1 genannten Parameter und die Anzahl der Puppen wurden für die Gelege der virginen und der verpaarten Weibchen getrennt erhoben bzw. berechnet und daraus ein kumulativer Datensatz erstellt. Weibchen, die vor Versuchsende verstarben, wurden innerhalb von 15 Std zur späteren Bestimmung des Ploidiegrades separat in je einem 250 µl Mikroreaktionsgefäß eingefroren. Abschließend wurde für alle Weibchen mit einem diploiden Vater und für die Nachkommen triploider Mütter der Ploidiegrad bestimmt (Kapitel 4.1.1). Ein Weibchen wurde als triploid (3N) gewertet, wenn der Peak zwischen dem 2N- und dem 4N-Peak eines diploiden Weibchens lag (Abb. 4.2 D). Bei zwei von insgesamt 79 gemessenen Tieren konnte der Ploidiegrad nicht bestimmt werden.

4.2.2 Statistische Analyse

Für die statistischen Analysen wurden die in Kapitel 4.1.2 erwähnten Programme verwendet. Auch die angewendeten Methoden entsprachen weitestgehend den dort beschriebenen Modellen.

Ob der Ploidiegrad einen Effekt auf die Entwicklungszeit vom Ei zur Imago oder die Entwicklungsmortalität hatte untersuchte ich mit GLMs. Zur Analyse des Paarungsverhaltens verwendete ich GLMs, in denen der **Ploidiegrad** des Weibchens als erklärende Variable diente. Die zu testenden Variablen waren binär und beinhalteten, ob eine bestimmte Verhaltensweise (Flügelflattern, Besteigungsversuch, Kopulation) beobachtet werden konnte. Zusätzlich testete ich, ob es in der Anzahl der gezeigten Verhaltensweisen durch den Ploidiegrad bedingte Effekte gab, wofür ein Zero-inflated Modell angewendet wurde. Ein möglicher Unterschied in der Dauer einzelner Verhaltensweisen zwischen Beobachtungen mit diploiden Weibchen zu solchen mit

triploiden wurde mit GLMs getestet. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Zeit, die Wespen bis zur Entscheidung zur Verpaarung benötigten, wurde mit Hilfe einer Cox-Regression untersucht (für Details siehe Kapitel 2.2.2). Ob der Ploidiegrad einen Effekt auf die Entwicklungszeit vom Ei zur Imago, die Akzeptanz des ersten Paarungspartners oder die Notwendigkeit einer Zwangsverpaarung hatte analysierte ich mit GLMs.

Die Auswertung der Daten zur Fertilität der Weibchen gestaltete sich etwas komplizierter. Ein vergleichender t-Test zwischen dem Datensatz virginer Weibchen und dem verpaarter Weibchen gab Aufschluss darüber, ob ich beide Datensätze für eine bestimmte Variable getrennt auswerten musste oder einen kumulativen Datensatz verwenden konnte. Letztendlich konnten die meisten Analysen mit einem kombinierten Datensatz durchgeführt werden. Der **Ploidiegrad** des Muttertieres diente in allen Modellen als erklärende Variable. Um für etwaige Effekte durch vorzeitig verstorbene Weibchen zu korrigieren, integrierte ich die Variable „**tote Mutter**“ als Zufallsfaktor (random factor) in die verwendeten LMMs und GLMMs. Die kumulativen Zähldaten der Puppen und Adulten wertete ich aufgrund der vielen Nullen mit ZIMs aus. In diesen Modellen konnte kein Zufallsfaktor integriert werden, so dass „**tote Mutter**“ als erklärende Variable verwendet werden musste. Aufgrund der geringen Anzahl an Nachkommen triploider Weibchen wurde das Geschlechterverhältnis vom Nachwuchs nur deskriptiv beschrieben.

4.2.3 Ergebnisse

Je nach Ploidiegrad ($\chi^2_{1;150}$=47,92; p<0,001; GLM Gamma) dauerte die Entwicklung der Weibchen vom Ei bis zum Adulten im Mittel 12,5 ± 0,1 d (diploid) bzw. 13,4 ± 0,1 d (triploid). Rein optisch unterschieden sich die beiden Typen von Weibchen nicht in der Größe. Jedoch traten zwei Weibchen mit stark deformierten Flügeln auf (Abb. 4.5), deren Ploidiegrad sich später als triploid herausstellte. Ob diese Verformung durch den erhöhten Ploidiegrad oder durch andere Faktoren hervorgerufen wurde, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Vor Versuchsende wurden insgesamt 28 von 150 Weibchen (18,7 %) tot aufgefunden. Triploide Weibchen hatten ein höheres Mortalitätsrisiko (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;150}$=12,08; p<0,001; GLM binomial) als diploide.

Abb. 4.5: *Bracon brevicornis* Weibchen mit stark deformierten Flügeln. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 1 mm. ® Linek

Während in über 80 % der Versuche Balzverhalten und Besteigungsversuche beobachtet werden konnten, kopulierten etwa 63 % der Weibchen (Abb. 4.6 A). Der Anteil an Versuchen mit triploiden Weibchen, in denen Flügelflattern (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;126}$=0,32; p=0,57; GLM binomial), Besteigungsversuche (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;126}$=0,05; p=0,82; GLM binomial) oder Kopulationen (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;126}$=0,34; p=0,56; GLM binomial) beobachtet werden konnten, unterschied sich nicht von dem in Versuchen mit diploiden Weibchen. In der Intensität ihres Balzverhaltens, durchschnittlich 7 ± 1 Flügelflattereinheiten, unterschieden die Männchen nicht zwischen diploiden und triploiden Weibchen (Ploidiegrad im Zählmodell: $\chi^2_{4;126}$=0,41; p=0,52; Ploidiegrad im logistischen Modell: $\chi^2_{4;126}$<0,001; p=0,99; ZIM negativ binomial). Auch kopulierten die Männchen gleich lange mit diploiden und triploiden Weibchen (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;126}$=0,003; p=0,96; GLM Gamma), wobei eine Kopulation im Mittel 11,5 ± 0,4 s dauerte.

Am Ende der Beobachtungszeit waren 79 von 126 Weibchen (62,7 %) verpaart, von denen 48 diploid und 31 triploid waren. Der Ploidiegrad der Weibchen (β=-0,048; Exp(B)=1,05; $Wald_{1;126}$=0,04; p=0,84; Cox-Regression) hatte keinen Einfluss auf deren Paarungslatenz. Das heißt, der zeitliche Verlauf zwischen dem ersten Kontakt und der Paarung bzw. dem Beobachtungsende gestaltete sich in beiden Behandlungen recht ähnlich (Abb. 4.6 B).

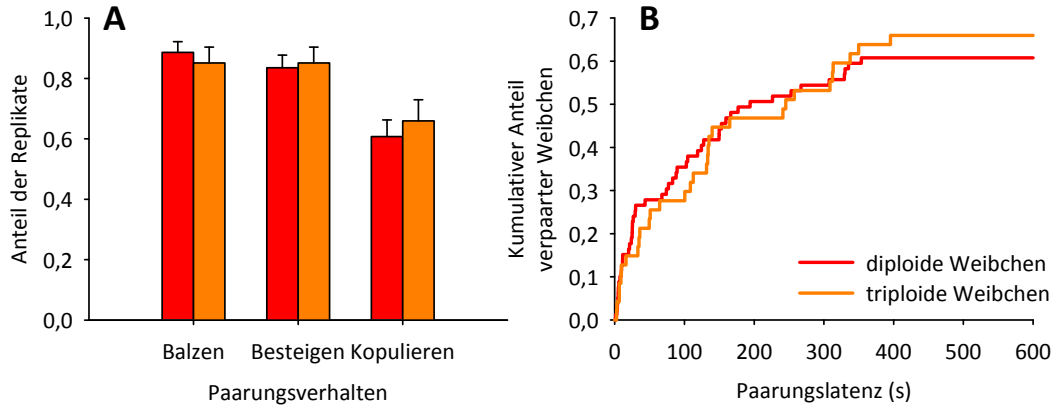

Abb. 4.6: (A) Beobachtetes Paarungsverhalten (Mittelwerte + SE) in Ansätzen mit diploiden (rote Balken) bzw. triploiden Weibchen (orange Balken) und (B) kumulativer Anteil an Weibchen, die sich zu einem bestimmten Zeitpunkt nach dem ersten Kontakt mit einem Männchen verpaart hatten

Unabhängig vom Ploidiegrad ($\chi^2_{1;130}$=1,77; p=0,18; GLM normal) verpaarten sich 86 von 130 Weibchen (66 %) mit dem ersten Männchen. Insgesamt erfolgten jedoch 25 Zwangsverpaarungen (19 %), die in beiden Behandlungen gleich häufig angewendet wurden (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;130}$=1,48; p=0,22; GLM binomial).

Tab. 4.1: Deskriptive Statistik aller Nachkommen diploider und triploider Weibchen

Ploidiegrad				**Söhne**[b]		**Töchter**[b]	
der Mütter	**Eier**[a]	**Puppen**[a]	**Nachwuchs**[a]	**haploid**	**diploid**	**diploid**	**triploid**
diploid	89 ± 3	56 ± 2	31 ± 2	79,5 %	0,0 %	20,5 %	0,0 %
triploid	52 ± 4	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	14,3 %	14,3 %	42,9 %	28,5 %

[a] mittlerer Anzahl ± SE
[b] kumulativer Anteil der Nachkommen aller Weibchen

Die Betrachtung des Nachwuchses (F_3) triploider Weibchen sollte Aufschluss über deren Fertilität geben (Tab. 4.1). Bereits virgine triploide Wespen waren in der Lage Eier zu legen. Abhängig vom Paarungsstatus ($t_{265;0,975}$=-7,20; p<0,001; paired t-Test) legten virgine Weibchen im Schnitt weniger Eier (33 ± 1) als verpaarte Weibchen (47 ± 2). Insgesamt produzierten diploide Weibchen jedoch nicht nur mehr Eier (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;150}$=200,99; p<0,001; LMM poisson), sondern brachten auch sehr viel mehr Puppen (Ploidiegrad im Zählmodell: $\chi^2_{5;150}$=328,94; p<0,001; ZIM negativ binomial) und adulte Nachkommen (Ploidiegrad im Zählmodell: $\chi^2_{5;150}$=221,91; p<0,001; ZIM negativ binomial) hervor als triploide (Tab. 4.1). Wobei frühzeitig verstorbene Weibchen weniger Puppen (tote Mutter im Zählmodell: $\chi^2_{5;150}$=47,43; p<0,001; tote Mutter im logistischen Modell: $\chi^2_{1;150}$=29,61; p<0,001; ZIM negativ binomial) und Nachkommen (tote Mutter im Zählmodell: $\chi^2_{5;150}$=221,91; p<0,001; tote Mutter im logistischen Modell: $\chi^2_{1;150}$=6,69; p<0,001; ZIM negativ binomial) hatten als solche, die bis zum Versuchsende Eier legen konnten. Die Nachkommen triploider Mütter hatten eine höhere Wahrscheinlichkeit

während der Entwicklung vom Ei zur Puppe zu sterben (Abb. 4.7 A) als jene diploider Mütter (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;150}$=539,09; p<0,001; GLMM binomial). Entfernt man alle Weibchen, die vor Versuchsende verstarben, aus dem Datensatz und führt die Analysen zur Fertilität triploider Weibchen erneut durch, so bleiben die oben aufgeführten Signifikanzen unverändert.

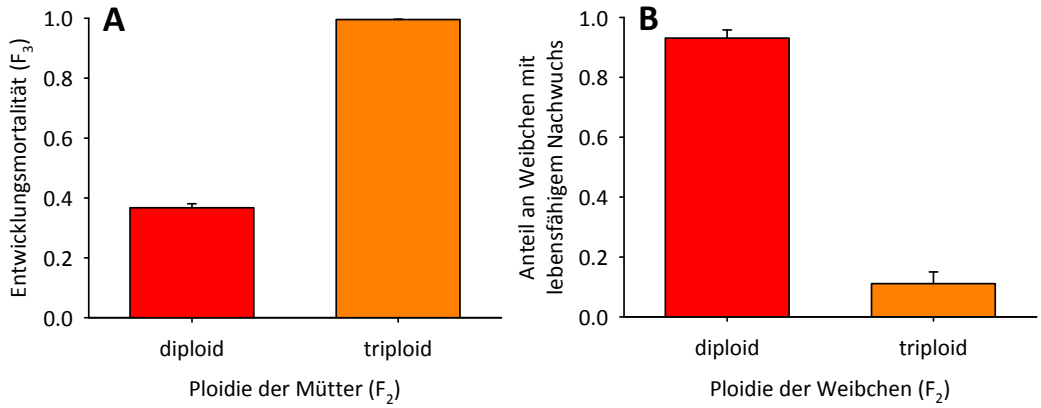

Abb. 4.7: (A) Wahrscheinlichkeit, dass Nachkommen diploider und triploider Mütter während der Entwicklung vom Ei zur Puppe zu sterben und (B) mittlere Anteil (+ SE) fertiler *B. brevicornis* Weibchen

Obwohl die Fertilität triploider Weibchen stark verringert war (Ploidiegrad: $\chi^2_{1;150}$=15,38; p<0,001; GLM binomial; Abb. 4.7 B), gelang es sieben von 63 Tieren (11,1 %) jeweils einen lebensfähigen Nachkommen hervorzubringen. Darunter fanden sich sowohl ein haploider und ein diploider Sohn als auch drei diploide und zwei triploide Töchter, wobei nur der haploide Sohn von einer virginen Mutter stammte. Vergleicht man den adulten Nachwuchs verpaarter Weibchen, so wird deutlich, dass das Geschlechterverhältnis der Nachkommen diploider Müttern mit 47,4 ± 4,6 % Männchen nahezu ausgeglichen ist, während die wenigen triploiden Weibchen, die überhaupt Nachwuchs produzierten, hauptsächlich Töchter hervorbrachten (15,8 ± 12,2 % Männchen).

4.2.4 Diskussion

Mit dieser Studie wurde zum ersten Mal das Paarungsverhalten triploider Weibchen und die Reaktion ihrer Paarungspartner detailliert untersucht. In einer Isofemale-Studie von de Boer et al. (2007b) an *Cotesia vestalis* kann nur bedingt von der Verpaarung triploider Weibchen ausgegangen werden, da weder eine Beobachtung der Paarungen erfolgte noch die Spermatheken auf die Präsenz von Sperma untersucht wurden.

Triploide *Bracon brevicornis* Weibchen verhielten sich gegenüber Männchen nicht anders als diploide. Weibchen beider Ploidiegrade wurden gleichermaßen von haploiden Männchen

umworben und begattet, was gegen eine Diskriminierung triploider Weibchen als Paarungspartner spricht.

