

Stratégies reproductrices chez la fourmi *Cataglyphis cursor*

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biologiques
par
Morgan Percy

Directeur de Thèse
Serge Aron

Université Libre de Bruxelles (Belgique)

Rapporteurs

Guy Josens

Université Libre de Bruxelles (Belgique)

Yves Roisin

Université Libre de Bruxelles (Belgique)

Michel Baguette

Université Catholique de Louvain (Belgique)

Alain Lenoir

Université François-Rabelais, Tours (France)

et

Jacques M. Pasteels

Université Libre de Bruxelles (Belgique)

- Décembre 2005 -

Remerciements

Je tenais à remercier chaleureusement Serge Aron pour ses qualités certaines de chef d'équipe et son enthousiasme communicatif. Travailler sous son égide s'est révélée une expérience passionnante. Je saisirai toute opportunité future de travailler avec lui sans hésiter.

Merci au Service d'Etho-Ecologie Evolutive, ses chercheurs, son personnel, ses étudiants, où il a toujours fait bon travailler dans une ambiance conviviale et humaine.

Merci à Claudie Doums et au laboratoire d'Ecologie de Jussieu (Paris VI) pour leur accueil et leur encadrement si efficace.

Merci à ma famille, ma belle-famille, à mes amis, pour la chance que vous représentez tous à mes yeux.

Et enfin, merci à toi, Vanessa, pour ton soutien inconditionnel, pour qui tu es et pour qui tu seras.

Résumé

La sélection de la parentèle est le concept actuellement le plus fréquemment avancé pour justifier l'évolution et le maintien d'une caste ouvrière stérile chez les Hyménoptères sociaux. La fourmi méditerranéenne *Cataglyphis cursor* possède plusieurs traits biologiques qui font de cette espèce un modèle particulièrement intéressant pour tester les prédictions de la théorie de la sélection de la parentèle, le plus important d'entre eux étant la capacité des ouvrières, qui ne s'accouplent jamais, à produire une descendance mâle (haploïde) par parthénogenèse arrhénotoque, ou femelle (diploïde) par parthénogenèse thélytoque. Nos analyses génétiques, basées sur des marqueurs microsatellites développés au préalable pour cette espèce, ont révélé que les reines utilisent la reproduction sexuée et asexuée respectivement pour la production de la caste ouvrière et reproductrice. L'analyse du pedigree des reproductrices issues de la reproduction asexuée nous a permis d'identifier le mécanisme cytologique de la parthénogenèse thélytoque et d'estimer la proportion de reines issues de la reproduction des ouvrières au sein de la population. De plus, bien que les reines soient capables de produire une descendance diploïde (femelle) par parthénogenèse thélytoque, elles ont conservé la reproduction sexuée pour la caste ouvrière et s'accouplent avec plusieurs mâles. Ceci indique que la reproduction sexuée a une fonction importante au niveau de la colonie, et nous avons testé certaines des hypothèses avancées pour justifier l'évolution de la polyandrie. Finalement, nous avons étudié l'impact des stratégies de dispersion de cette espèce sur le sex-ratio de la descendance sexuée. Ces résultats confirment l'intérêt que représente l'étude des stratégies reproductrices chez les Hyménoptères sociaux pour tester les prédictions de diverses théories en biologie évolutives et ouvrent également de nouvelles perspectives de recherche, tant chez *C. cursor* que chez d'autres espèces appartenant au genre *Cataglyphis*.

Summary

Kin selection is, to date, the most widely accepted theory to justify the evolution of a sterile worker caste among social Hymenoptera. The Mediterranean ant *Cataglyphis cursor* represents an interesting biological model for several reasons, the most important of them being the ability for unmated workers to produce haploid (male) offspring, through arrhenotokous parthenogenesis, and diploid (female) offspring, through thelytokous parthenogenesis. Our genetic analyses, based on microsatellite loci developed for this purpose, revealed that queens selectively use sexual and asexual reproduction to produce workers and sexuals, respectively. Pedigree analyses allowed us to identify the cytological mechanism involved in thelytokous parthenogenesis and to estimate the proportion of worker-produced queens in the study population. Although *C. cursor* queens do not require mating to produce diploid offspring, they have retained sexual reproduction and mate multiply with up to 8 males. This suggests that sexual reproduction has important benefits for colony function, and we tested several hypotheses accounting for the evolution of polyandry. Eventually, we studied the effect of dispersal strategies on sex-ratio of the sexual brood. These results confirm the interest of investigating the reproductive strategies of social Hymenoptera to test the predictions of diverse theories in the field of evolutionary biology, and open new research perspectives in *C. cursor* and other ants of the *Cataglyphis* genera.

Table des matières

Introduction	1
1. Sélection de la parentèle et évolution sociale chez les Hyménoptères	
1.1. Haplo-diploïdie et asymétries de parenté	3
1.2. Nombre d'accouplements des reines	4
1.3. Nombre de reines	7
1.4. La reproduction sexuée et asexuée	8
1.4.1. Parthénogenèse arrhénotoque et thélytoque	9
1.4.2. Bases cytologiques et conséquences génétiques de la parthénogenèse	10
1. <i>Parthénogenèse apomictique</i>	10
2. <i>Parthénogenèse automictique</i>	11
3. <i>Parthénogenèse générative ou haploïde</i>	12
1.4.3. La parthénogenèse thélytoque chez les Hyménoptères	12
2. Reproduction des sociétés: conflits, dispersion et sex-ratio	
2.1. Les conflits sociaux	13
2.1.1. Conflits entre reines et ouvrières quant au sex-ratio de la descendance sexuée	13
2.1.2. Conflits entre reines et ouvrières quant à l'origine des mâles	14
2.1.3. Conflits entre ouvrières quant à l'origine des mâles	15
2.2. Les modes de dispersion	15
2.3. Le sex-ratio	15
Objectifs	18
Article 1. Développement de marqueurs microsatellites pour la fourmi <i>Catalyphis cursor</i>	20
Abstract	21
Results	21
References	23
Article 2. Utilisation conditionnelle de la reproduction sexuée et de la parthénogenèse pour la production des ouvrières et des reines chez la fourmi <i>Cataglyphis cursor</i>	24
Abstract	25
Results	25
References	27
Supporting online material	29
Article 3. La parthénogenèse thélytoque et ses conséquences sur la consanguinité	30
Abstract	32
Introduction	33