Frühzeitig verstorbene und zum Teil verkrüppelte triploide *B. brevicornis* Weibchen sprechen für Cooks (1993) Annahme einer höheren Mortalität solcher Weibchen im Vergleich zu ihren diploiden Schwestern. Verbunden mit ihrer kürzeren Entwicklungszeit könnten diploide Weibchen nicht nur früher mit der Wirtssuche anfangen, sondern hätten durch ihr längeres Leben auch die Möglichkeit potentiell mehr Wirte zu parasitieren als triploide Wespen. Wie in *Cotesia vestalis* (de Boer *et al.*, 2007b) waren triploide *B. brevicornis* Weibchen in der Lage Wirte anzustechen und Gift zu injizieren. Dass verpaarte Brackwespen-Weibchen mehr Eier legten als virgine, erklärt sich durch die vorherigen Wirtserfahrungen und der damit verbundenen Nahrungsaufnahme am Wirt, wodurch die Eiproduktion anregt wird (Giron *et al.*, 2004, Jervis *et al.*, 2008, Godfray, 1994). Jedoch spricht die hohe Eimortalität beim Nachwuchs triploider Weibchen für die Produktion nicht lebensfähiger Aneuploide, Eier mit zusätzlichen oder fehlenden Chromosomen (Chandra, 1962, Naito & Suzuki, 1991). Dies stimmt mit bisherigen Funden überein (de Boer *et al.*, 2007b, Ayabe *et al.*, 2004, Naito & Suzuki, 1991). Im Widerspruch zum bisherigen Stand der Wissenschaft (Harpur *et al.*, 2012) zeigt das Auftreten einiger haploider und diploider Söhne bzw. diploider und triploider Töchter, dass nicht alle triploiden *B. brevicornis* Weibchen vollständig steril waren. Ob deren polyploider Nachwuchs jedoch von einem oder von zwei Elternteilen hervorgebracht wurde, kann mittels Durchflusszytometrie nicht ermittelt werden. Unter den Hymenopteren mit CSD bleibt die Produktion triploider Nachkommen weiterhin eine Ausnahme (Harpur *et al.*, 2012).

Mit dieser Studie konnte ich zeigen, dass triploide Weibchen bei *B. brevicornis* normales Paarungsverhalten zeigen und problemlos als Paarungspartner akzeptiert werden. Dass nur ein kleiner Teil dieser Wespen in der Lage war, lebensfähigen Nachwuchs hervorzubringen, entspricht den Paarungsmisserfolgen anderer Hymenopterenarten (Harpur *et al.*, 2012). Interessant wäre zu wissen, ob der lebensfähige Nachwuchs triploider Weibchen normales Verhalten zeigt und ob diese Individuen selbst Nachkommen hervorbringen können.

4.3 Fazit

Auch wenn für *Bracon brevicornis* diploide Männchen und triploide Weibchen im Labor gefunden werden konnten, so ist zu diesem Zeitpunkt nicht klar, in wieweit diese Ergebnisse auf Freilandpopulationen übertragbar sind. Bisher wurden für eine Reihe von Hymenopterenarten mit CSD diploide Männchen (Adams *et al.*, 1977, Owen & Packer, 1994, Ross *et al.*, 1993, Francini *et al.*, 2012, Fujiwara *et al.*, 2004, Whidden & Owen, 2011, Antolin *et al.*, 2003) und zum Teil

sogar triploide Weibchen (Cournault & Aron, 2009, Darvill *et al.*, 2012, Takahashi *et al.*, 2008) im Feld beschrieben. Die Einstufung der Schwere einer vorliegenden Inzuchtproblematik in Wildpopulationen könnten durch triploide Weibchen erschwert werden, wenn z.B. nur das Geschlechterverhältnis und die Produktion diploider Männchen im Fokus stehen. Auch sind nicht immer polyploide Individuen beider Geschlechter anzutreffen. So müssen bei einer Studie an zwei Hummelarten diploide Männchen produziert worden sein, obwohl im Feld nur triploide Weibchen nachgewiesen werden konnten (Darvill *et al.*, 2012).

Mit dieser Studie konnte ich zeigen, dass diploide Männchen und triploide Weibchen der Art *B. brevicornis* normales Paarungsverhalten zeigen und problemlos als Paarungspartner akzeptiert werden. Ob sich haploide und diploide Männchen im Feld gleich erfolgreich reproduzieren und welches Paarungssystem diese Brackwespe nutzt, ist bisher nicht bekannt. Einer Simulation von Hein et al. (2009) zufolge erhöht eine fehlende Diskriminierung gegen polyploide und meist sterile Paarungspartner in solitären Hymenopteren die Aussterbewahrscheinlichkeit kleiner und stark ingezüchteter Populationen. Für ingezüchtete *B. brevicornis* Populationen wäre das Risiko auszusterben demnach höher als bisher angenommen (Kapitel 3). Eine Verminderung dieses Risikos wäre vor allem gegeben, wenn die Produktion diploider Männchen verhindert oder zumindest weitestgehend reduziert werden könnte. Hierfür würden sich vor allem Reproduktionsstrategien eignen, mit denen die Wahrscheinlichkeit von Geschwisterverpaarungen so gering wie möglich gehalten werden kann (Gu & Dorn, 2003, Ode *et al.*, 1995, van Wilgenburg *et al.*, 2006). Ob es bei *B. brevicornis* Mechanismen gibt, durch die die Produktion diploider Männchen von vornherein minimiert oder sogar verhindert werden könnte, soll im nächsten Kapitel näher betrachtet werden.

5. Strategien zur Vermeidung von Geschwisterverpaarungen

Betrachtet man Hymenopteren mit CSD, so besteht vor allem bei gregären Arten ein erhöhtes Risiko, nach dem Schlupf auf Geschwister zu treffen und sich mit ihnen zu verpaaren. Einige Parasitoidenarten haben dieses Problem gelöst, indem sie eingeschlechtliche Gelege produzieren und eine Geschwisterverpaarung am Schlupfort demnach sehr unwahrscheinlich ist (Elzinga *et al.*, 2007, West *et al.*, 1999). Bei gemischten Gelegen könnte das Antreffen von Geschwistern auf dem natalen Patch durch unterschiedlich lange Entwicklungszeiten von Männchen und Weibchen (King, 1988) vermieden werden. Eine asynchrone Entwicklungszeit nützt jedoch nichts, wenn das früher schlüpfende Geschlecht am Schlupfort verweilt und auf seine Geschwister wartet. Dieses Problem träte nicht auf, wenn frisch geschlüpfte Tiere den natalen Patch direkt verlassen (Gu & Dorn, 2003, Ruf *et al.*, 2011). Zusätzlich würde eine Paarungslatenz für eine bestimmte Zeit nach dem Schlupf in einem oder beiden Geschlechtern die Wahrscheinlichkeit den Schlupfort virgin zu verlassen erhöhen (Ode *et al.*, 1995). Allerdings kann die Möglichkeit, zu einem späteren Zeitpunkt auf nahverwandte Artgenossen zu treffen nicht ausgeschlossen werden. In diesem Fall wäre es von Vorteil Geschwister anhand bestimmter Signale erkennen und Inzucht dadurch vermeiden zu können (Liebert & Starks, 2004, van Zweden *et al.*, 2009, Metzger *et al.*, 2010). Diese können entweder umweltspezifisch (extrinsich) sein, z.B. der Nestgeruch bei der Rossameise *Camponotus aethiops* Latreille (Hymenoptera: Formicidae) (van Zweden *et al.*, 2009), oder Genotyp spezifisch (intrinsisch), z.B. der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*: MHC) beim dreistachligen Stichling *Gasterosteus aculeatus* Linneaus (Perciformes: Gasteroisteidea) (Reusch *et al.*, 2001). Bei der Hausmaus *Mus musculus* Linneaus (Rodentia: Muridae) deuten Übereinstimmungen der MHC-Zusammensetzungen zweier Organismen auf einen sehr ähnlichen Genpool hin (Penn & Potts, 1999). Da Weibchen mehr Ressourcen in die Eiproduktion investieren und somit eine niedrigere Produktionsrate an Geschlechtsprodukten haben als Männchen (Baylis, 1981, Baylis, 1978), sollten Hymenopteren-Weichen bei der Partnerwahl in der Regel das wählerischere Geschlecht sein und Verhaltensmechanismen entwickelt haben, um Inzuchtverpaarungen zu vermeiden.

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass *Bracon brevicornis* durch die Produktion annähernd steriler diploider Männchen (Kapitel 4) sehr stark unter den Auswirkungen von Inzucht leidet (Kapitel 3). Demnach sollte es bei dieser Art einen selektiven Vorteil darstellen, Inzuchtvermeidungsstrategien evolviert zu haben und in diese zu investieren, um die Produktion diploider Männchen von vornherein vermeiden oder zumindest weitestgehend reduzieren zu können. Bisher ist bekannt, dass sich in *B. brevicornis* beide Geschlechter synchron entwickeln

(Weeda, 2008). Darauf aufbauend werden in diesem Kapitel drei potentiell verwendete Inzuchtvermeidungsstrategien behandelt und eine Kombination der gefundenen Strategien in Bezug auf Inzuchtvermeidung diskutiert.

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Postnatale Verbreitung

Bisher war noch unbekannt, ob frisch geschlüpfte *B. brevicornis* Wespen an ihrem Schlupfort verweilen oder diesen, z.B. auf der Suche nach einer Ressource, direkt verlassen. Um das Abwanderungsverhalten zu untersuchen, wurden mit frisch geschlüpften Wespen des BB1-Stammes (Kapitel 2.1.2) Verhaltensversuche durchgeführt. Die Versuchseinheit bestand aus einem Polystyrol-Zylinder (ø = 11,5 cm, h = 21 cm), der durch eine nach oben offene Reuse aus Filterpapier unterteilt war (Abb. 5.1). Im unteren Teil der Arena wurden zwei Döschen eingesetzt, von denen das Eine mit etwas Agar und dem Versuchstier bestückt war und das Andere je nach Behandlung eines der folgenden Dinge enthielt:

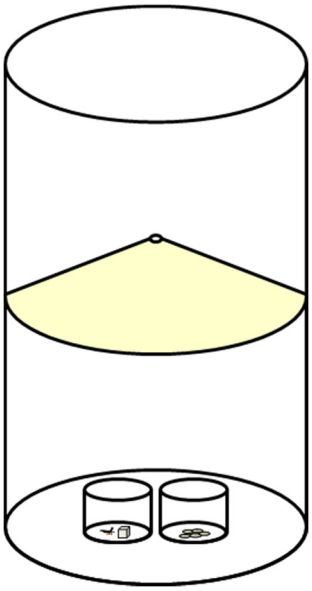

Abb. 5.1: Versuchseinheit (ø = 11,5 cm), deren unterer Teil, die Arena, durch eine Reuse abgetrennt ist. Im linken Döschen befindet sich eine maßstabsgetreue Wespe und ein Stück Agar. Das rechte Döschen enthält die Behandlung, in diesem Fall Kokons.

Kontrolle	Luft
Futter	1 Tropfen Honig
Wirt	1 paralysierte *Ephestia kuehniella* Larve (L5-L6) ohne Eier, die seit maximal 24 Std gelähmt war
Kokons	1 jüngeres Gelege eines anderen Muttertieres, in dem sich gerade erst Kokons gebildet haben
Junges Männchen	1 frisch geschlüpftes virgines Männchen
Junges Weibchen	1 frisch geschlüpftes virgines Weibchen
Altes Weibchen	1 mindestens 48 Std altes virgines Weibchen

Die Döschen, in denen sich eine zweite Wespe befand, wurden mit Gaze verschlossen, so dass sich die Tiere sehen und riechen konnten, aber keinen direkten Kontakt miteinander hatten. Auf diese Weise sollte verhindert werden, dass das Nicht-Fokustier in den oberen Teil des Zylinders gelangte. Die Döschen der anderen Behandlungen waren der Wespe frei zugänglich. Die Beobachtung begann direkt nach dem Einsetzen des frisch geschlüpften Fokustieres und wurde

entweder nach dessen Erscheinen oberhalb der Reuse beendet, und die Wespe als abgewandert gewertet, oder nach 72 Std abgebrochen. Um bis zu neun Versuchstiere gleichzeitig testen zu können, wurde über den Zylindern eine Videokamera (Sony Handycam DCR-HC17E) auf einem Stativ angebracht und mit einem Computer verbunden. Mit Hilfe der Software *Adobe® Premiere® Elements 9* (Adobe Systems Incorporated, USA) konnte so einmal pro Minute ein Standbild aufgenommen werden, das zur exakten Bestimmung der Aufenthaltszeit in der Arena diente.

Während der Aufzeichnungen war jede Behandlung mindestens einmal vertreten und es wurde versucht das Geschlechterverhältnis so ausgeglichen wie möglich zu halten. Aufgrund der langen Beobachtungszeit besetzte ich frei gewordene Plätze so schnell wie möglich mit einem neuen Ansatz. Die Versuche wurden unter Langtagbedingungen durchgeführt und die Lichtphase mit dem Klimaschrank, in dem die Versuchstiere gezüchtet wurden, synchronisiert. Zusätzlich brannte durchgehend eine Rotlichtlampe. Da Hymenopteren bis auf wenige Ausnahmen nicht in der Lage sind Rottöne ($\lambda > 600$ nm) wahrzunehmen (Peitsch *et al.*, 1992), sollte auf diese Weise eine nächtliche Beobachtung der Zylinder gewährleistet werden, ohne die Versuchstiere zu stören. Leider war die Auflösung nachts zu schlecht als dass diese Bilder für die Auswertung genutzt werden konnten. Darüber hinaus gab es Probleme mit einer kontinuierlichen Aufzeichnung und es kam nachts regelmäßig zu unbeobachteten Versuchs-zeiten. Um Wespen, die in diesem Zeitraum abwanderten, nicht verwerfen zu müssen wurde deren Aufenthaltszeit in der Arena (T_A) aus der Summe der beobachtete Zeit (T_B) und der Hälfte der unbeobachtete Zeit (T_U) gebildet. Zum Beispiel wurde ein Tier am 03. Juni um 11:18 Uhr eingesetzt und am 05. Juni um 9:30 Uhr im oberen Teil des Zylinders aufgefunden. Da das letzte verfügbare Standbild jedoch am 04. Juni um 23:24 Uhr aufgezeichnet wurde, folgt daraus:

$$T_A = T_B + \frac{T_U}{2} = 2166\,\text{min} + \frac{606\,\text{min}}{2} = 2469\,\text{min} = 41\,\text{Std}\,9\,\text{min}$$

Von 338 Tieren schloss ich 13 von der statistischen Analyse aus, da diese entweder vor Versuchsende verstarben, direkt nach dem Einsetzen die Reuse ohne vorherigen Kontakt mit der Behandlung passierten oder aus dem Zylinder entkamen.

5.1.2 Altersbedingte Paarungsbereitschaft

Die Paarungswilligkeit der Weibchen kann durch physiologische und umweltbedingte Faktoren beeinflusst werden (Teuschl & Blanckenhorn, 2007, Godfray, 1994). So wurden balzende *Stenotus rubrovittatus* Fabricius (Hemiptera: Miridae) Männchen erst als Paarungspartner

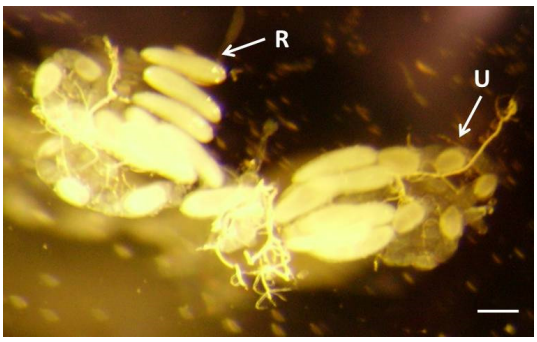

Abb. 5.2: Herauspräparierte Ovarien eines maximal 24 Std alten *Bracon brevicornis* Weibchens. Die Pfeile markieren ein reifes (R) und ein unreifes (U) Ei. Der Maßstabsbalken entspricht 226 µm.

akzeptiert, nachdem die Oogenese der Weibchen eingesetzt hatte (Oku *et al.*, 2010). Um herauszufinden, ob *B. brevicornis* Weibchen bereits nach dem Schlupf reife Eier besitzen oder diese erst noch heranreifen müssen, fror ich je fünf wirtsnaive Weibchen (BB1) 1 bzw. 24 Std nach dem Schlupf und fünf wirtserfahrene Tiere im Alter von 4 Tagen ein. Die gefrorenen Weibchen wurden zu einem späteren Zeitpunkt unter einem Binokular (40 fache Vergrößerung) in je einem Tropfen Insekten-Ringer (7,5 g NaCl; 0,35 g KCl; 0,21 g CaCl2; 1 l H2O; pH 7; Ephrussi & Beadle, 1936) auf einem Objektträger seziert. Hierbei wurden die Ovarien freigelegt und die darin enthaltenen Eier gezählt. Da die in den Versuchen der vorherigen Kapitel gezählten Eier länglich waren, wurden ovale Eier als reif deklariert, während rundliche Eier als unreif zählten (Abb. 5.2).

Zur Bestimmung einer eventuell vorhandenen postnatalen Paarungslatenz von *B. brevicornis* wurden frisch geschlüpfte Wespen (BB1) separat in Röhrchen mit Futter und Agar inkubiert. Ähnlich wie von Ode et al. (1995) beschrieben, wurde jedes Weibchen an einem zufällig ausgewählten Zeitpunkt nach dem Schlupf (10 min oder 1, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 72 bzw. 96 Std) auf dessen Bereitschaft sich zu verpaaren getestet. An jedem Versuchstag wurde eine Mischung aus jungen, alten und mittelalten Versuchstieren verwendet.

Jedem Weibchen wurde ein nicht direkt verwandtes Männchen als Paarungspartner angeboten. Auch wenn die Samenbläschen der nahverwandte Art *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) bereits direkt nach dem Schlupf mit Spermien gefüllt sind (Gerling & Rotary, 1973), ist bisher noch nichts über die Spermatogenese bei *B. brevicornis* bekannt. Um sicher zu stellen, dass die von uns verwendeten Männchen reife Spermien besaßen und paarungswillig waren, benutzten wir mindestens 24 Std alte virgine männliche Tiere in den Paarungsversuchen. Jedes Pärchen wurde in einer frischen Petrischale getestet und die paarungsrelevanten Verhaltensweisen (Tab. 2.1) aufgezeichnet (für Details siehe Kapitel 2.2.1).

Am Folgetag setzte ich jedes verpaarte Weibchen für 24 Std in ein Döschen mit zwei Wirten. Ab der Verpuppung der Parasitoidenlarven kontrollierte ich die Döschen täglich und bestimmte das Geschlecht der neu geschlüpften Wespen. Erhielt ich Töchter, so konnte davon ausgegangen werden, dass bei der Kopulation Sperma übertragen und zur Befruchtung der Eier genutzt wurde.

Einen Teil der Weibchen (89 von 245) testete ich selbst, während die restlichen Datenpunkte von Mingming Zhu (Masterstudentin des Studiengangs Ecology, Universität Bremen) im Rahmen ihres Masterprojektes erhoben wurden. Insgesamt schloss ich 25 Weibchen von der statistischen Analyse aus: 22 Paarungspartner zeigten kein Balzverhalten, für zwei Weibchen liegen keine Verhaltensaufzeichnungen vor und ein Tier musste aufgrund fehlerhafter Zeitkodierung aus dem Datensatz entfernt werden.

Die Experimente zur Bestimmung der postnatalen Paarungslatenz von Männchen entsprachen weitestgehend denen der Weibchen. Jedoch beschränkte ich das maximale Testalter der Männchen auf 72 Std, da die altersbedingte Paarungsunwilligkeit bei Männchen oft kürzer ist als bei Weibchen (Ode *et al.*, 1995, Mazzi *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde eine gröbere zeitliche Auflösung verwendet, in der die Altersstufen 32, 40 und 56 Std nicht vorkamen. Das Alter der weiblichen Paarungspartner betrug aufgrund der vorherigen Versuchsreihe 48 - 72 Std. Insgesamt testete ich 93 Männchen.

5.1.3 Geschwistererkennung

Um herauszufinden ob *B. brevicornis* Weibchen ihre Brüder erkennen und diese als Paarungspartner meiden, mussten zunächst Geschwister in speziellen Ansätzen produziert werden. Hierfür durften verpaarte Weibchen aus der Zucht je zwei Wirte im letzten Larvenstadium 24 Std lang parasitieren. Aus den erhaltenen Gelegen wurden analog zu den von Ode et al. (1995) durchgeführten Versuchen vier verschiedene Ansatztypen konzipiert:

A) Geschwister, die sich auf dem gleichen Wirt entwickelten (GG)
B) Geschwister, die sich auf unterschiedlichen Wirten entwickelten (GU)
C) Nicht direkt verwandte Wespen, die sich auf dem gleichen Wirt entwickelten (NG)
D) Nicht direkt verwandte Wespen, die sich auf unterschiedlichen Wirten entwickelten (NU)

Parasitierte Wirte wurden zunächst einzeln auf Döschen verteilt und die Eier mit einem sehr feinen Pinsel (000) unter einem Binokular umgesetzt. Jedes Gelege bestand aus vier bis sechs Eiern, um trotz einer durch die Behandlung verursachten Mortalität noch genug Versuchstiere zu erhalten. Auch die Eier aus den Ansätze A und D durchliefen die gleiche Prozedur, um einen eventuellen Effekt des Pinsels auf die Partnerwahl zu vermeiden. Im Ansatz C stammte jedes Ei von einer unterschiedlichen Mutter, um eine direkte Verwandtschaft ausschließen zu können. Die Versuchstiere wurden kurz nach dem Schlupf nach Ansatz, Geschlecht und Schlupftag getrennt und in Röhrchen mit Futter und Agar inkubiert.

Für die Paarungsversuche wurde ein Mindestalter von 24 Std (Männchen) bzw. 48 Std (Weibchen) festgesetzt, um das Vorhandensein reifer Geschlechtsprodukte und die Paarungswilligkeit der Versuchstiere sicher zu stellen. Ein Datensatz (25 Replikate) wurde von Dr. Andra Thiel (AG Populations- und Evolutionsökologie, FB2, Universität Bremen) erhoben. Sie verwendete jeweils ein Männchen als Paarungspartner und codierte das Paarungsverhalten wie in Tab. 2.1 beschrieben. Der zweite Datensatz (67 Replikate) stammt aus meiner Diplomarbeit (Weeda, 2008). Dort hatte ich jedem Weibchen zwei Männchen mit dem gleichen Status (z.B. A) angeboten und das Verhalten aller Tiere mit der Software *The Observer*® XT 7.0 (Noldus, Wageningen) aufgenommen. In beiden Versuchsreihen wurden kopulierende Weibchen nach dem Test als verpaart gewertet und durften am Folgetag je zwei Wirte 24 Std lang parasitieren. Schlüpften Töchter, so wurde die Wespe als erfolgreich verpaart gewertet. Von 92 getesteten Tieren musst ein Weibchen verworfen werden, da das Männchen überhaupt kein Balzverhalten zeigte.

5.1.4 Statistische Analyse

Ich benutzte generalisierte lineare Modelle (GLM; Nelder & Wedderburn, 1972) zur statistischen Auswertung der Anteile an Tieren, die ein bestimmtes Verhalten zeigten. Auf diese Weise konnte ich die Modelle an meine nicht normal verteilten Daten anpassen. Eine ausführliche Beschreibung der Methode ist in Kapitel 2.3.2 zu finden. Für die Analysen nutzte ich das Statistikprogramm R 2.13.1 (R developmental core team 2011) mit den Paketen „car“ (Fox & Weisberg, 2011) und „lme4“ (Bates *et al.*, 2011), wobei ich die jeweilige Linkfunktion der entsprechenden Datenverteilung angepasste. Binäre und prozentuale Daten mit einer binomialen bzw. quasibinomialen Verteilung wertete ich mit einer logit Linkfunktion aus, Poisson verteilte Zähldaten mit einer log Linkfunktion und Gamma verteilte Zeitdaten mit einer reziproken Linkfunktion.

Ob das Geschlecht einen Einfluss auf das Abwanderungsverhalten frisch geschlüpfter *B. brevicornis* Wespen hatte, testete ich mit einem GLM. In diesem integrierte ich auch die Behandlung um zu sehen, ob die Anwesenheit von Luft, Futter, einem Wirt, Puppen oder einer anderen Wespe die Aufenthaltszeit beeinflusste. Die zu testende Variable war binär und beinhaltete, ob das Versuchstier nach Beobachtungsende abgewandert war oder nicht. Der Einfluss des Geschlechts und der Behandlung auf die Zeit, die Wespen bis zur Abwanderung benötigten, wurde mit Hilfe einer Cox-Regression untersucht (für Details siehe Kapitel 2.2.2). Die Analyse führte ich mit SPSS für Windows (Version 11.0) durch. Hierbei nutzte ich den Zeitraum

vom Einsetzen der Wespe in die Arena bis zum Erscheinen oberhalb der Reuse oder dem Ablauf der Beobachtungszeit.

Aufgrund der geringen Anzahl sezierter Wespen wurde der Eivorrat verschieden alter Weibchen nur deskriptiv beschrieben. Inwiefern das Alter die Paarungsbereitschaft der Wespen beeinflusste, untersuchte ich mit GLMs. Hierfür wurde zunächst ermittelt, ob der Beobachter einen Einfluss auf den Paarungserfolg der Weibchen hatte. Als erklärende Variable wurde das Alter der Weibchen verwendet. Für die Paarungswilligkeit diente der Paarungsstatus des Versuchstieres nach dem Versuch, d.h. ob eine Kopulation erfolgte oder nicht. Auch für die Untersuchung zur Paarungswilligkeit der Männchen waren die zu testenden Variablen binär verteilt und beinhalteten, ob eine bestimmte Verhaltensweise (Flügelflattern, Besteigungsversuch, Kopulation) beobachtet werden konnte. Das Alter wurde in diesen Analysen ebenfalls als erklärende Variable verwendet.

Ob die Entscheidung virginer *B. brevicornis* Weibchen sich zu verpaaren durch deren Verwandtschaftsgrad zum potentiellen Partner (Geschwister oder nicht direkt verwandt) beeinflusst wird, wurde mit einem GLM getestet. Zunächst wurde ermittelt, ob die Anzahl der angebotenen Männchen, die z.B. beide Brüder des Weibchens waren und sich beide auf einem anderen Wirt entwickelten (keine Wahl), einen Einfluss auf die Paarungswilligkeit der Weibchen hatte. Als erklärende Variable floss zudem der natale Wirt mit ein, d.h. ob sich die Paarungspartner auf demselben Wirt entwickelten oder nicht. Die zu testende Variable war binär verteilt und beinhaltete, ob eine Kopulation beobachtet werden konnte oder nicht. Zudem wurde getestet, ob die Anzahl der potentiellen Paarungspartner einen Einfluss auf die Kopulation hatte. Der Einfluss des Verwandtschaftsgrades und des natalen Wirtes auf die Paarungslatenz, d.h. die Zeit vom ersten Kontakt bis zur Kopulation bzw. bis zum Beobachtungsende, wurde mit Hilfe einer Cox-Regression untersucht (für Details siehe Kapitel 2.2.2). Die Analyse führte ich mit SPSS für Windows (Version 11.0) durch. Auch für diese Analyse wurde zunächst getestet, ob die Anzahl der Paarungspartner einen Einfluss auf die Paarungslatenz hatte.

Bei allen Analysen setzte sich das jeweilige Ausgangsmodell aus Termen erster und teilweise auch zweiter Ordnung zusammen. Interaktionen und erklärende Variablen wurden rückwärtig aus dem Modell entfernt, wenn die entsprechende Variable nicht signifikant war. Das dadurch erhaltene minimal adäquate Modell verwendete ich für die Darstellung der Ergebnisse.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Postnatale Verbreitung

Während über 90 % der Weibchen abwanderten, blieben fast 30 % der Männchen bis zum Ende der Beobachtungszeit in der Arena (Geschlecht: $\chi^2_{1;325}$=26,14; p<0,001; GLM binomial; Abb. 5.3 A). Die Anwesenheit von Luft, Futter, einem Wirt, Puppen oder einer anderen Wespe (Behandlung: $\chi^2_{1;325}$=4,43; p=0,62; GLM binomial) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Entscheidung der Tiere abzuwandern. Zudem beeinflusste die Behandlung die Aufenthaltszeit männlicher und weiblicher Wespen in gleichem Maße (Behandlung*Geschlecht: $\chi^2_{1;325}$=6,15; p=0,41; GLM binomial).

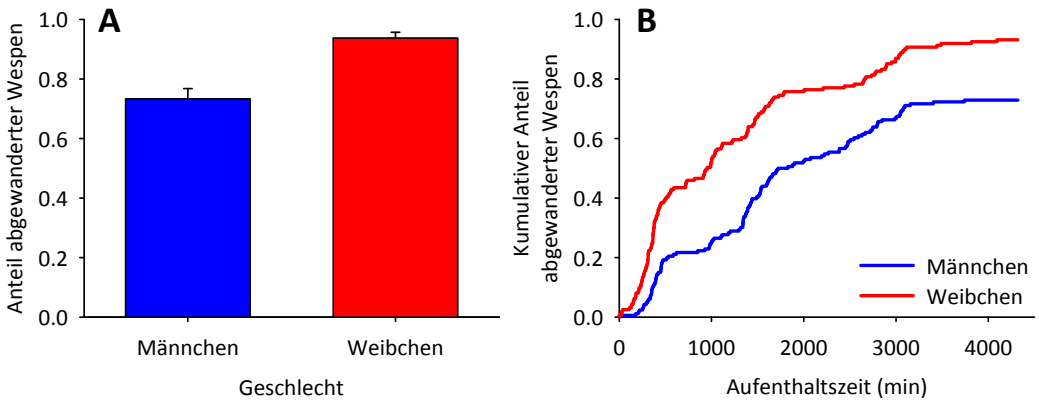

Abb. 5.3: (A) Anteil (+SE) frisch geschlüpfter *B. brevicornis* Wespen, die die Arena innerhalb von 72 Stunden verließen und (B) kumulativer Anteil an Wespen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt abgewandert waren.

Insgesamt verblieben 54 von 325 Tieren (16,6 %) bis zum Versuchsende in der Arena. Weibchen verließen den unteren Teil des Zylinders sehr viel früher als Männchen (Geschlecht: β=0,720; Exp(B)=2,055; $Wald_{1;325}$=34,11; p<0,001; Cox-Regression). So waren nach 1000 Minuten (16 Std 40 min) bereits 51,6 % der Weibchen abgewandert während nur 24,7 % der Männchen die Arena verlassen hatten (Abb. 5.3 B). Die Aufenthaltszeit wurde weder durch die Behandlung: $Wald_{6;325}$=3,87; p=0,69; Cox-Regression) noch durch die Interaktion beider Terme (Behandlung*Geschlecht: $Wald_{6;325}$=7,34; p=0,29; Cox-Regression) signifikant beeinflusst.

5.2.2 Altersbedingte Paarungsbereitschaft

Bereits in den Ovarien frisch geschlüpfter *B. brevicornis* Weibchen waren einige reife Eier vorhanden (Tab. 5.1). Jedoch war die Anzahl aller gefundenen Eier pro Weibchen recht gering.