Material and methods	36
Results	39
Discussion	40
References	43
Figures	47
Article 4. Accouplements multiples chez la fourmi <i>Cataglyphis cursor</i>. Test des hypothèses de la limitation spermatique et du fardeau en mâles diploïdes	52
Abstract	54
Introduction	55
Material and methods	57
Results	60
Discussion	61
References	65
Article 5. Compétition locale pour les ressources et sex-ratio chez la fourmi <i>Cataglyphis cursor</i>	71
Abstract	73
Introduction	74
Material and methods	77
Results	80
Discussion	82
References	85
Figures	89
Conclusion	94
Conclusions générales	94
Perspectives	97
Références	100

Introduction

De tous temps, les sociétés d'insectes ont fasciné les humains, comme en témoigne ce verset de la Bible "*Va vers la fourmi, paresseux; considère ses voies et deviens sage*" (Proverbes 6:6), qui souligne la nature industrielle de leur caste ouvrière et la présomption que les humains tireront de précieux enseignements à les étudier. Avec l'émergence de la théorie de l'évolution, formalisée pour la première fois par Darwin (1859), les insectes sociaux devaient faire l'objet de toutes les attentions de la part des biologistes. En effet, la sélection naturelle favorise les organismes qui ont le meilleur succès reproductif, c'est-à-dire ceux qui ont le plus de descendants atteignant la maturité sexuelle et capables de se reproduire à leur tour. Dans la nature, on doit donc s'attendre à ce que les individus manifestent essentiellement des comportements égoïstes, organisés de façon à optimiser leur propre succès reproductif individuel et non celui des groupes ou des espèces. Pourtant, un nombre sans cesse croissant d'expériences et d'observations montrent que les animaux peuvent se comporter de manière altruiste. Un comportement altruiste est défini comme un comportement qui accroît le succès reproductif du bénéficiaire, tout en diminuant le succès reproductif de son auteur (Wilson, 1975; Hamilton, 1964a,b); l'apparition éventuelle de gènes engendrant des comportements altruistes devrait donc être systématiquement contrée par la sélection naturelle. Or, ce n'est pas le cas: l'altruisme de reproduction est répandu dans le règne animal (Dugatkin, 1997; Aron & Passera, 2000). Chez les insectes sociaux (termites, abeilles, guêpes, fourmis), l'altruisme de reproduction est même poussé à l'extrême: les ouvrières ne se reproduisent plus et élèvent la progéniture de quelques femelles fertiles (Hölldobler & Wilson, 1990; Passera & Aron, 2005). L'existence d'une caste ouvrière stérile pose donc une énigme évolutive majeure: comment la sélection naturelle peut-elle justifier l'évolution d'individus altruistes qui ne se reproduisent jamais?

Darwin (1859) suggéra le premier que l'évolution d'une caste ouvrière stérile pouvait se produire chez les insectes sociaux (abeilles, fourmis, guêpes, termites) si et seulement si les individus de cette caste sont "profitables à la communauté" (Bourke & Franks, 1995). Actuellement, plusieurs hypothèses ont été avancées pour justifier l'évolution de l'altruisme de reproduction par sélection naturelle chez les animaux (Dugatkin, 1997; Aron & Passera, 2000). La plus importante d'entre elles, tant par ses

conséquences que par le support expérimental dont elle jouit à travers tout le règne animal, est la théorie de la sélection de la parentèle ou théorie d'Hamilton.

Le principe de base de la sélection de la parentèle repose sur l'idée que les individus peuvent transmettre des copies de leurs propres gènes dans les générations suivantes, non seulement via leur propre reproduction directe, mais aussi indirectement en favorisant la reproduction d'individus apparentés (Hamilton, 1964a,b).

En effet, des proches parents partagent des copies de gènes hérités de leurs ancêtres communs. La théorie d'Hamilton définit dans quelles conditions un gène de l'altruisme peut se répandre au sein d'une population (pour simplifier, Hamilton considère que les comportements altruistes sont codés par un unique gène). Elle prédit que la fréquence de ce gène augmentera lorsque le coût qu'il subit suite à la réalisation d'un acte altruiste est inférieur à l'accroissement de sa fréquence via la reproduction du bénéficiaire de l'acte. La formalisation mathématique de ce raisonnement est donnée par la "règle d'Hamilton":

$$c < b \times r$$

où c correspond au coût subi par le gène altruiste, coût qui se traduit par une réduction de la dispersion du gène altruiste liée à la diminution du succès reproductif de son porteur, b correspond au bénéfice dont jouit le destinataire de l'acte altruiste, ce gain se traduisant par une augmentation de son succès reproductif, donc par la dispersion de ses gènes - dont éventuellement le gène de l'altruisme - dans les générations futures, et r est la corrélation génétique entre les individus et correspond à la probabilité que le destinataire de l'acte altruiste porte aussi le gène responsable de l'altruisme.

La théorie d'Hamilton soutient donc que l'évolution de l'altruisme est influencée par des facteurs génétiques (la corrélation génétique r entre les individus) et par des facteurs écologiques et ergonomiques (pouvant affecter les coûts et les bénéfices de la reproduction). La sélection de la parentèle n'est pas l'apanage des sociétés d'insectes et a été démontrée à travers le règne animal, depuis les unicellulaires jusqu'aux primates supérieurs (Aron & Passera, 2000).

Ainsi, lorsque le milieu devient défavorable, les amibes acrasiales *Dictyostelium discoideum*, incapables de se déplacer seules à la recherche d'un milieu

plus favorable, s'agglutinent en un grex doué de mouvements orientés. Celui-ci gagne la surface du substrat et s'organise: la base se transforme en pied qui élève une capsule sporifère (forme de résistance). Plus le support est long, plus la capsule a des chances d'atteindre l'air libre et de pouvoir fructifier. Les amibes du pied manifestent donc un altruisme de reproduction en sacrifiant leur reproduction pour favoriser la reproduction des amibes de la capsule sporifère. Gadagkar & Bonner (1994) ont montré que les grex composés d'amibes plus apparentées forment des pieds plus longs. A l'inverse, les grex composés d'amibes moins apparentées forment des pieds plus courts, avec une capsule sporifère plus grosse, une majorité d'amibes optant pour un comportement "égoïste". Queller *et al.* (2003) ont mis en évidence l'effet "barbe verte" (*greenbeard*; Dawkins 1976) d'un gène codant pour une protéine d'adhésion de la membrane cellulaire chez *D. discoideum*, le gène *csA*. Lors de la formation du grex, les amibes porteuses de ce gène voient leur agrégation facilitée, tandis que les autres sont le plus souvent exclues de l'agrégat. L'existence d'un gène "barbe verte" représente à lui seul un remarquable exemple en faveur de la sélection de la parentèle, dans la mesure où il favorise directement l'altruisme envers d'autres individus porteurs de ce gène, et donc potentiellement apparentés.

Le rat-taupe *Heterocephalus glaber* possède une organisation sociale de type matriarcale, où une femelle dominante monopolise la reproduction pendant que les autres individus de la colonie sont chargés de toutes les tâches d'entretien: soins aux jeunes, creusement des galeries, ravitaillement, défense contre les prédateurs, etc. Les femelles dominantes ont un comportement coercitif envers les autres reproductrices potentielles, ce qui a pour effet d'inhiber le développement ovarien chez ces dernières. Reeve & Sherman (1991) ont montré que l'agressivité des dominantes est supérieure à l'encontre des individus les moins

apparentés. Les conditions hostiles (environnement aride, ressources éparses, risques de prédation) sont vraisemblablement à l'origine de l'évolution de l'eusocialité chez le rat-taupe. Si les chances de survie d'un couple seul sont maigres, les ouvriers peuvent accroître leur succès reproductif indirect en choisissant de contribuer à la reproduction de dominants apparentés.

1. Sélection de la parentèle et évolution sociale chez les hyménoptères

1.1. Haplo-diploïdie et asymétries de parenté

Comme l'indique l'équation d'Hamilton, la probabilité d'apparition de l'altruisme est d'autant plus élevée que la corrélation génétique r entre l'altruiste et le bénéficiaire est élevée. Les hyménoptères sociaux constituent à cet égard un remarquable modèle d'application de la théorie de la sélection de la parentèle. Comme c'est le cas chez tous les hyménoptères, la détermination du sexe est sous la dépendance d'un ou plusieurs loci multialléliques (Crozier & Pamilo, 1996). Si, lors de la fécondation de l'ovule, les loci codeurs du sexe portés par le mâle sont différents de ceux portés par la femelle (hétérozygotie pour les loci A^iA^j), l'œuf sera toujours de sexe femelle (figure 1). Par contre, si lors de la fécondation, il y a homozygotie aux loci sexuels (A^iA^i ou A^jA^j) il en résultera un mâle diploïde. Comme nous l'avons vu, lorsqu'il n'y a pas de fécondation, l'œuf est hémizygoté (A^i ou A^j) et donne un mâle haploïde par parthénogenèse arrhénotoque (voir p. 9). Ce n'est que très récemment que le gène responsable de la différenciation sexuelle a été isolé chez un hyménoptère social, l'abeille domestique *Apis mellifera* (Beye *et al.*, 2003). Ce gène, appelé *csd*, est caractérisé par l'existence d'un très grand nombre d'allèles, responsables du très fort polymorphisme de

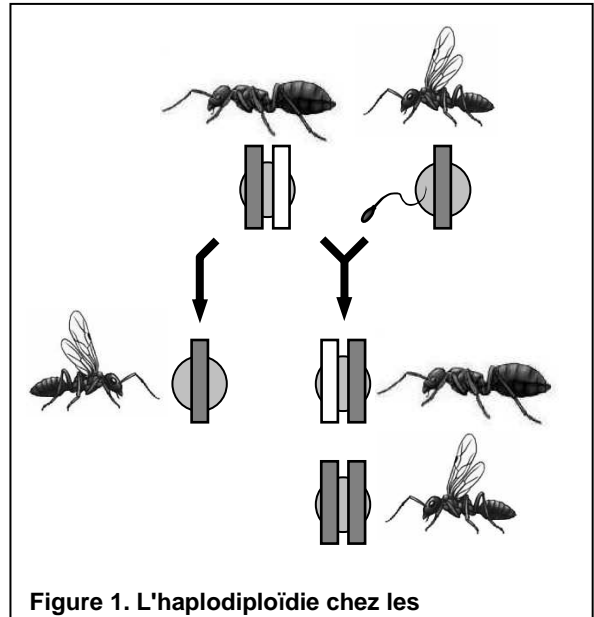


Figure 1. L'haplodiploïdie chez les hyménoptères.

Les femelles, diploïdes, sont issues d'œufs fertilisés, alors que les mâles, haploïdes, se développent à partir d'œufs non fécondés, par parthénogenèse arrhénotoque. Lorsqu'il y a homozygotie du ou des loci *csd*, l'œuf se développera en mâle diploïde.

Credit dessin: Taina Litwak

la protéine quant à sa séquence en acides aminés.