Tab. 5.1: Deskriptive Statistik der mittleren Anzahl Eier (± SE) in den Ovarien unterschiedlich alter *B. brevicornis* Weibchen

Alter (Std)	N	reife Eier	unreife Eier
1^-	5	3 ± 2,0	3 ± 1,0
24^-	5	3 ± 1,0	2 ± 1,1
96^+	5	5 ± 1,6	1 ± 1,0

$^-$ ohne Wirtserfahrung
$^+$ mit Wirtserfahrung

Während 82 Datenpunkte von mir erhoben wurden, konnten 138 von Mingming Zhu beobachtete Weibchen für die statistische Auswertung genutzt werden. Nachdem der Beobachter keinen Einfluss auf den Paarungserfolg der Versuchstiere hatte ($\chi^2_{1;220}$=0,64; p=0,42; GLM binomial), kombinierte ich beide Datensätze.

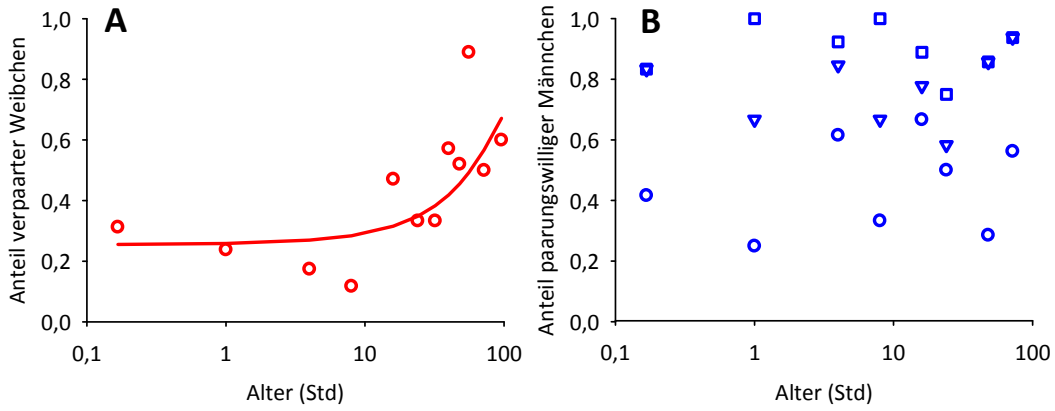

Abb. 5.4: Altersabhängige Paarungsbereitschaft (A) weiblicher und (B) männlicher Brackwespen (○ mittlerer Anteil verpaarter Tiere pro Altersgruppe, — Schätzwert des Anteils verpaarter Tiere, Δ mittlerer Anteil an Männchen, der Besteigungsversuche machte, □ mittlerer Anteil an Männchen, der Flügelflattern zeigte). Die x-Achsen sind logarithmisch dargestellt.

Die Paarungsbereitschaft der Weibchen stieg mit zunehmendem Alter nach dem Schlupf an ($\chi^2_{1;220}$=18,39; p<0,001; GLM binomial). Über die Hälfte der mindestens 40 Std alten Weibchen verpaarten sich (Abb. 5.4 A). Von 89 kopulierenden Weibchen brachten 65 (73 %) Töchter hervor.

Das Alter der Männchen hatte keinen Einfluss auf deren Bereitschaft sich mit einem Weibchen zu paaren ($\chi^2_{1;93}$=0,51; p=0,48; GLM binomial), ein Weibchen zu besteigen ($\chi^2_{1;93}$=2,37; p=0,12; GLM binomial) oder Flügelflattern zu zeigen ($\chi^2_{1;93}$=0,021; p=0,88; GLM binomial). Auch wenn im Schnitt nur 47 % der Männchen kopulierten, so versuchten sich über 77 % zu paaren und 90 %

warben um das Weibchen (Abb. 5.4 B). Über alle Altersklassen verteilt zeugten insgesamt 32 von 43 kopulierenden Männchen (74 %) mindestens eine Tochter.

5.2.3 Geschwistererkennung

Nachdem die Anzahl der Paarungspartner keinen signifikanten Einfluss auf die Entscheidung eines Weibchens sich zu verpaaren hatte (Paarungspartner: $\chi^2_{1;91}$=0,05; p=0,82; GLM binomial), kombinierte ich beide Datensätze für die statistische Auswertung.

Während sich die meisten Weibchen mit einem nicht direkt verwandten Männchen von einem anderen Wirt (NU) verpaarten, war der Anteil kopulierender Weibchen in den anderen Behandlungen (GG, GU, NG) niedriger (Abb. 5.5 A). Jedoch hatten der Verwandtschaftsgrad ($\chi^2_{1;91}$=1,81; p=0,18; GL; binomial) und der natale Wirt ($\chi^2_{1;91}$=1,69; p=0,19; GLM binomial) keinen signifikanten Einfluss auf die Bereitschaft der Weibchen sich zu verpaaren. Ebenso wurde die Paarungsbereitschaft von Geschwistern und nicht direkt verwandten Wespen gleichermaßen vom natalen Wirt beeinflusst (Verwandtschaft*Wirt: $\chi^2_{1;91}$=1,36; p=0,24; GLM binomial).

Auch für die Analyse zur Paarungslatenz, also der Zeit vom ersten Kontakt bis zur Kopulation bzw. bis zum Beobachtungsende, konnte kein signifikanter Einfluss der Anzahl männlicher Paarungspartner gefunden werden (β=-0,502; Exp(B)=1,398; $Wald_{1;91}$=1,40; p=0,24; Cox-Regression). Beide Datensätze konnten anschließend für die weitere Auswertung kombiniert werden.

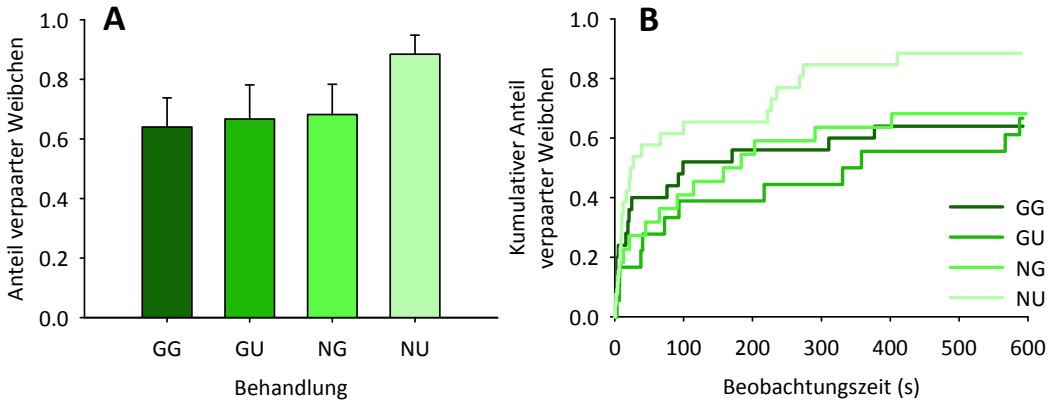

Abb. 5.5: (A) Anteil (+SE) von *B. brevicornis* Weibchen, die sich während einer 10-minütigen Beobachtungszeit verpaarten und (B) kumulativer Anteil an Weibchen, die sich zu einem bestimmten Zeitpunkt nach dem ersten Kontakt mit einem Männchen verpaart hatten (GG: Geschwister, die sich auf dem gleichen Wirt entwickelt haben; GU: Geschwister, die sich auf unterschiedlichen Wirten entwickelten; NG: nicht direkt verwandte Tiere, die sich auf dem gleichen Wirt entwickelt haben; NU: nicht direkt verwandte Tiere, die sich auf unterschiedlichen Wirten entwickelten)

Am Ende der Beobachtungszeit waren insgesamt 66 von 91 Weibchen (72,5 %) verpaart. Auch wenn Weibchen am schnellsten mit nicht direkt verwandten Männchen von anderen Wirten kopulierten (Abb. 5.5 B), so hatte weder der Verwandtschaftsgrad (β=-0,502; Exp(B)=0,605; $Wald_{1;91}$=0,39; p=0,53; Cox-Regression) noch der natale Wirt (β=-0,452; Exp(B)=0,636; $Wald_{1;91}$=0,295; p=0,59; Cox-Regression) einen signifikanten Einfluss auf die Zeit bis zur Paarung. Die Paarungslatenz bei Geschwistern und nicht direkt verwandten Paarungspartnern wurde gleichermaßen vom natalen Wirt beeinflusst (Verwandtschaft*Wirt: β=0,519; Exp(B)=1,680; $Wald_{1;91}$=1,049; p=0,31; Cox-Regression).

5.3 Diskussion

Vor allem bei gregären Arten mit komplementärer Geschlechtsbestimmung (CSD; Whiting, 1943) besteht generell die Wahrscheinlichkeit, dass es auf dem natalen Patch zu Geschwisterverpaarungen kommt (Heimpel & de Boer, 2008, van Wilgenburg *et al.*, 2006). Dies ist auch für *Bracon brevicornis* gegeben, da diese Brackwespe gemischtgeschlechtliche Gelege produziert (Kapitel 3.2.2) und sich die Entwicklungszeit beider Geschlechter nicht unterscheidet (Weeda, 2008). Obwohl Weibchen im Vergleich zu Männchen eine höhere Bereitschaft haben, kürzer am Schlupfort zu verweilen, ähnlich wie bei *Bracon hebetor* (Ode *et al.*, 1998), ist die Aufenthaltszeit auf dem natalen Patch zu lang, um ein Zusammentreffen von Brüdern und Schwestern vor Ort zu verhindern. Im Gegensatz dazu führt die kürzere Entwicklungszeit der *Cotesia glomerata* Männchen (Mazzi *et al.*, 2011) und das unmittelbare Abwandern vom Schlupfort bei dieser Wespe zu einem geringeren Anteil an Weibchen, die sich mit einem Bruder verpaaren (Gu & Dorn, 2003, Ruf *et al.*, 2011). Allerdings bleibt das Risiko von Geschwisterverpaarungen auch bei einer asynchronen Entwicklungszeit beider Geschlechter gleich hoch, wenn früher schlüpfende Männchen, wie bei *Goniozus nephantidis* Muesebeck (Hymenoptera: Bethylidae) (Hardy *et al.*, 1999), auf deren Schwestern warten.

Eine gute Möglichkeit zur Verringerung des Inzuchtrisikos am Schlupfort stellt eine postnatale Paarungslatenz bei einem oder beiden Geschlechtern dar. Dass *B. brevicornis* Weibchen während der ersten 40 Std nach dem Schlupf nicht paarungswillig sind, könnte zumindest unter Laborbedingungen für über 75 % der Weibchen lang genug sein, um den Schlupfort virgin zu verlassen. Die hier gefundene Paarungslatenz widerspricht jedoch einem früheren Befund, in dem *B. brevicornis* Weibchen nur bis zu 4 Std nach dem Schlupf nicht paarungswillig sind (Sudheendrakumar *et al.*, 1978). Allerdings ist diese Diskrepanz mit Vorsicht zu betrachten, da „*brevicornis*“ in einigen Studien bereits als Synonym für „*hebetor*“ verwendet wurde (Speicher & Speicher, 1940) und auch bei besagter Arbeit eine Verwechslung dieser morphologisch schwer

voneinander zu unterscheidenden Braconiden (van Achterberg, pers. Mitteilung) nicht ausgeschlossen werden kann. So entspricht die von Sudheendrakumar et al. (1978) gefundene Paarungslatenz der von weiblichen *B. hebetor* Wespen (Ode *et al.*, 1995). Allerdings können auch innerartliche Variationen zwischen verschiedenen Populationen nicht ausgeschlossen werden. So verpaaren sich *Lasius niger* Linnaeus (Hymenoptera: Formicidae) Königinnen irländischer Populationen meist nur einmal, während sich Königinnen französischer Populationen mehrfach verpaaren (Corley & Fjerdingstad, 2011).

Im Gegensatz zur 2-stündigen Paarungslatenz bei *B. hebetor* Männchen (Ode *et al.*, 1995) waren *B. brevicornis* Männchen direkt nach dem Schlupf paarungswillig, wobei deren Paarungserfolg durch die Weibchen bestimmt wurde. Dies entspricht der Annahme, dass Weibchen, die in Relation mehr Ressourcen zur Heranreifung von Gameten investieren, bei der Partnerwahl das wählerischere Geschlecht sein sollten (Trivers & Willard, 1973). Da die Paarungspartner nicht direkt verwandt waren und die Weibchen ihre Paarungslatenz überwunden hatten, bleibt an dieser Stelle ungeklärt, aus welchen Gründen die Männchen abgelehnt wurden. Dass bereits 10 min alte *B. brevicornis* Männchen Töchter zeugten, spricht für das Vorhandensein reifen Spermas beim Schlupf. Zu einem ähnlich Ergebnis kommt eine Studie mit frisch geschlüpften *B. hebetor* Männchen (Gerling & Rotary, 1973). Ob *B. brevicornis* Männchen alle Spermien bereits vor dem Schlupf produzieren (prospermatogen) oder nach dem Schlupf weitere Spermien heranreifen (synspermatogen), kann erst nach weiteren Untersuchungen mit Sicherheit gesagt werden. Laut Bovin et al. (2005) erfolgt die Produktion von Geschlechtsprodukten bei Weibchen und Männchen auf dieselbe Art und Weise, d.h. sind Männchen einer Art prospermatogen sollten auch deren Weibchen beim Schlupf bereits über ihren gesamten Eivorrat verfügen. Darauf basierend ist anzunehmen, dass *B. brevicornis* Männchen synspermatogen sind, da sich in den Ovarien junger wirtsnaiver Weibchen (0-24 Std) und 4 Tage alter wirtserfahrener Wespen nur wenige reife Eier befanden.

Nach Überwindung ihrer postnatalen Paarungslatenz sollten Weibchen weiterhin gegen ihre Brüder als Paarungspartner diskriminieren. Die Erkennungsgenauigkeit von Nahverwandten kann dabei von Brutgefährten (Ode *et al.*, 1995) bis zu Geschwistern (Metzger *et al.*, 2010) variieren. In dieser Versuchsreihe scheinen *B. brevicornis* Weibchen weder gegen Brutgefährten noch gegen Brüder zu diskriminierten, da alle Männchen in gleichem Maße als Paarungspartner akzeptiert wurden. Dieses Ergebnis ähnelt dem für *Cotesia glomerata* Linnaeus (Hymenoptera: Braconidae) (Ruf *et al.*, 2010), widerspricht jedoch der Diskriminierung gegen Brutgefährten (Ode *et al.*, 1995) oder Geschwister (Metzger *et al.*, 2010) bei anderen Arten. Weitaus interessanter ist die Fähigkeit von *B. brevicornis* Weibchen das csd-Allel ihres Paarungspartners

zu erkennen und diesen bei einer bevorstehenden Übereinstimmungsverpaarung abzuweisen (Thiel *et al.*, 2013). Dieser so genannte „grüne Bart Effekt“ (green beard effect, Dawkins, 2006) war unter den Hymenopteren lange Zeit nur für die Feuerameise *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) beschrieben, bei der Unterschiede im Genotyp zweier Individuen über den Geruch festgestellt werden (Keller & Ross, 1998). Ob die Erkennung des csd-Allels bei *B. brevicornis* ebenfalls über den Geruch des Partners erfolgt und wie zuverlässig diese Taktik wirkt, müssen weitere Studien klären. So erkennt *B. hebetor* Brutgefährten nur während der ersten fünf Tage nach dem Schlupf und akzeptiert diese zu einem späteren Zeitpunkt trotzdem als Paarungs-partner (Ode *et al.*, 1995).