Les mâles diploïdes étant toujours homozygotes au locus *csd*, leur apparition est grandement favorisée par la consanguinité (Cook & Crozier, 1995). Ces mâles sont habituellement stériles car dépourvus de spermatozoïdes (Hung *et al.*, 1974). Dans les rares cas où ils ne le sont pas, ils produisent des gamètes diploïdes et engendrent par conséquent des femelles triploïdes qui sont toujours stériles (Krieger *et al.*, 1999). Les mâles diploïdes constituent donc un fardeau pour la société en raison du coût énergétique que leur élevage occasionne. Ils sont pourtant connus chez plusieurs espèces de fourmis (Pamilo *et al.*, 1994; Ross & Fletcher, 1986). De même, les femelles peuvent parfois se développer à partir d'œufs non fécondés par parthénogenèse thélytoque (voir p. 12; Winkler, 1920, cité dans Suomalainen *et al.*, 1987).

En règle générale, les mâles d'hyménoptères n'ont donc pas de père et, étant haploïdes, leurs cellules sexuelles ne

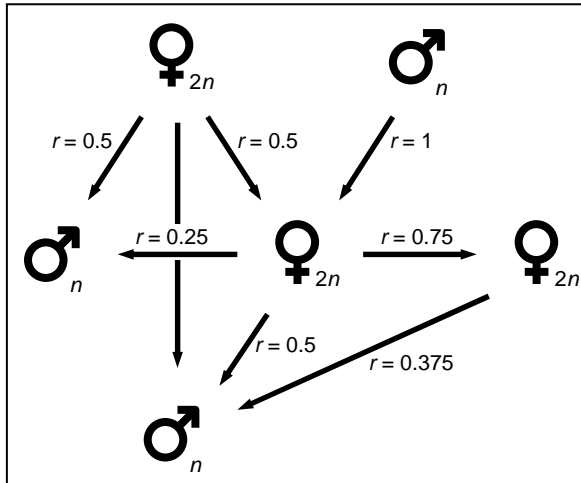


Figure 2. Parenté au sein des sociétés d'hyménoptères

Les mâles sont haploïdes et transmettent l'intégralité de leurs gènes à leurs filles. Par contre, ils ne transmettent pas leurs gènes aux mâles de la société. Ceci explique pourquoi les ouvrières ont une parenté élevée avec leurs sœurs qu'avec leurs frères.

Redessiné d'après Aron & Passera (2000).

subissent pas de méiose réductionnelle, de telle sorte que tous leurs spermatozoïdes sont identiques. Un tel système de détermination sexuelle a des conséquences génétiques importantes dans la mesure où il induit des asymétries de parenté entre les membres d'une même société (figure 2). En effet, lorsque les sociétés sont composées d'une unique reine accouplée avec un seul mâle, les filles présentent en moyenne une plus grande parenté avec leurs sœurs (coefficient de parenté $r = 0.75$) qu'avec leurs propres filles et fils ($r = 0.5$). Ainsi, les ouvrières ont en moyenne $3/4$ de gènes en communs avec leurs sœurs, alors qu'elles n'en partagent que $1/2$ avec leurs propres descendants. Selon la théorie d'Hamilton, de telles asymétries génétiques associées à la recherche du meilleur succès reproductif auraient conduit les ouvrières des sociétés d'hyménoptères à favoriser la descendance des parents aux dépens de leur propre progéniture. La caractéristique principale des sociétés d'hyménoptères - l'existence d'une division du travail entre reines reproductrices et ouvrières généralement stériles assurant l'élevage de la descendance - conforte une telle hypothèse.

1.2. Nombre d'accouplements des reines

Divers facteurs sont connus pour affecter la structure sociale au sein des colonies. Par exemple, lorsque la reine s'accouple avec plusieurs mâles, une situation appelée polyandrie, la corrélation génétique moyenne entre les ouvrières issues des différentes lignées paternelles ($r = 0.25 + 0.5 \times M_p$; avec M_p = nombre de pères différents) chute de 0.75 à 0.25 à mesure que le nombre d'accouplements de la reine augmente (figure 3). La chute du degré de parenté au sein des sociétés diminue d'autant le succès reproductif indirect des ouvrières, ce qui fragilise la cohésion sociale.

La polyandrie est rare au sein des Formicidae. Les fourmis sont strictement monoandres ou occasionnellement polyandres. Dans ce dernier cas, le nombre d'accouplements effectifs ($M_{e,p}$) ne dépasse que rarement 2 (Strassmann, 2001). Les exceptions sont rares, bien que parfois notables; elles ont été détectées dans quelques espèces appartenant aux genres *Atta* ($M_{e,p} = 3.1$, Murakami *et al.*, 2000), *Acromyrmex* ($M_{e,p} = 3.9$, Boomsma *et al.*, 1999), *Pogonomyrmex* ($M_{e,p} = 6.8$, Cole & Wiernasz, 2000), *Dorylus* ($M_{e,p} = 17.5$, Kronauer *et al.*, 2004) et *Ecyton* ($M_{e,p} = 33.4$, Denny *et al.*, 2004).

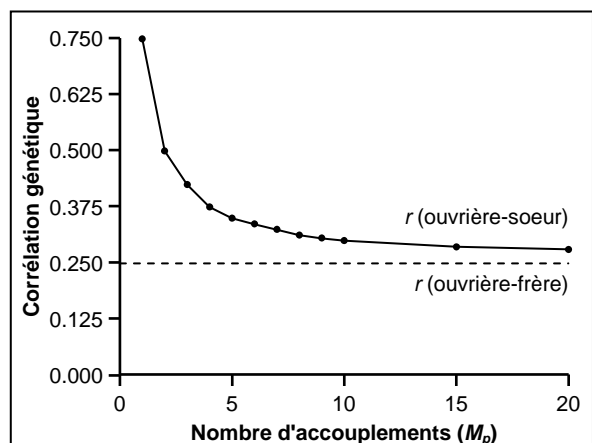


Figure 3. Corrélation génétique entre les ouvrières et les reproducteurs des deux sexes

Les asymétries de parenté pour les ouvrières envers leurs sœurs et leurs frères diminuent avec le nombre d'accouplements de la reine (M_p).

Plusieurs auteurs ont avancé des hypothèses (non exclusives) pour justifier l'évolution et le maintien de la polyandrie (Crozier & Fjerdingstad, 2001):

a. L'hypothèse de la limitation spermatique postule que plusieurs accouplements permettraient de fonder de plus grandes sociétés (Cole, 1983). En d'autres termes, la polyandrie aurait été sélectionnée pour permettre aux reines d'accumuler suffisamment de sperme pour assurer une descendance nombreuse. Crozier & Page (1985) ont critiqué cette hypothèse, faisant remarquer que la sélection devrait favoriser les mâles portant assez de sperme pour correspondre aux besoins des reines. Toutefois, la quantité de sperme portée par les mâles pourrait être limitée par d'autres contraintes, telle la compétition entre mâles (Hölldobler & Wilson, 1990) ou un compromis entre la quantité de sperme et l'aptitude au vol (Fjerdingstad & Boomsma, 1997). Chez l'abeille domestique, *Apis mellifera*, l'hypothèse de la limitation spermatique avait été écartée pour expliquer le nombre extrême d'accouplements (jusque 45; Moritz *et al.*, 1995), dans la mesure où les reines ne conservaient pas plus de sperme que ce qu'un seul mâle pouvait fournir. Cependant, des observations montrent que le transfert du sperme jusqu'à la spermathèque, suite à la copulation, n'est pas aussi trivial que présumé. Les inséminations artificielles indiquent que la quantité de sperme peut se révéler limitante si la reine est fécondée par moins de 10 mâles (Woyke, 1962). De plus, les mâles de la sous-espèce sud-africaine *A. m. capensis* possèdent moins de sperme que les mâles de la sous-espèce européenne *A. m. carnica* (Rinderer *et al.*, 1985; Buys 1990), et une étude récente a montré que les mâles de *A. m. capensis* s'accouplent significativement plus souvent que les reines de *A. m. carnica* (Kraus *et al.*, 2004). Ceci ne constitue pas une démonstration en soi de la limitation spermatique chez *A. mellifera*, mais

suggère que la quantité de sperme pourrait finalement jouer un rôle dans le nombre d'accouplements de l'abeille domestique. Chez les fourmis, Fjerdingstad & Boomsma (1998) ont montré que la polyandrie permet aux reines d'*Atta colombica* d'accroître leurs réserves spermatiques. Les colonies de cette espèce sont extrêmement populeuses (plusieurs millions d'ouvrières) et les reines présentent une grande longévité (10 à 16 ans), ce qui suggère fortement que la polyandrie est une stratégie adaptative dans la mesure où la quantité de sperme accumulée par les reines pourrait, à terme, limiter leur succès reproductif.

b. L'hypothèse de la variabilité génétique suggère que la présence de différentes lignées paternelles au sein des sociétés se traduirait par une plus grande flexibilité comportementale (Crozier & Page, 1985) ou une meilleure résistance aux pathogènes ou aux parasites (Hamilton, 1987; Sherman *et al.* 1988). Un polyéthisme d'origine génétique a été observé chez les fourmis en nature (Snyder, 1992, 1993; Julian & Cahan, 1999), mais ses avantages en termes de succès reproductif n'ont jamais pu être mis en évidence. D'autre part, les expériences de Palmer & Oldroyd (2003) ont révélé d'importantes variations de résistance à la bactérie pathogène *Paenibacillus larvae* selon les lignées paternelles d'ouvrières d'*Apis mellifera*, fournissant un autre argument en faveur de cette hypothèse pour justifier l'évolution de la polyandrie chez l'abeille domestique. Chez les fourmis, la résistance au parasite *Metarhizium anisopliae* (Fungus) des groupes d'ouvrières d'*Acromyrmex echinatior* est influencée par la variabilité génétique. Les groupes génétiquement homogènes sont plus sensibles au pathogène, alors que les capacités de reproduction et d'adaptation de celui-ci sont grandement diminuées dans les groupes composés de diverses lignées paternelles (Hugues & Boomsma, 2004, 2005). Finalement, Baer & Schmidt-

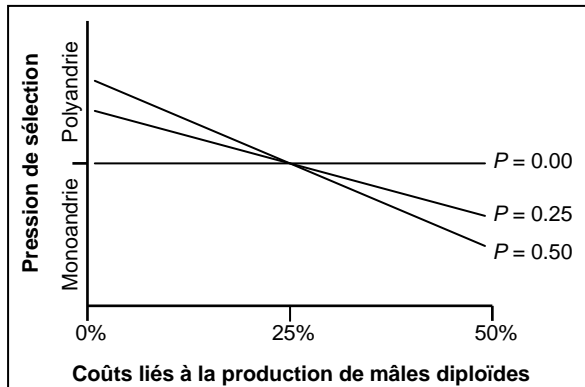


Figure 4. Mâles diploïdes et polyandrie

Les coûts liés à la production de mâles diploïdes déterminent la direction des pressions de sélection sur le nombre d'accouplements des reines (monoandrie vs polyandrie). Ces coûts représentent l'équivalent en couvain diploïde de l'investissement dilapidé en mâles diploïdes lorsque la reine s'est accouplée 2 fois, et qu'un des deux mâles porte un allèle identique à la reine au locus *csd* (25% de mâles diploïdes). Si les coûts sont élevés (mâles coûteux et éliminés tardivement, voire pas du tout), la monoandrie sera favorisée. Si les coûts sont réduits (mâles peu coûteux et éliminés de manière précoce), la polyandrie sera favorisée. L'intensité de la sélection est déterminée par la probabilité d'obtenir un mâle diploïde (P) après un accouplement aléatoire, donc estimée à partir des fréquences alléliques au locus *csd*.

Adapté de Crozier & Fjerdingstad (2001).