Bei gregären Arten kann die Wahrscheinlichkeit von Inzuchtverpaarungen weiter verringert werden, wenn Gelege durch Superparasitismus und (partiellen) Ovizid aus Eiern verschiedener Mütter bestehen (Gu *et al.*, 2003, Takasu *et al.*, 1997). Beide Verhaltensweisen konnten bei *B. brevicornis* beobachtet werden (Buttelmann, 2009). Jedoch ist nicht geklärt in welchem Umfang und unter welchen Bedingungen diese Verhaltensweisen auftreten. Im Gegensatz zur hier untersuchten Brackwespe produzieren einige Parasitoide eingeschlechtliche Gelege (Elzinga *et al.*, 2007, West *et al.*, 1999), wodurch die Wahrscheinlichkeit von Geschwisterverpaarungen am Schlupfort verringert werden kann. Die Parasitierung einer aggregiert verteilten Wirsart kann allerdings dazu führen, dass Weibchen Gelege mit Söhnen oder Töchtern in unmittelbarer Nähe zueinander platzieren. Orientieren sich frisch geschlüpfte Männchen auf der Partnersuche zusätzlich am Sexualpheromon der Weibchen (Fauvergue *et al.*, 1999), kann das Risiko für Geschwisterverpaarungen dennoch recht hoch bleiben.

Neben der Ausprägung von CSD und der Lebensfähigkeit diploider Männchen können auch bestimmte Verhaltensweisen, z.B. das Verlassen des Schlupfortes, das Inzuchtrisiko einer Population beeinflussen (Hein *et al.*, 2009). So fördert die Erkennung von Brutgefährten und die postnatale Paarungslatenz in Verbindung mit einem Lek-Paarungssystem, d.h. Männchen versammeln sich an einem Ort und werden dort von den Weibchen als Paarungspartner gewählt, bei *B. hebetor* Auszucht (Ode *et al.*, 1995). Nachdem *B. brevicornis* lebensfähige diploide Männchen hervorbringt, hat diese Art unter Inzucht zunächst ein höheres Aussterberisiko als *B. hebetor* (Kapitel 3.2). Die Kombination von postnataler Paarungslatenz, Abwanderung vom Schlupfort und Allelerkennung bietet der hier untersuchten Brackwespe sehr wirksame Taktiken, um das Risiko von Inzuchtverpaarungen zu vermindern. Inwiefern diese Verhaltensweisen auch im Feld greifen, ist bisher noch ungeklärt. Auch bleibt die Frage offen, welchem Paarungssystem *B. brevicornis* unterliegt.

6. Schlussbetrachtung

Mit meiner Arbeit sollte im Labormaßstab die Anwendung theoretischer Vorhersagen zum Einfluss der komplementären Geschlechtsbestimmung (CSD; Whiting, 1943) auf ingezüchtete Populationen getestet werden. Dieser bei einem Teil der Hymenopteren zu findende Mechanismus bedingt, dass sich aus unbefruchteten und befruchteten Eiern mit hemi- bzw. homozygot vorliegenden csd-Allelen Männchen entwickeln, während die csd-Allele bei diploiden Weibchen heterozygot vorliegen (Cook, 1993). Einer Simulation von Zayed und Packer (2005) zufolge ist das Aussterberisiko ingezüchteter Populationen durch das Auftreten diploider Männchen höher, wenn sich diese zu Adulten entwickeln und nicht schon während der Entwicklung sterben. In Kapitel 3 konnte gezeigt werden, dass das Aussterberisiko stark ingezüchteter Laborstämme durch die gute Überlebensfähigkeit diploider *Bracon brevicornis* Männchen gegenüber diploiden *Bracon hebetor* Männchen mit einer hohen Entwicklungs-mortalität erhöht ist. Dabei handelt es sich jedoch um ein sehr stark vereinfachtes System, das bei weitem nicht an die Komplexität im Freiland heranreicht und eine Übertragbarkeit der Laborergebnisse nicht ohne weiteres zulässt. Der Ansatz zur Vorhersage der Aussterbe-wahrscheinlichkeit von Metapopulationen wurde von Hein et al. (2009) etwas realistischer gestaltet, in dem deren Modell zusätzlich die folgenden Parameter berücksichtigt: postnatale Verbreitung, Geschlechterverhältnis, maximale Reproduktionsrate, intraspezifische Konkurrenz, Wahrscheinlichkeit, mit der diploide Männchen steril sind, und Wahrscheinlichkeit mit der diploide Männchen als Paarungspartner abgewiesen werden. Im Einklang mit diesem Modell konnte ich zeigen, dass ingezüchtete *B. brevicornis* Stämme durch die Produktion vornehmlich steriler diploider Männchen, in Kombination mit einer fehlenden Diskriminierung gegen solche Paarungspartner (Kapitel 4), zu einem hohen Aussterberisiko führen.

Eine wirklichkeitsnahe Einschätzung der Auswirkungen von CSD auf kleine Populationen sollte neben den postulierten Parametern der theoretischen Modelle (Zayed & Packer, 2005, Hein *et al.*, 2009) auch vorhandene Mechanismen zur Vermeidung von Inzuchtverpaarungen und das Paarungssystem selbst mit einbeziehen. So hat *B. brevicornis* zunächst ein sehr hohes Risiko unter Inzucht in eine durch diploide Männchen bedingte Abwärtsspirale (diploid male vortex; Zayed & Packer, 2005) zu geraten und gegebenenfalls auszusterben. Allerdings lassen das frühere Abwandern frisch geschlüpfter *B. brevicornis* Weibchen und die 40-stündige Paarungslatenz dieser Weibchen (Kapitel 5), sowie die Diskriminierung gegen Paarungspartner mit dem gleichen csd-Allel (Thiel *et al.*, 2013), auf sehr wirksame Taktiken zur Vermeidung von Übereinstimmungsverpaarungen schließen. Inwiefern diese Verhaltensweisen auch im Freiland greifen und welches Paarungssystem *B. brevicornis* aufweist, bleibt noch zu klären.

Im Feld wurden bereits bei verschiedenen Hymenopterenarten diploide Männchen (Adams *et al.*, 1977, Owen & Packer, 1994, Ross *et al.*, 1993, Francini *et al.*, 2012, Fujiwara *et al.*, 2004, Whidden & Owen, 2011, Antolin *et al.*, 2003) und teilweise sogar triploide Weibchen (Cournault & Aron, 2009, Darvill *et al.*, 2012, Takahashi *et al.*, 2008) nachgewiesen. Demnach scheint das Auftreten polyploider *B. brevicornis* Wespen im Feld wahrscheinlich (Thiel & Weeda, in press), auch wenn dafür bisher noch kein Nachweis existiert. Bestandsaufnahmen im Feld, die vornehmlich das Geschlechterverhältnis im Fokus haben und den Ploidiegrad außer Acht lassen, könnten das Vorliegen einer Inzuchtdepression übersehen bzw. dessen Ausmaß unterschätzen, wenn das Auftreten steriler triploider Weibchen unerkannt bleibt. Treten verhältnismäßig viele polyploide Wespen auf, so kann sich ein bevorstehender Populations-zusammenbruch zudem auf die Folgegeneration verschieben. Im Allgemeinen führt die Produktion diploider Männchen und triploider Weibchen zu einer Verminderung des Wachstums und der Fitness einer Population und erhöht dadurch deren genetische Last (Heimpel & de Boer, 2008, Harpur *et al.*, 2012, Darvill *et al.*, 2012, Zayed & Packer, 2005, Hein *et al.*, 2009). Während ein inzuchtbedingter Fitnessverlust bei sozialen Arten abgemildert werden kann, z.B. wenn lebensfähige triploide *Hypoponera opacior* Forel (Hymenopter: Formicidae) Arbeiterinnen zur Produktion ihrer Kolonie beitragen (Kureck *et al.*, 2013b, Doums *et al.*, 2013), ist dies bei solitären Arten nicht möglich.

Zahlreichen Studien haben sich bisher mit der Produktion diploider Männchen und triploider Weibchen sowie deren Fertilität beschäftigt (Heimpel & de Boer, 2008, Harpur *et al.*, 2012, van Wilgenburg *et al.*, 2006). Bis auf zwei Studien zum Paarungsverhalten polyploider Wespen (de Boer *et al.*, 2007b, Thiel & Weeda, in press) ist das Verhalten solcher Individuen bisher weitestgehend unbekannt. Für ein besseres Verständnis über die Auswirkungen diploider Männchen und triploider Weibchen auf die Populationsdynamik, wäre die Möglichkeit zur Kombination der Fertilitätsdaten mit bestimmten Verhaltensweisen wünschenswert. So unterscheiden sich polyploide *B. brevicornis* Wespen in ihrem Paarungsverhalten nicht von ihren Geschlechtsgenossen mit einem niedrigeren Ploidiegrad (Kapitel 4), jedoch bleibt fraglich, wie gut sie sich bei der Partnerwahl gegen haploide Männchen bzw. diploide Weibchen behaupten können. Beispielsweise haben diploide *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) Männchen gegenüber haploiden Männchen der gleichen Art ein verringertes Flugvermögen (Borges *et al.*, 2012), wodurch der Radius zur Suche potentieller Partnerinnen verringert werden könnte.

Des Weiteren ist ein Teil der triploiden *B. brevicornis* Weibchen, im Gegensatz zu sterilen triploiden Königinnen einiger Ameisenarten (Cournault & Aron, 2009, Krieger *et al.*, 1999), in der Lage Eier zu legen, aus denen aber nur vereinzelt Nachwuchs hervorgeht (Kapitel 4). Wie sich

Brackwespen-Weibchen beider Ploidiegrade verhalten, wenn sie auf Konkurrentinnen oder bereits parasitierte Wirte treffen, ist noch ungeklärt. Diploide *B. brevicornis* Weibchen konnten beim Abstechen der Eier fremder Weibchen (Ovizid) beobachtet werden (Buttelmann, 2009). Ein solches Verhalten ist auch für andere Arten gezeigt worden (Strand & Godfray, 1989, Takasu *et al.*, 1997). Ob diploide und triploide Brackwespen-Weibchen in gleichem Maße Ovizid betreiben, ihre eigenen Eier zum Gelege der Vorgängerin hinzufügen, wie einige andere Ektoparasitoide (Babendreier & Hoffmeister, 2002, Godfray, 1994), oder einen bereits parasitierten Wirt gleich wieder verlassen, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Die geringe Lebensfähigkeit und die längere Entwicklungszeit triploider *B. brevicornis* Weibchen, gegenüber diploiden Weibchen (Kapitel 4), könnten jedoch auf einen geringeren kumulativen Fitnessgewinn (*life time fecundity*) hindeuten. Allerdings könnten auch ingezüchtete diploide Weibchen zu einem verringerten Populationswachstum beitragen, wenn frisch geschlüpfte Weibchen unter Inzucht über eine verringerte Anzahl reifer Eier verfügen (Vayssade *et al.*, 2014). Zu diesem Aspekt sind mir jedoch keine Studien der hier untersuchten Arten bekannt. Das Verhalten polyploider Hymenopteren kann aber auch für den angewandten Bereich, z.B. die biologische Schädlingsbekämpfung und die Bestäubung von Nutzpflanzen, von großer Bedeutung sein. Treten zu viele triploide Weibchen auf, die eventuell weniger leistungsfähig sind als ihre diploiden Schwestern, könnte dies zu Ernteeibußen führen (Harpur *et al.*, 2012). So sind triploide *B. brevicornis* Weibchen zwar in der Lage Wirte zu parasitieren (Kapitel 4), jedoch bleibt unklar, wie gut diese Individuen gegenüber diploiden Weibchen bei der Lokalisation der Wirte sind.

B. hebetor wird bereits kommerziell zur Bekämpfung einer Vielzahl vorratsschädigender Lepidoptera-Arten eingesetzt (Huang, 1986, Grieshop *et al.*, 2006, Saxena *et al.*, 2012, Adashkevich *et al.*, 1981, Brower & Press, 1990, Cline & Press, 1990). Ein Beispiel hierfür ist die Dörrobstmotte *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae), gegen die dieser Parasitoid auch in Kombination mit anderen Parasitoidenarten verwendet werden kann (Adarkwah & Schöller, 2012, Grieshop *et al.*, 2006). Durch die hohe Mortalität diploider *B. hebetor* Männchen (Kapitel 3) eignet sich diese Brackwespe besonders für Massenzuchten, da das Aussterberisiko durch den Eintritt in den *diploid male vortex* recht gering ausfällt. Im Gegensatz dazu wird *B. brevicornis* bisher noch nicht als Nützling eingesetzt. Dabei würde sich diese Brackwespe zur Bekämpfung des Maiszünslers *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae), einem Schädling der Maispflanze (Poos, 1927), eignen. Zumal diese Zünslerart mittlerweile bis zu drei Generationen pro Saison hervorbringt (Eidmann, 1926, Pölitz *et al.*, 2007, Velasco *et al.*, 2007) und bisher nur mit Eiparasitoiden der Gattung *Trichogramma* bekämpft

wird (Hoffmann *et al.*, 2006). Eine Kombination von Ei- und Larvalparasitoid wäre zur biologischen Bekämpfung des Maiszünslers wünschenswert. Die unter Inzucht auftretenden polyploiden *B. brevicornis* Wespen stellen jedoch ein Problem für die Zucht dieser Art dar.

So ist die Produktion diploider Männchen und triploider Weibchen für Massenzuchten doppelt belastend. Zum einen müssen sehr viel mehr Individuen gezüchtet und entsprechend mehr Ressourcen verwendet werden, um eine ausreichende Anzahl Weibchen ernten zu können, da meist nur Hymenopteren dieses Geschlechts als Nützling eingesetzt werden können (Austin *et al.*, 2005). Zum anderen wird das Populationswachstum durch das Auftreten polyploider Wespen verringert und das Risiko für das Aussterben der Zucht steigt (Zayed & Packer, 2005, Hein *et al.*, 2009, Whitehorn *et al.*, 2009). Kommt es zur Paarung mit diploiden Männchen, so sind die Weibchen, vor allem wenn diese sich nur einmal im Leben verpaaren, nach der Kopulation gezwungen nur noch haploide Söhne (Heimpel & de Boer, 2008) oder sterilen triploiden Nachwuchs (Cournault & Aron, 2009, de Boer *et al.*, 2007b) hervorzubringen. Sterben diploide Männchen jedoch vor dem Schlupf, so verbleiben ausschließlich haploide Männchen als Paarungspartner und zumindest ein Teil der befruchteten Eier kann sich zu diploiden Töchtern entwickeln (Hein *et al.*, 2009, Harpur *et al.*, 2012). Hier könnte die Integration haploider Männchen helfen die Wahrscheinlichkeit von Kopulationen mit diploiden Männchen weiter zu verringern (Schneider & Viñuela, 2007, Hein *et al.*, 2009). Entsprechend einer Studie von Whitehorn et al. (2009) über die Auswirkungen der Lebensfähigkeit diploider Männchen auf die Populationsdynamik einer Hummelart, sollten Zuchten von *B. brevicornis* anfälliger für die Entwicklung einer Inzuchtdepression sein und langsamer wachsen als solche von *B. hebetor*. Auch die gefundenen innerartlichen Unterschiede bei *B. hebetor* (Kapitel 3) lassen darauf schließen, dass die Verwendung von Stämmen, die vergleichsweise robust gegenüber Inzucht sind, für eine Etablierung von Labor- oder Massenzuchten vorteilhaft sein könnte.