Hempel (1999) ont montré que des variations expérimentales dans le niveau de polyandrie affectent la résistance au parasitisme et le succès reproductif du bourdon *Bombus terrestris*.

c. *L'hypothèse du fardeau en mâles diploïdes*, parfois intégrée à *l'hypothèse de la variabilité génétique*, prédit que la polyandrie aurait été favorisée afin de réduire les risques de ruine de la société consécutivement à la production de mâles diploïdes stériles (Page, 1986). L'influence du fardeau en mâles diploïdes n'est pas triviale, car elle favorise soit la polyandrie lorsque les coûts liés au développement des mâles diploïdes sont faibles, soit la monoandrie quand ces coûts sont élevés (Ratnieks, 1990; Pamilo, 1991; Pamilo *et al.*, 1994; figure 4). L'intensité de cette sélection dépend de la fréquence des mâles diploïdes (Boomsma & Ratnieks, 1996; Crozier & Fjerdingstad, 2001). Les

travaux de Pamilo *et al.* (1994) chez *Formica* suggèrent que la monoandrie est favorisée chez les espèces monogynes par le coût élevé de la production de mâle diploïde. En effet, le coût associé à la production des mâles diploïdes est plus important pour les sociétés monogynes, dans la mesure où la perte de la moitié du couvain diploïde sera souvent fatale pour une reine qui fonde un nid de manière solitaire, alors qu'elle ne se traduira qu'en une simple baisse de productivité dans une société polygyne. L'influence de la charge en mâles diploïdes n'a pas encore été clairement démontrée chez une espèce polyandre. Chez *Apis mellifera*, Tarry & Page (2001) ont montré par la modélisation mathématique qu'un grand nombre d'accouplements diminue le risque de mortalité élevée due à l'émergence de mâles diploïdes au sein du couvain. Cependant, ils reconnaissent que la sélection contre le fardeau en mâle diploïde peut difficilement justifier plus de 10 accouplements, ce qui est pourtant fréquemment observé chez cette espèce.

d. *L'hypothèse de la compétition spermatique* repose sur l'existence d'une compétition post-copulatoire entre les différentes lignées spermatiques permettant d'optimiser la qualité des gènes paternels dans la descendance (Starr, 1985), ou favorisant les descendants de seconde génération au niveau même de la compétition (Keller & Reeve, 1995). Envisager les bénéfices d'une compétition post-copulatoire en terme de capacité accrue à féconder les ovules au détriment des autres lignées spermatiques suppose l'existence d'une variation entre mâles dans leur aptitude à féconder les ovules. Une telle variation a été signalée à une occasion chez les mâles de l'abeille domestique (Harbo, 1990), mais ces résultats n'ont pu être reproduits (Sasaki *et al.*, 1995; Haberl & Tautz, 1998; Frank *et al.*, 1999). De plus, les bénéfices en terme de compétitivité à féconder ne seraient concrets que chez les espèces

obligatoirement polyandres; or, à quelques exceptions près, les fourmis qui s'accouplent plusieurs fois ne sont qu'occasionnellement polyandres (Strassmann, 2001).

e. L'hypothèse de la réduction des conflits suggère que la polyandrie permet à la reine de diminuer la corrélation génétique entre ouvrières et femelles reproductrices et, de là, alléger le conflit opposant reines et ouvrières quant au sex-ratio de la descendance sexuée (voir p. 16; Starr, 1984; Moritz, 1985; Woyciechowski & Lomnicki 1987). Un support empirique à cette hypothèse a été trouvé chez les fourmis *Formica exsecta* (Sundström *et al.*, 1996) et *F. truncorum* (Sundström, 1994; Sundström & Ratnieks, 1998), où le sex-ratio est biaisé en faveur du sexe femelle au sein des sociétés monoandres, mâle au sein des sociétés polyandres, en harmonie avec les asymétries de parenté.

f. D'autres hypothèses encore suggèrent que la polyandrie peut évoluer sous la pression des mâles (*mating by convenience*; Thornhill & Alcock, 1983) ou pour les bénéfices tirés de chaque "cadeau copulatoire" (*nuptial gift*; Vahed, 1998). Ces hypothèses semblent difficilement applicables aux hyménoptères sociaux, dans la mesure où l'accouplement se produit souvent au cours d'un vol nuptial (peu d'opportunités de coercition sexuelle) et que l'existence de "cadeaux copulatoires" n'a jamais été constatée.

Ces hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives et l'influence relative de ces différentes sources de pressions sélectives reste encore largement méconnue.

1.3. Nombre de reines

Chez de nombreuses espèces, plusieurs reines associent leurs efforts et contribuent collectivement à assurer la descendance. La polygynie affecte la cohésion sociale des sociétés plus profondément encore que la

polyandrie; la corrélation génétique entre ouvrières peut atteindre une limite théorique de 0.25 dans le cas d'une reine avec un nombre d'accouplements illimité, mais elle peut descendre jusque 0.00 dans le cas de plusieurs reines non apparentées.

On possède encore peu d'éléments permettant de comprendre comment une espèce passe d'une organisation monogyne à une structuration polygyne. Chez la fourmi de feu, *Solenopsis invicta*, la structure sociale est déterminée par le gène *Gp-9* qui amène les ouvrières à accepter ou refuser d'autres reines (Ross & Keller, 1998; figure 5). Dans les systèmes monogynes, la reine et les ouvrières ont toutes le génotype *Gp-9^{BB}*, tandis que les colonies polygynes comportent toujours des ouvrières *Gp-9^{BB}* et *Gp-9^{Bb}*. Les reines des colonies polygynes sont toutes hétérozygotes. L'absence de reines *Gp-9^{BB}* dans les colonies polygynes est due à l'allèle égoïste *Gp-9^b* (ou un locus étroitement associé; Ross, 1997; Ross & Keller, 1998). Cet allèle pousse les ouvrières qui le portent à tuer de manière sélective toutes les reines qui ne le portent pas (càd, les reines *Gp-9^{BB}*). Les reines et les ouvrières du génotype *Gp-9^{bb}* sont absentes des colonies polygynes, car l'allèle *Gp-9^b* est aussi un allèle létal récessif causant la mort des femelles homozygotes à la sortie du cocon (Ross, 1997). C'est pourquoi la forte sélection contre les reines *Gp-9^{BB}* est exactement compensée par la non-viabilité des reines *Gp-9^{bb}*, menant à un polymorphisme stable au sein des systèmes polygynes. Chez d'autres espèces, cette caractéristique phénotypique de la société pourrait être largement influencée par des facteurs écologiques, telle la limitation des sites de nidification adéquats. Par exemple, *Leptothorax longispinosus* niche dans les fragments végétaux, comme les petites tiges tombées au sol, les glands des chênes, etc. La densité des populations du Vermont est faible, et la plupart des sociétés sont monogynes. Dans l'état de New York, la densité des nids est multipliée par 10 et 40% des nids sont polygynes (Herbers, 1986, 1989).