Einem Populationszusammenbruch lässt sich am besten durch die Verminderung des Inzuchtrisikos entgegenwirken. Hierfür spielen zunächst die genetische Diversität und die damit verbundene Wahrscheinlichkeit für Übereinstimmungsverpaarungen eine Rolle. Auch ein anfänglich großer Genpool kann in Massenzuchten bzw. bei stark isolierten Freiland-populationen durch genetische Drift und Inzucht reduziert werden (Charlesworth & Willis, 2009, Leberg, 1992). Vor allem bei Arten mit sl-CSD erhöht sich die Produktion diploider Männchen mit abnehmender Anzahl unterschiedlicher csd-Allele in einer Population sehr viel schneller als bei Arten mit ml-CSD (Cook & Crozier, 1995, van Wilgenburg *et al.*, 2006, Heimpel & de Boer, 2008). Dem kann durch eine Auffrischung mit Wildtieren oder aus anderen Stämmen integrierten Individuen entgegen gewirkt werden (Stouthamer *et al.*, 1992, Hein *et al.*, 2009),

wobei jedoch die Gefahr besteht, dass Wespen aus verschiedenen Regionen nicht oder nur schwer miteinander gekreuzt werden können (Hoy & Cave, 1988, Pinto *et al.*, 1991). Der Erhalt möglichst großer und genetisch diverser Populationen bzw. ein reger Austausch zwischen Metapopulationen kann das Inzuchtrisiko entsprechend verringern (Hein *et al.*, 2009, Cook & Crozier, 1995). Wobei kleine Populationen mit einer hohen genetischen Diversität nicht automatisch ein geringeres Aussterberisiko gegenüber genetisch weniger diversen Populationen haben (Elias *et al.*, 2010). Wie gut der genetische Austausch funktioniert, ist artspezifisch und hängt im Freiland unter anderem von der zu überbrückenden Distanz zwischen Mikrohabitaten und dem Flugvermögen ab, wobei die Fähigkeit zu fliegen beispielsweise durch die Körpergröße, die Gesundheit oder die Wirtsverteilung beeinflusst werden kann (Lukáš *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2009, Araújo *et al.*, 2004, Villacide & Corley, 2008, Osborne *et al.*, 2008). Ferner steigt die Anzahl triploider Weibchen mit abnehmender Habitatgröße und zunehmender Isolation an (Darvill *et al.*, 2012), was auf eine verminderte Migration zwischen Meta-populationen hindeutet. Aber auch kleine Unterschiede im Migrationsvermögen nah verwandter Arten können darüber entscheiden, für welche Art eine Habitatfragmentierung unüberwindbare Distanzen hervorruft und letztlich zur Isolation einer Population führt (Darvill *et al.*, 2010). So sollten neben der genetischen Komponente auch die Habitatfragmentierung und bestimmte Verhaltensweisen berücksichtig werden, wenn es beispielsweise um den Schutz gefährdeter Hymenopterenarten geht. Solange ein Habitat nur leicht fragmentiert ist und das Flugvermögen einer Art ausreicht, um sich zwischen diesen uneingeschränkt bewegen zu können, wie es für *Dolerus aeneus* Hartig (Hymenoptera: Symphyta) gezeigt werden konnte (Cook *et al.*, 2013), bleibt der Genfluss zwischen Metapopulationen bestehen.

Bei den Hymenopteren wird CSD als ursprünglich angesehen (Asplen *et al.*, 2009, Schmieder *et al.*, 2012, Cook, 1993). Allerdings ist dieser Mechanismus nur bei einem Teil der Hymenopteren zu finden und dessen Entstehung wird weiterhin kontrovers diskutiert (Heimpel & de Boer, 2008, Schmieder *et al.*, 2012, Asplen *et al.*, 2009). So gehen Schmieder et al. (2012) davon aus, dass zuerst sl-CSD entstand und einige Arten später ml-CSD entwickelten. Andere Forscher schließen hingegen eine Verschmelzung der csd-Loci und damit eine Umwandlung von ml- zu sl-CSD nicht aus (Asplen *et al.*, 2009, de Boer *et al.*, 2012). Unabhängig von der Anzahl der beteiligten csd-Loci stellt sich jedoch die Frage, welchen evolutionären Vorteil die Beibehaltung von CSD haben könnte, obwohl damit immense Kosten für einzelne Populationen verbunden sind. So könnte angenommen werden, dass dieser Geschlechtsbestimmungsmechanismus die Einnistung bakterieller Endosymbionten verhindern könnte. Beispielsweise führt *Wolbachia* bei drei *Trichogramma* Arten zur Verdopplung des Genoms, wodurch sich aus haploiden Eiern diploide

Weibchen entwickeln (Stouthamer & Kazmer, 1994). Bei Arten mit CSD würde eine Duplikation des csd-Alles unweigerlich zur Produktion diploider Männchen führen und das Aussterben der Population nach sich ziehen (van Wilgenburg *et al.*, 2006). Evolutionär betrachtet führt die Beibehaltung von CSD zu einem Paarungssystem, das Auszucht fördert, wohingegen Inzucht die Entwicklung von ml-CSD oder gar die Abschaffung dieses Mechanismus fördern sollte (Heimpel & de Boer, 2008).

Mit dieser Studie konnte ich einige Einblicke bezüglich der Vorhersagbarkeit über die Auswirkungen von CSD auf ingezüchtete Laborstämme gewinnen. So bilden die stark vereinfachten theoretischen Vorhersagen (Zayed & Packer, 2005, Hein *et al.*, 2009) nur einen ersten Anhaltspunkt, welches Ausmaß die negativen Effekte von CSD auf stark isolierte Populationen haben könnten. Letzten Endes sollte das Verhalten der betroffenen Individuen und das Paarungssystem einer Art einen entscheidenden Beitrag dazu leisten können, wie hoch das Aussterberisiko einer Population wirklich ist. Jedoch kann innerartlich nicht pauschal von einer Population auf eine andere geschlossen werden, da diese sich in einigen Parametern grundlegend voneinander unterscheiden können, wie die Lebensfähigkeit diploider Männchen bzw. deren Abwesenheit bei verschiedenen *B. hebetor* Stämmen (Kapitel 3) deutlich zeigte. Auch konnte ich zeigen, dass *B. brevicornis* unter Inzucht zwar stark vom Aussterben bedroht ist (Kapitel 3), aber über eine Reihe sehr wirksamer Taktiken zur Vermeidung von Übereinstimmungsverpaarungen verfügt. Inwiefern diese Verhaltensweisen unter Konkurrenz-bedingungen bzw. im Freiland greifen, muss jedoch durch weitere Studien geklärt werden.

7. Zusammenfassung

Neben der für Hymenopteren typischen Haplodiploidie als Geschlechtsbestimmungsmechanismus liegt bei etlichen Arten eine komplementäre Geschlechtsbestimmung (CSD; Whiting, 1943) vor, bei der das Geschlecht durch Allele an einem (sl-CSD) oder mehreren (ml-CSD) Genloci bestimmt wird. Bei CSD gehen aus unbefruchteten Eiern haploide Männchen (hemizygot am csd-Locus) hervor, während sich befruchtete Eier entweder zu diploiden Weibchen (heterozygot am csd-Locus) oder zu diploiden Männchen (homozygot am csd-Locus) entwickeln (Cook, 1993). Letztere resultieren hierbei aus einer Übereinstimmungsverpaarung (matched mating; Cook & Crozier, 1995), bei der eines der csd-Allele des Weibchens mit dem seines Paarungspartners übereinstimmt. In kleinen Populationen mit sl-CSD und nur wenigen unterschiedlichen csd-Allelen sollte eine Inzuchtdepression sehr schnell sichtbar werden (Cook & Crozier, 1995). Die Aussterbewahrscheinlichkeit sollte am höchsten sein, wenn sterile diploide Männchen vorhanden sind, mit denen sich Weibchen wahllos verpaaren (Hein *et al.*, 2009, Zayed & Packer, 2005). Welche Konsequenzen diploide Männchen auf eine Population haben, wurde bisher jedoch nur anhand von Modellen simuliert.

Mein Ziel war es die theoretischen Vorhersagen über die Auswirkungen diploider Männchen auf einzelne Laborstämme zu testen. Zu diesem Zweck verwendete ich zwei gregäre Brackwespenarten, bei denen Weibchen jeweils mehrere Eier an den gleichen Wirt legen, wodurch ein potenziell hohes Inzuchtrisiko durch Geschwisterverpaarungen besteht. Ich untersuchte insgesamt zwei *Bracon brevicornis*-Stämme mit lebensfähigen diploiden Männchen (Speicher & Speicher, 1940) und drei *Bracon hebetor*-Stämme, bei denen ein Großteil dieser Männchen im Eistadium abstirbt (Petters & Mettus, 1980). Inzuchtbedingte Veränderungen verschiedener Parameter, z.B. der Produktion diploider Männchen, wurden durch den Vergleich von ingezüchteten mit zufällig verpaarten Tieren ermittelt. Wie erwartet, wurde eine Inzuchtdepression bei *B. brevicornis* früher ersichtlich und die Überlebenswahrscheinlichkeit solcher Linien war niedriger als bei *B. hebetor*. Zudem starben ingezüchtete Linien schneller aus als solche, bei denen nicht direkt verwandte Wespen zufällig miteinander verpaart wurden. Überraschenderweise zeigte sich zwischen verschiedenen Stämmen eine große Variation beim Anteil diploider Männchen. Diese reichte vom Absterben im Eistadium bis zum vollständig entwickelten Phänotyp. Das generelle Wissen über eine Art lässt demnach nicht zwingend einen Rückschluss auf die Gegebenheiten in einzelnen Populationen zu.

Die hohe Anzahl lebensfähiger diploider Männchen bei *B. brevicornis* führt zur Frage nach deren Fertilität und weiteren Auswirkungen auf die Population. Sterile Männchen oder solche mit einer verminderten Fertilität hemmen den Fitnessgewinn ihrer weiblichen Paarungspartner, vor

allem wenn diese sich nur einmal verpaaren (Heimpel & de Boer, 2008). Bei einer großen Zahl diploider Männchen kann dies auch zu einer beträchtlichen Wachstumsverminderung ihrer Population führen (Zayed & Packer, 2005). Die Vermeidung von Paarungen mit diploiden Männchen sollte demnach einen selektiven Vorteil darstellen. Ich konnte zeigen, dass balzende diploide *B. brevicornis* Männchen problemlos von ihren weiblichen Paarungspartnern akzeptiert wurden und nicht durchgehend steril waren. Auch ihre meist triploiden Töchter wurden von haploiden Männchen umworben und begattet. Obwohl die meisten triploiden Weibchen steril waren, schafften es einige einen Sohn oder eine Tochter hervorzubringen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Inzuchtdepression durch die Produktion polyploider Individuen verschleiert werden kann und ein Populationszusammenbruch dadurch möglicherweise auf die Folgegeneration verschoben wird.

Aufgrund der fehlenden Diskriminierung gegen polyploide und meist sterile Paarungspartner wäre es für *B. brevicornis* evolutiv betrachtet adaptiv die Produktion diploider Männchen vermeiden zu können. Hierfür kämen verschiedene Reproduktionsstrategien in Frage, auf deren Realisierung hin ich *B. brevicornis* untersuchte. Auch wenn Weibchen dieser Art nicht zwischen ihren Brüdern und nicht direkt verwandten Männchen unterschieden, so verließen sie den Schlupfort sehr viel früher als ihre männlichen Brutgefährten. Zudem waren *B. brevicornis* Weibchen während der ersten 40 Stunden nach dem Schlupf nicht paarungswillig. Meine Versuche legen nahe, dass die Kombination verschiedener Taktiken helfen kann Geschwisterverpaarungen weitestgehend auszuschließen, wodurch die mit sl-CSD assoziierten Kosten vermindert werden können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die theoretischen Vorhersagen und lassen darauf schließen, dass kleine Populationen mit einer geringen Vielfalt an csd-Allelen durchaus vom Aussterben gefährdet sind. Darauf basierend wird die ökologische Relevanz meiner Ergebnisse diskutiert und die Zusammenhänge zwischen dem Grad der Inzuchtdepression und den vorhandenen Reproduktionsstrategien der untersuchten Brackwespenarten in einem evolutionären Kontext erörtert. Neben dem Nutzen und der Problematik der getesteten Modelle wird auch die Relevanz dieser Arbeit zur Verbesserung von Massenzuchten erörtert.

8. Summary

In Hymenoptera sex is typically determined via haplodiploidy. However, in many hymenopteran species the so called complementary sex determination (CSD; Whiting, 1943) can be found, i.e. the sex of an individual depends on the composition of the csd-alleles at one (sl-CSD) or many (ml-CSD) loci. Here, unfertilized eggs develop into haploid males (hemizygous at the csd-locus) while fertilized eggs become either diploid females (heterozygous at the csd-locus) or diploid males (homozygous at the csd-locus) (Cook, 1993). Diploid males originate from matched matings (Cook & Crozier, 1995), where one of the female's sex-alleles matches that of her mating partner. In small populations with sl-CSD and low genetic variation in csd-alleles inbreeding depression can rapidly be seen (Cook & Crozier, 1995). Moreover, a population's extinction probability increases, if females indiscriminately mate with haploid and diploid males (Hein *et al.*, 2009, Zayed & Packer, 2005). So far, the consequences of diploid males on a population have only been studied using simulation models.

My goal was to test theoretical predictions about the consequences of the occurrence of diploid males on a population. Therefore, two *Bracon* species each of which reproduces gregariously, i.e. several eggs are laid on the same host, were used. As a consequence of this reproductive mode, females potentially run a high risk of sib mating. Two lab strains of *Bracon brevicornis*, a species with viable diploid males (Speicher & Speicher, 1940), and three strains of *Bracon hebetor*, in which most diploid males die during development (Petters & Mettus, 1980), were used for experiments. To elucidate the effects of inbreeding on population parameters parameters, e.g. diploid male production, I compared inbred lines with genetically diverse lines, i.e. experimental animals were randomly mated with unrelated partners. As expected, inbreeding depression occurred earlier in *B. brevicornis* than in *B. hebetor* and survival probability was higher in the latter species. Additionally, inbred lines had a higher risk to go extinct than randomly mated ones. Surprisingly, the proportion of diploid males varied between different strains, covering all stages from death at the egg stage to fully developed phenotypes. Thus, basic knowledge of a species won't necessarily show the real conditions within single populations.

The high frequency of viable diploid *B. brevicornis* males leads to further questions about the fertility of those males and their consequences on a population. A female's fitness gain will be impeded through diploid mating partners that are sterile or have a reduced fertility, especially if females mate only once (Heimpel & de Boer, 2008). This considerably reduces the growth of a population, if diploid male production is high (Zayed & Packer, 2005). Avoiding to mate with diploid males should therefore be a selective advantage. My results demonstrated that

displaying diploid *B. brevicornis* males were readily accepted as mating partners and that not all of them were sterile. Furthermore, their triploid daughters were wooed and mated by haploid males. Even though most triploid females were sterile a few of them managed to produce a son or a daughter. This result suggests that an inbreeding depression could be hidden through the production of polyploid individuals and a population breakdown could be shifted to the next generation.

From an evolutionary point of view it would be adaptive to reduce the risk of matched matings since *B. brevicornis* does not discriminate against polyploid mating partners. To test for this I investigated if *B. brevicornis* uses reproductive strategies. That would decrease the likelihood of matched matings. Even though females of this species did neither discriminate against brothers nor offspring from the same host as mating partners, they dispersed earlier form the natal patch than their male brood mates. Additionally, *B. brevicornis* females have a 40 h postnatal mating latency. This suggests that a combination of different reproductive behaviours seems to help reducing the risk of sib mating and thus lower the costs associated with sl-CSD.