Dans les sociétés qui ne comportent qu'une seule reine, la structure sociale peut être affectée par le remplacement de la reproductrice, phénomène appelé polygynie séquentielle. André *et al.* (2001) ont montré que le paramètre crucial déterminant l'impact de la polygynie séquentielle sur la structure socio-génétique des sociétés est le taux de remplacement des reines. Lorsque ce taux est élevé, plusieurs lignées maternelles d'ouvrières peuvent co-exister au sein de la colonie, diminuant ainsi l'apparentement entre ouvrières. La polygynie séquentielle diffère de la polyandrie et de la polygynie stable dans la mesure où ses effets varient en intensité au cours du temps. Chez la guêpe *Ropalidia marginata*, Gadagkar *et al.* (1993) ont montré que le succès reproductif est corrélé à l'apparentement entre les ouvrières et le couvain, et donc qu'il fluctue en réponse à la polygynie séquentielle. Le remplacement des reines existe aussi au sein des colonies polygynes (Seppä, 1994; Evans, 1996; Bourke *et al.*, 1997), où il a pour effet d'augmenter le nombre effectif de reproductrices. Cet effet reste cependant moins significatif que dans des sociétés monogynes où l'apparentement est, à la base, plus élevé.

1.4. La reproduction sexuée et asexuée

La prévalence de la reproduction sexuée (ou bisexuée) au sein du règne animal a longtemps été considérée comme un paradoxe dans la mesure où les individus qui se reproduisent de manière sexuée ne transmettent que la moitié de leurs gènes à la génération suivante (*two-fold cost of sex*; Maynard-Smith, 1978; figure 5). Diverses théories ont été avancées pour justifier le succès évolutif de la reproduction bisexuée, telle la *théorie de Fischer-Müller*, qui suggère que l'avantage de la bisexualité réside dans la rapidité d'évolution permise par la syngamie (Fischer, 1930; Müller, 1932). Ainsi, la reproduction sexuée permet une grande variation de combinaisons alléliques, dont les mieux adaptées seront favorisées par la

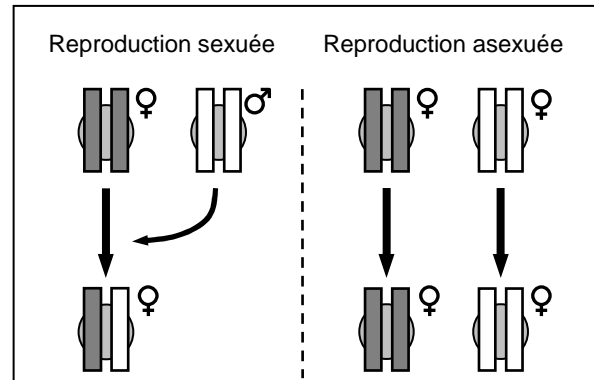


Figure 5. Les coûts de la bisexualité

En termes de transmission des gènes, la reproduction sexuée ne peut rivaliser avec la reproduction asexuée, et ce pour deux raisons principales. (i) Les organismes parthénogénétiques ne produisent que des femelles, reproductrices autonomes, alors que leurs homologues sexués doivent investir également dans la production de mâles. (ii) La descendance des organismes bisexués ne porte que la moitié des gènes de chaque parent, alors que les organismes parthénogénétiques transmettent l'intégralité de leur patrimoine génétique à chacun de leurs descendants. Les bénéfices de la reproduction sexuée doivent être cherchés ailleurs pour expliquer son énorme succès évolutif.

sélection naturelle. La théorie du "*cliquet de Müller*", elle, souligne le risque d'accumuler des mutations négatives au sein des lignées parthénogénétiques, et la possibilité que les individus libres de toute mutation délétère soient éliminés par le fait du hasard (*Müller's ratchet*; Müller, 1964).

Ces hypothèses détaillent les avantages à long terme de la bisexualité. Or, il semble peu probable que la reproduction bisexuée ne soit qu'une adaptation à long terme car son déficit théorique de productivité face à la parthénogenèse est trop important pour que des avantages à court terme soient négligés (Williams, 1966). Il a été suggéré que, dans un environnement structuré et hétérogène, une femelle augmente la probabilité que quelques uns de ses descendants soient particulièrement bien adaptés en produisant une descendance réduite mais hautement diversifiée, par opposition à une femelle parthénogénétique qui aura une descendance abondante mais identique (Bell, 1982). D'autre part, la production par parthénogenèse d'une descendance bien adaptée à sa niche

écologique amène tôt ou tard à une saturation de cette niche, alors que la production d'une descendance variée permet potentiellement à la descendance de diversifier les niches exploitées et, ainsi, de diminuer la compétition entre descendants (*tangled bank*, Ghiselin, 1974). La pression des parasites sur les populations-hôtes peut aussi entraîner une course perpétuelle aux armements évolutifs. Les parasites sont le plus souvent caractérisés par des temps de génération courts par rapport à ceux de leur hôte, ce qui leur confère une grande vitesse d'évolution et la capacité d'élaborer une réponse rapide vis-à-vis des défenses immunitaires (Hamilton *et al.*, 1990). La reproduction sexuée seule permet de diversifier les combinaisons alléliques et d'éviter l'extinction par un parasite trop bien adapté à son hôte (*Red queen*; van Valen, 1973). Enfin, au fil du temps et des divisions cellulaires, des lésions apparaissent fréquemment sur les brins d'ADN (erreurs de duplication, crossing-over, etc.), un phénomène correspondant au vieillissement. La reproduction sexuée permet de restaurer l'intégrité de l'ADN grâce à l'appariement des chromosomes homologues au cours de la méiose (Bernstein & Bernstein, 1991). En conséquence, alors que les lignées parthénogénétiques accumulent les lésions génétiques, l'horloge moléculaire des zygotes formés par reproduction sexuée est réinitialisée à chaque génération.