Nevertheless, my results confirm the theoretical predictions and suggest that small populations with a low variety of csd-alleles are threatened by extinction. The ecological relevance of my work is discussed and the relationship of the degree of inbreeding and the reproductive strategies used by the tested *Bracon* species are reconsidered in an evolutionary context. Finally I discuss the advantages and problems of the theoretical models and the importance of my work to improve mass rearings.

9. Referenzen

9.1 Literatur

Adams, J., Rothman, E. D., Kerr, W. E. & Paulino, Z. L. (1977). *Genetics* **86**, 583-596.

Adarkwah, C. & Schöller, M. (2012). *J. Stored Prod. Res.* **51**, 1-5.

Adashkevich, B. P., Adylov, Z. K. & Rasulev, F. K. (1981). *Zashchita Rastenii* **9**, 9-10.

Adashkevich, B. P. & Saidova, E. K. (1987). *Zoologicheskii Zhurnal* **66**, 1509-1515.

Ahmed, M. S. H., Almaliky, S. K., Altaweel, A. A., Jabo, N. F. & Alhakkak, Z. S. (1985). *J. Stored Prod. Res.* **21**, 65-68.

Anderson, P. L., Weiss, M. J., Hellmich, R. L., Hoffmann, M. P. & Wright, M. G. (2003). *J. Econ. Entomol.* **96**, 361-369.

Antolin, M. F., Ode, P. J., Heimpel, G. E., O'Hara, R. B. & Strand, M. R. (2003). *Heredity* **91**, 373-381.

Antolin, M. F., Ode, P. J. & Strand, M. R. (1995). *Anim. Behav.* **49**, 589-600.

Antolin, M. F. & Strand, M. R. (1992). *Ecol. Entomol.* **17**, 1-7.

Araújo, E. D., Costa, M., Chaud-Netto, J. & Fowler, H. G. (2004). *Brazilian Journal of Biology* **64**, 563-568.

Arndt-Jovin, D. J. & Jovin, T. M. (1989). *Methods in Cell Biology*, edited by D. L. Taylor & W. Yu-Li, pp. 417-448: Academic Press.

Aron, S., De Menten, L., Van Bockstaele, D. R., Blank, S. M. & Roisin, Y. (2005). *Current Biology* **15**, 824-827.

Asplen, M. K., Whitfield, J. B., De Boer, J. G. & Heimpel, G. E. (2009). *J. Evol. Biol.* **22**, 1762-1769.

Auerswald, L. & Lopata, A. (2005). *Current Allergy & Clinical Immunology* **18**, 58-60.

Austin, A. D., Johnson, N. F. & Dowton, M. (2005). *Annual Review of Entomology*, pp. 553-582.

Ayabe, T., Hoshiba, H. & Ono, M. (2004). *Chromosome Research* **12**, 215-223.

Babendreier, D. & Hoffmeister, T. S. (2002). *Entomol. Exp. Appl.* **105**, 63-69.

Bastami, F. A., Fathipour, Y. & Talebi, A. A. (2011). *Applied Entomology and Phytopathology* **78**, 153-176.

Bates, D., Maechler, M. & Bolker, B. (2011). *lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes.* Version 0.999375-42.

Baylis, J. (1981). *Environmental Biology of Fishes* **6**, 223-251.

Baylis, J. R. (1978). *Nature* **276**, 738-738.

Beckman Coulter Inc. (2003). *COULTER EPICS XL und XL-MCL DurchflussZytometer: Bedienungsanleitung*, 2 ed. Fullerton: Beckman Coulter Inc.

Begon, M., Harper, J. L. & Townsend, C. R. (1990). *Ecology: Individuals, Populations and Communities*, 2 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Beukeboom, L. W. (2001). *Netherlands Journal of Zoology* **51**, 1-15.

Boivin, G., Jacob, S. & Damiens, D. (2005). *Oecologia* **143**, 198-202.

Boomsma, J. J., Baer, B. & Heinze, J. (2005). *Annual Review of Entomology* **50**, 395-420.

Borges, A. A., Humann, F. C., Tavares, M. G., Campos, L. A. O. & Hartfelder, K. (2012). *Insectes Sociaux* **59**, 587-598.

Breed, M. D. (1998). *BioScience* **48**, 463-470.

Brower, J. H. & Press, J. W. (1990). *J. Econ. Entomol.* **83**, 1096-1101.

Burkhardt, F. (1920). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **6**, 25-60.

Butcher, R. D. J., Whitfield, W. G. F. & Hubbard, S. F. (2000). *J. Evol. Biol.* **13**, 593-606.

Buttelmann, N. (2009). Diplomarbeit thesis, Universität Bremen, Bremen.

Calvert, I. A. N. & Corbet, S. A. (1973). *Journal of Entomology Series A, General Entomology* **47**, 201-209.

Chandra, H. S. (1962). *Genetics* **47**, 1441-1454.

Charlesworth, D. & Willis, J. H. (2009). *Nat Rev Genet* **10**, 783-796.

Chihrane, J. & Laugé, G. (1996). *Biol. Control* **7**, 95-99.
Chittka, L. & Dyer, A. (2012). *Nature* **481**, 154-155.
Cline, L. D. & Press, J. W. (1990). *J. Econ. Entomol.* **83**, 1110-1113.
Cook, J. M. (1993). *Heredity* **71**, 421-435.
Cook, J. M. & Crozier, R. H. (1995). *Trends Ecol. Evol.* **10**, 281-286.
Cook, N., Hubbard, S. F., Karley, A. J. & Russell, J. R. (2013). *Conserv Genet* **14**, 1125-1133.
Corley, M. & Fjerdingstad, E. (2011). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **65**, 889-897.
Cournault, L. & Aron, S. (2009). *Naturwissenschaften* **96**, 1393-1400.
Cowan, D. P. & Stahlhut, J. K. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10374-10379.
Cox, D. R. (1972). *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **34**, 187-220.
Cox, P. D., Mfon, M., Parkin, S. & Seaman, J. E. (1981). *Physiol. Entomol.* **6**, 349-356.
Crawley, M. J. (2007). *The R book*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
Danci, A., Takacs, S., Schaefer, P. W. & Gries, G. (2010). *Entomol. Exp. Appl.* **136**, 142-150.
Darvill, B., Lepais, O., Woodall, L. C. & Goulson, D. (2012). *Mol. Ecol.* **21**, 3988-3995.
Darvill, B., O'Connor, S., Lye, G. C., Waters, J., Lepais, O. & Goulson, D. (2010). *Mol. Ecol.* **19**, 53-63.
Darwish, E., El-shazly, M. & El-Sherif, H. (2003). *J. Stored Prod. Res.* **39**, 265-276.
Davidson, S. A., Peairs, F. B. & Khosla, R. (2007). *J. Econ. Entomol.* **100**, 781-789.
Dawkins, R. (2006). *The selfish gene*. Oxford: Oxford University Press.
de Boer, J. G., Kuijper, B., Heimpel, G. E. & Beukeboom, L. W. (2012). *Evolutionary Applications* **5**, 444-454.
de Boer, J. G., Ode, P. J., Rendahl, A. K., Vet, L. E. M., Whitfield, J. B. & Heimpel, G. E. (2008). *Genetics* **180**, 1525-1535.
de Boer, J. G., Ode, P. J., Vet, L. E. M., Whitfield, J. & Heimpel, G. E. (2007a). *J. Evol. Biol.* **20**, 340-348.
de Boer, J. G., Ode, P. J., Vet, L. E. M., Whitfield, J. B. & Heimpel, G. E. (2007b). *Heredity* **99**, 288-294.
Dettner, K. & Zwölfer, H. (2003). *Lehrbuch der Entomologie*, edited by K. Dettner & W. Peters, pp. 671-699. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
Dickins, G. R. (1936). *Transactions of the Royal Entomological Society of London* **85**, 331-362.
Doums, C., Ruel, C., Clemencet, J., Federici, P., Cournault, L. & Aron, S. (2013). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **67**, 1983-1993.
Duchateau, M. J. & Mariën, J. (1995). *Insectes Sociaux* **42**, 255-266.
Eidmann, H. (1926). *Journal of Pest Science* **10**, 137-139.
Eizaguirre, M., Lopez, C., Asin, L. & Albajes, R. (1994). *Journal of Insect Physiology* **40**, 113-119.
Elias, J., Dorn, S. & Mazzi, D. (2010). *BMC Evolutionary Biology* **10**.
Elias, J., Mazzi, D. & Dorn, S. (2009). *Plos One* **4**, 1-7.
Eliopoulos, P. A. & Stathas, G. J. (2008). *J. Econ. Entomol.* **101**, 982-988.
Elzinga, J. A., Zwakhals, K., Harvey, J. A. & Biere, A. (2007). *Journal of Natural History* **41**, 101-123.
Ephrussi, B. & Beadle, G. W. (1936). *The American Naturalist* **70**, 218-225.
Fauvergue, X., Fleury, F., Lemaitre, C. & Allemand, R. (1999). *Oikos* **86**, 344-356.
Field, S. A. & Keller, M. A. (1993a). *Anim. Behav.* **46**, 1183-1189.
Field, S. A. & Keller, M. A. (1993b). *Journal of Insect Behavior* **6**, 737-750.
Fisher, R. A. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford: Oxford University Press.
Flores-Prado, L. & Niemeyer, H. M. (2010). *Ethology* **116**, 466-471.
Fölsch, W. (1926). *Anz. Schadlingskd. Pflanzenschutz Umweltschutz* **8**, 98-99.
Fox, J. & Weisberg, S. (2011). *An (R) companion to applied regression.* Version Second.
Francini, I. B., Nunes-Silva, C. G. & Carvalho-Zilse, G. A. (2012). *Psyche* **2012**, 7.
Fujiwara, Y., Akita, K., Okumura, W., Kodaka, T., Tomioka, K. & Naito, T. (2004). *J. Hered.* **95**, 81-84.

Fukushima, J., Kuwahara, Y. & Suzuki, T. (1989). *Agricultural and Biological Chemistry* **53**, 3057-3059.
Genieys, P. (1925). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **18**, 143-202.
Gerling, D. (1969). *Israel Journal of Entomology* **9**, 73-81.
Gerling, D. & Rotary, N. (1973). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **3**, 159-162.
Ghimire, M. N. & Phillips, T. W. (2010). *Environ. Entomol.* **39**, 449-458.
Giron, D., Pincebourde, S. & Casas, J. (2004). *Physiol. Entomol.* **29**, 436-442.
Godfray, H. C. J. (1990). *J. Evol. Biol.* **3**, 3-17.
Godfray, H. C. J. (1994). *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton: Princeton University Press.
Goldstein, D. B. (1994). *The American Naturalist* **144**, 176-183.
Gordh, G. & DeBach, P. (1978). *Hilgardia* **46**, 37-75.
Gözüaçik, C., Mart, C. & Kara, K. (2009). *Turkish Journal of Zoology* **33**, 475-477.
Grieshop, M. J., Flinn, P. W. & Nechols, J. R. (2006). *J. Econ. Entomol.* **99**, 1080-1084.
Gu, H. & Dorn, S. (2003). *Anim. Behav.* **66**, 259-264.
Gu, H., Wang, Q. & Dorn, S. (2003). *Ecol. Entomol.* **28**, 422-431.
Guertin, D. S., Ode, P. J., Strand, M. R. & Antolin, M. F. (1996). *Ecol. Entomol.* **21**, 27-33.
Hardy, I. C. W., Griffiths, N. T. & Godfray, H. C. J. (1992). *J. Anim. Ecol.* **61**, 121-129.
Hardy, I. C. W., Pedersen, J. B., Sejr, M. K. & Linderoth, U. H. (1999). *Ethology* **105**, 57-72.
Harpur, B. A., Sobhani, M. & Zayed, A. (2012). *Entomol. Exp. Appl.* **146**, 156-164.
Heimpel, G. E., Antolin, M. F., Franqui, R. A. & Strand, M. R. (1997). *Biol. Control* **9**, 149-156.
Heimpel, G. E., Antolin, M. F. & Strand, M. R. (1999). *Heredity* **82**, 282-291.
Heimpel, G. E. & de Boer, J. G. (2008). *Annual Review of Entomology* **53**, 209-230.
Hein, S., Poethke, H. J. & Dorn, S. (2009). *Ecological Modelling* **220**, 1663-1669.
Henter, H. J. (2003). *Evolution* **57**, 1793-1803.
Herrmann, M., Trenzcek, T., Fahrenhorst, H. & Engels, W. (2005). *Genetics and molecular research : GMR* **4**, 624-641.
Higgins, K. & Lynch, M. (2001). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 2928-2933.
Hoffmann, M. P., Ode, P. R., Walker, D. L., Gardner, J., Van Nouhuys, S. & Shelton, A. M. (2001). *Biol. Control* **21**, 1-10.
Hoffmann, M. P., Pitcher, S. A., Cheever, S. A., Gardner, J., Losey, J. E., Kuhar, T. P., Laub, C. A. & Youngman, R. R. (2006). *Biol. Control* **36**, 345-349.
Hoffmeister, T. S., Babendreier, D. & Wajnberg, E. (2006). edited by T. S. Hoffmeister, D. Babendreier & E. Wajnberg. Wallingford: CABI Publishing.
Holloway, A. K., Heimpel, G. E., Strand, M. R. & Antolin, M. F. (1999). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **92**, 110-116.
Hoy, M. A. & Cave, F. E. (1988). *Hilgardia* **56**, 1-20.
Huang, X. F. (1986). *Chinese Journal of Biological Control* **2**, 78-80.
Jackman, S. (2011). *pscl: Classes and methods for R developed in the political science computational laboratory.* Version 1.04.1.
Jervis, M. A., Ellers, J. & Harvey, J. A. (2008). *Annual Review of Entomology* **53**, 361-385.
Johnson, J. A., Valero, K. A., Hannel, M. M. & Gill, R. F. (2000). *J. Econ. Entomol.* **93**, 1380-1390.
Joyce, A. L., Aluja, M., Sivinski, J., Vinson, S. B., Ramirez-Romero, R., Bernal, J. S. & Guillen, L. (2010). *Biocontrol* **55**, 573-582.
Joyce, A. L., Bernal, J. S., Vinson, S. B., Hunt, R. E., Schulthess, F. & Medina, R. F. (2010). *Entomol. Exp. Appl.* **137**, 153-164.
Joyce, A. L., Hunt, R. E., Bernal, J. S. & Vinson, S. B. (2008). *Entomol. Exp. Appl.* **127**, 39-47.
Kaplan, E. L. & Meier, P. (1958). *Journal of the American Statistical Association* **53**, 457-481.

Kares, E. A., Ebaid, G. H. & El-Sappagh, I. A. (2009). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* **19**, 165-168.
Keller, L. & Ross, K. G. (1998). *Nature* **394**, 573-575.
King, B. H. (1988). *Evolution* **42**, 1190-1198.
Kitthawee, S. (2008). *Biol. Control* **44**, 73-78.
Kneeland, K., Coudron, T. A., Lindroth, E., Stanley, D. & Foster, J. E. (2012). *Entomol. Exp. Appl.* **143**, 120-126.
Krebs, J. R. & Davies, N. B. (1993). *An Introduction ot Behavioural Ecology*, 3 ed. Oxford: Blackwell Publishing.
Krieger, M. J. B., Ross, K. G., Chang, C. W. Y. & Keller, L. (1999). *Heredity* **82**, 142-150.
Krishan, A. (1975). *The Journal of Cell Biology* **66**, 188-193.
Kureck, I. M., Nicolai, B. & Foitzik, S. (2013a). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **67**, 1369-1377.
Kureck, I. M., Nicolai, B. & Foitzik, S. (2013b). *Ethology* **119**, 360-367.
Kuske, S., Widmer, F., Edwards, P. J., Turlings, T. C. J., Babendreier, D. & Bigler, F. (2003). *Biol. Control* **27**, 181-193.
Leberg, P. L. (1992). *Evolution* **46**, 477-494.
Liebert, A. E., Johnson, R. N., Switz, G. T. & Starks, P. T. (2004). *Insectes Sociaux* **51**, 205-211.
Liebert, A. E. & Starks, P. T. (2004). *Annales Zoologici Fennici* **41**, 747-764.
Liu, Y. Q., Bernstein, C. & Thiel, A. (2009). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **63**, 1459-1469.
Liu, Z.-Y., Wang, Z.-L., Wu, X.-B., Yan, W.-Y. & Zeng, Z.-J. (2011). *Insect Science* **18**, 645-651.
Lukáš, J., Bernstein, C., Gu, H. & Dorn, S. (2010). *Entomol. Exp. Appl.* **136**, 80-88.
MacBride, D. H. (1946). *Genetics* **31**, 224-224.
MacKenzie, D. I., Nichols, J. D., Hines, J. E., Knutson, M. G. & Franklin, A. B. (2003). *Ecology* **84**, 2200-2207.
Martin, T. G., Wintle, B. A., Rhodes, J. R., Kuhnert, P. M., Field, S. A., Low-Choy, S. J., Tyre, A. J. & Possingham, H. P. (2005). *Ecology Letters* **8**, 1235-1246.
Mazzi, D., Hatt, F., Hein, S. & Dorn, S. (2011). *Physiol. Entomol.* **36**, 47-53.
Metzger, M., Bernstein, C., Hoffmeister, T. S. & Desouhant, E. (2010). Does kin recognition and sib-mating avoidance limit the risk of genetic incompatibility in a parasitic wasp?, Vol. 5, Plos One, pp. 1-6.
Naito, T. & Suzuki, H. (1991). *J. Hered.* **82**, 101-104.
Nelder, J. A. & Wedderburn, R. W. M. (1972). *Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)* **135**, 370-384.
Niyibigira, E. I., Overholt, W. A. & Stouthamer, P. (2004a). *Applied Entomology and Zoology* **39**, 717-725.
Niyibigira, E. I., Overholt, W. A. & Stouthamer, R. (2004b). *Applied Entomology and Zoology* **39**, 705-715.
Ode, P. J., Antolin, M. F. & Strand, M. R. (1995). *Anim. Behav.* **49**, 1239-1248.
Ode, P. J., Antolin, M. F. & Strand, M. R. (1998). *Ecol. Entomol.* **23**, 314-318.
Ode, P. J., Antolin, M. F. & Strand, R. R. (1997). *Oecologia* **109**, 547-555.
Oku, K., Okutani-Akamatsu, Y. & Watanabe, T. (2010). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **103**, 802-805.
Osborne, J. L., Martin, A. P., Carreck, N. L., Swain, J. L., Knight, M. E., Goulson, D., Hale, R. J. & Sanderson, R. A. (2008). *J. Anim. Ecol.* **77**, 406-415.
Owen, R. E. & Packer, L. (1994). *Heredity* **72**, 219-227.
Peitsch, D., Fietz, A., Hertel, H., Souza, J., Ventura, D. F. & Menzel, R. (1992). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **170**, 23-40.
Penn, D. J. & Potts, W. K. (1999). *The American Naturalist* **153**, 145-164.
Periquet, G., Hedderwick, M. P., El Agoze, M. & Poirié, M. (1993). *Heredity* **70**, 420-427.
Petters, R. M. & Mettus, R. V. (1980). *J. Hered.* **71**, 353-356.

Pinto, J. D., Stouthamer, R., Platner, G. R. & Oatman, E. R. (1991). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **84**, 37-46.
Pölitz, B., Schnee, H. & Kühne, A. (2007). *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* **59**, 264-266.
Poos, F. W. (1927). *The Ohio Journal of Science* **27**, 47-94.
Qureshi, J. A., Buschman, L. L., Throne, J. E. & Ramaswamy, S. B. (2005). *Journal of Applied Entomology* **129**, 281-292.
Reed, D. H. & Bryant, E. H. (2001). *Zoo Biology* **20**, 145-156.
Reusch, T. B. H., Haberli, M. A., Aeschlimann, P. B. & Milinski, M. (2001). *Nature* **414**, 300-302.
R developmental core team (2011). *R: A language and environment for statistical computing.* Version 2.13.1.
R help (2010). *Question on overdispersion,* http://r.789695.n4.nabble.com/Question-on-overdispersion-td3049898.html.
Ridley, M. (1993). *The American Naturalist* **142**, 893-910.
Ross, K. G., Vargo, E. L., Keller, L. & Trager, J. C. (1993). *Genetics* **135**, 843-854.
Rothe, G. (2007). *Zelluläre Diagnostik*, edited by U. Sack, A. Tárnok & G. Rothe, pp. 27-70. Basel: Karger Verlag.
Ruf, D., Dorn, S. & Mazzi, D. (2011). *Anim. Behav.* **81**, 1083-1089.
Ruf, D., Mazzi, D. & Dorn, S. (2010). *Behav. Ecol.* **21**, 1301-1307.
Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W. & Hanski, I. (1998). *Nature* **392**, 491-494.
Saxena, H., Ponnusamy, D. & Iquebal, M. A. (2012). *Biocontrol Science and Technology* **22**, 305-318.
Schmieder, S., Colinet, D. & Poirié, M. (2012). *Nat Commun* **3**, 895.
Schneider, M. I. & Viñuela, E. (2007). *Biol. Control* **43**, 271-277.
Shabalina, S. A., Yampolsky, L. Y. & Kondrashov, A. S. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13034-13039.
Shoukat, G. A. (2012). *Journal of Agricultural Science and Technology* **14**, 267-274.
Skopik, S. D. & Takeda, M. (1980). *American Journal of Physiology* **239**, R259-R264.
Speicher, B. R. & Speicher, K. G. (1940). *The American Naturalist* **74**, 379-382.
Stouthamer, R. & Kazmer, D. J. (1994). *Heredity* **73**, 317-327.
Stouthamer, R., Luck, R. F. & Werren, J. H. (1992). *Environ. Entomol.* **21**, 427-435.
Strand, M. R. & Casas, J. (2007). *Behavioural ecology of insect parasitoids*, edited by E. Wajnberg, C. Bernstein & J. van Alphen, pp. 113-128. London: Blackwell.
Strand, M. R. & Godfray, H. C. J. (1989). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **24**, 421-432.
Sudheendrakumar, V. V., Mohamed, U. V. K., Abdurahman, U. C. & Narendran, T. C. (1978). *Agricultural Research Journal of Kerala* **16**, 224-226.
Takahashi, J., Ayabe, T., Mitsuhata, M., Shimizu, I. & Ono, M. (2008). *Insectes Sociaux* **55**, 43-50.
Takasu, K., Ode, P. J., Antolin, M. F. & Strand, M. R. (1997). *Behav. Ecol.* **8**, 647-654.
Tavares, M. G., Irsigler, A. S. T. & Campos, L. A. D. (2003). *Apidologie* **34**, 449-455.
Taylor, A. D. (1988). *J. Anim. Ecol.* **57**, 163-172.
Temerak, S. A. (1983a). *Entomorphaga* **28**, 145-150.
Temerak, S. A. (1983b). *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie-Journal of Applied Entomology* **96**, 37-41.
Temerak, S. A. (1984). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **97**, 210-213.
Teuschl, Y. & Blanckenhorn, W. U. (2007). *Anim. Behav.* **73**, 85-97.
Thiel, A. & Weeda, A. C. (in press). *Journal of Insect Science*.
Thiel, A., Weeda, A. C., de Boer, J. G. & Hoffmeister, T. S. (2013). *Frontiers in Zoology* **10**, 43.
Thompson, S. N. (1999). *Annual Review of Entomology* **44**, 561-592.
Townsend, C. R., Harper, J. L. & Begon, M. E. (2002). *Ökologie*, 2 ed. Berlin: Springer Verlag.

Traynier, R. M. M. & Wright, R. H. (1972). *Entomol. Exp. Appl.* **15**, 509-516.
Trivers, R. L. & Willard, D. E. (1973). *Science* **179**, 90-92.
Tunçbilek, A. Ş. & Ayvaz, A. (2003). *AFS* **76**, 176-180.
Tyre, A. J., Tenhumberg, B., Field, S. A., Niejalke, D., Parris, K. & Possingham, H. P. (2003). *Ecological Applications* **13**, 1790-1801.
Val-Laillet, D. & Nowak, R. (2008). *Applied Animal Behaviour Science* **111**, 173-182.
van Wilgenburg, E., Driessen, G. & Beukeboom, L. W. (2006). *Frontiers in Zoology* **3**, 1-15.
van Zweden, J. S., Dreier, S. & d'Ettorre, P. (2009). *Journal of Insect Physiology* **55**, 159-164.
Vayssade, C., de Fazio, C., Quaglietti, B., Auguste, A., Ris, N. & Fauvergue, X. (2014). *PLoS ONE* **9**, e97733.
Velasco, P., Revilla, P., Monetti, L., Butron, A., Ordas, A. & Malvar, R. A. (2007). *Maydica* **52**, 195-203.
Venkatesan, T., Jalali, S. K. & Srinivasamurthy, K. (2009). *International Journal of Pest Management* **55**, 257-263.
Villacide, J. M. & Corley, J. C. (2008). *Agricultural and Forest Entomology* **10**, 341-345.
Villagra, C. A., Pinto, C. F., Penna, M. & Niemeyer, H. M. (2011). *Bulletin of Entomological Research* **101**, 573-579.
Weeda, A. C. (2008). Diplomarbeit thesis*,* Universität Bremen, Bremen.
West, S. A., Flanagan, K. E. & Godfray, H. C. J. (1999). *Anim. Behav.* **57**, 265-275.
Whidden, T. L. & Owen, R. E. (2011). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **104**, 83-87.
Whitehorn, P. R., Tinsley, M. C., Brown, M. J. F., Darvill, B. & Goulson, D. (2009). *Bmc Evolutionary Biology* **9**.
Whiting, P. W. (1943). *Genetics* **28**, 365-382.
Whiting, P. W. & Anderson, R. L. (1932). *The American Naturalist* **66**, 420-432.
Yamauchi, K., Yoshida, T., Ogawa, T., Itoh, S., Ogawa, Y., Jimbo, S. & Imai, H. T. (2001). *Insectes Sociaux* **48**, 28-32.
Yasui, Y. (1998). *Trends Ecol. Evol.* **13**, 246-250.
Zayed, A. & Packer, L. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10742-10746.
Zeileis, A. & Hothorn, T. (2002). *R News* **2**, 7-10.
Zhou, Y., Gu, H. & Dorn, S. (2006). *Heredity* **96**, 487-492.
Zhou, Y., Gu, H. & Dorn, S. (2007). *Biol. Control* **40**, 273-279.
Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A. & Smith, G. M. (2009). *Mixed effects models and extensions in exology with R*. New York: Springer.

9.2 Danksagung

Ich danke Thomas S. Hoffmeister und Andra Thiel für die Betreuung meiner Doktorarbeit, für Ratschläge und anregenden Diskussionen, für Kritik und aufmunternden Worte sowie für die Freiräume, die sie mir auf meinem Weg zum selbstständigen Forschen ließen.

AMW Nützlinge GmbH, insbesondere Bernd Wührer und Olaf Zimmermann, danke ich für die Bereitstellung der verwendeten Arten und das Zusenden frischer Tiere, wenn die Zuchten nicht so gut liefen oder für eine Versuchsreihe dringend mehr Wirte gebraucht wurden.

Für die Arbeitsteilung bei der Betreuung der verschiedenen Insektenzuchten danke ich David Kosior, Nils B. Linek, Julia B. Orchard, Monika Prause, Laura Rogge, Silke Rykena und Agnes Zimmer.

Ich danke Erika Lorenz, Laura Rogge und Dieter Wienrich für ihre technische und logistische Unterstützung. Vor allem danke ich Erika Lorenz für den steten Nachschub an Agar und Röhrchen.

Für die Zuarbeit während der Versuche bzw. Versuchsvorbereitung danke ich Dorothee Blattner, Nils B. Linek, Erika Lorenz, Jan-David Pohl, Anastasia L. Roberts, Silke Rykena, Heike Schmitz-Diaspero, Andra Thiel und Mingming Zhu.

Der AG Evolutionäre Genetik, Universität Groningen, NL, sei für die herzliche Aufnahme und das zur Verfügung stellen von Laborräumen und Materialien gedankt. Vor allem bei Jetske G. de Boer möchte ich mich für das Erlernen der Duchflusszytometrie, die Problemlösung bei technischen Problemen und die Diskussion meiner Ergebnisse bedanken.

Der AG Marine Biologie, Universität Groningen, NL, und vor allem Willem van de Poll sei für die Benutzung des Durchflusszytometers und der Hilfe bei technischen Problemen gedankt.

Der AG Molekulare Zellbiologie, Universität Groningen, NL, sei für die kurzfristig erlaubte Benutzung ihres Durchflusszytometers gedankt. Besonderer Dank geht hierbei an Loknath Gidijala, der die Einweisung in die Gerätebedienung gab und bei Problemen half.

Der AG Molekulare Ökologie, MPI Bremen, sei für die Benutzung ihres Durchflusszytometers gedankt. Besonders Bernhard Fuchs danke ich für die auffrischende Einführung in die Durchflusszytometrie und die technische Unterstützung.

Bernd Wührer und Olaf Zimmermann möchte ich für die gute Zusammenarbeit am Kooperationsprojekt und die anregenden Diskussionen bei unseren Treffen und Telefonaten danken.

Für die Finanzierung meiner Drittmittelstelle im Kooperationsprojekt KF215290MD8, das Thomas Hoffmeister bewilligt wurde, danke ich dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi).

Ich danke der AG Populations- und Evolutionsökologie für die anregenden Gespräche, die motivierenden Worte, das angenehme Arbeitsklima und die geselligen Pausen zwischendurch.

AMW Nützlinge GmbH und Nils B. Linek danke ich für die mir zur Verfügung gestellten Abbildungen.

Für Kommentare zu früheren Versionen dieser Arbeit danke ich Thomas Hoffmeister, Mareike Koppik, Katharina Merkel, Silke Rykena, Heike Schmitz-Diaspero, Andra Thiel und Jennifer Uhlig-Herrmann.

Mein besonderer Dank geht an Silke Rykena, die die letzten Tage vor der Abgabe bei mir war und sich neben der Beseitigung ulkiger Wortkreationen um mein leibliches Wohl kümmerte.

Meinen Eltern danke ich für ihre finanzielle und moralische Unterstützung, die kleinen Auszeiten zwischendurch und die Geborgenheit, wenn der Alltag mal wieder im Chaos versank.

9.3 Erklärung

Erklärung gemäß § 6 Abs. 5 der Promotionsordnung der Universität Bremen für die mathematischen, natur- und ingenieurwissenschaftlichen Fachbereiche vom 14. März 2007

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Komplementäre Geschlechtsbestimmung bei Brackwespen: Inzuchtdepression und Inzuchtvermeidung

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Bremen, den 04. November 2014

_____

(Anne Weeda)