1.4.1. Parthénogenèse arrhénotoque et thélytoque

La reproduction par parthénogenèse s'observe communément dans la plupart des groupes du règne animal et plus couramment encore dans le règne végétal. La parthénogenèse correspond au développement d'un gamète femelle (ovule) en un individu adulte, sans fécondation (Suomalainen *et al.*, 1987). Un tel mode de reproduction est considéré comme dérivé de la reproduction sexuelle normale, plutôt que comme un mode de reproduction asexuée, car les nouveaux individus sont issus de

cellules sexuelles. Le terme d'unisexualité, par opposition à bisexualité, est souvent utilisé comme synonyme de parthénogenèse. Nous adopterons également cette nomenclature.

L'origine évolutive de la reproduction parthénogénétique reste encore très hypothétique. Plusieurs explications, plus complexes les unes que les autres, ont été proposées. Aucune n'a cependant encore reçu un support expérimental tangible. Les animaux caractérisés par un mode de reproduction parthénogénétique ont été traditionnellement tenus comme évolutivement inférieurs à ceux pratiquant la reproduction bisexuée (Suomalainen *et al.*, 1987). Weismann (1876) considère que le manque de recombinaisons garantit que les formes parthénogénétiques n'ont pas d'espoir évolutif dans la compétition sélective qui les oppose aux adversaires bisexués plus versatiles. Pour White (1973), certaines formes peuvent survivre car elles sont adaptées à une niche écologique extrêmement étroite, constante et inchangée. Pourtant, depuis les années 1980, une accumulation de données expérimentales a montré que les populations parthénogénétiques sont variables et capables d'adaptations rapides à leur environnement (Zeyl & Bell, 1997). Concernant l'origine génétique de la parthénogenèse, l'automixie a souvent été écartée car, dans la grande majorité des cas, elle renforce l'homozygotie, ce qui suggère une diminution de la variabilité génétique. Certains auteurs (Stenseth *et al.*, 1985) ont suggéré la pseudogamie comme forme primitive de parthénogenèse. On parle de pseudogamie lorsqu'une fécondation est nécessaire au déclenchement de la parthénogenèse (le spermatozoïde sert d'élément activateur du développement de l'ovocyte sans que la fusion des pronucléi n'ait lieu.). Cette hypothèse semble toutefois peu probable, car elle ne peut conduire à une population stable. En effet, si les femelles pseudogames tirent un avantage reproductif de ce mode de reproduction, il n'en est pas de même pour les mâles, ce qui

Classification selon le mode de reproduction (Suomalainen, 1950)		
Accidentelle		Des oeufs non fécondés se développent occasionnellement
	Obligatoire constante	Les oeufs se développent par parthénogenèse à chaque génération
Normale	Obligatoire cyclique	Alternance de générations parthénogénétiques et bisexuées
	Facultative	Un oeuf peut se développer par parthénogenèse
Classification selon le mode de détermination sexuelle (Winkler, 1920)		
Arrhénotoque		Les oeufs non fécondés se développent en mâles
Thélytoque		Les oeufs non fécondés se développent en femelles
Deutérotoque		Les oeufs non fécondés se développent en mâle ou femelle
Classification selon le mécanisme cytologique (Thomsen & Ankel, 1927)		
Généralive		L'oeuf se développe à partir d'un gamète; l'individu est haploïde
	Automictique	Le zygote est obtenu à partir de la fusion de deux noyaux polaires résultants de la méiose.
	Apomictique	Le zygote est diploïde car il n'y a pas de méiose réductionnelle.
Somatique		

Tableau 1. Classifications de la parthénogenèse
Les classifications courantes des différents types de parthénogenèse sont présentées. Chaque type de parthénogenèse est assorti d'une brève définition. D'après Suomalainen et al., 1987.

conduira à un sex-ratio de plus en plus biaisé en faveur du sexe femelle. En bref, malgré un regain d'intérêt assez récent pour la parthénogenèse et son origine évolutive, les données sur ce mode de reproduction dans la littérature restent rares, fragmentaires et toujours très spéculatives (Suomalainen *et al.*, 1987; Niklasson & Parker, 1994).

La parthénogenèse est un concept très large. Elle peut être subdivisée en plusieurs types qui, à leur tour, sont organisés en différents systèmes. Thomsen (1927; cité dans Suomalainen *et al.*, 1987) a proposé une terminologie aujourd'hui utilisée par la majorité des biologistes. Globalement, les différents types de parthénogenèse sont classés selon 3 critères principaux: le mode de reproduction, le mode de détermination sexuelle ou les

données cytologiques (tableau 1). Ce dernier critère revêt un intérêt particulier car il est le seul à s'intéresser aux mécanismes génétiques. Nous le développons ci-après.

1.4.2. Bases cytologiques et conséquences génétiques de la parthénogenèse

Sur base de données strictement cytologiques, 3 classes de reproduction parthénogénétique sont distinguées: la parthénogenèse automictique, la parthénogenèse apomictique et la parthénogenèse générative.

1. Parthénogenèse apomictique

La parthénogenèse apomictique est considérée comme le système le plus simple sur le plan évolutif et génétique. La méiose est totalement absente: il n'y a donc pas de

recombinaisons génétiques. Le génotype de la mère est transmis tel quel à ses filles. Une population se reproduisant par parthénogenèse apomictique maintient sa variation originelle. Elle peut acquérir de nouvelles variations par mutation ou par d'autres mécanismes potentiels, comme les crossing-over somatiques et les transpositions (addition d'un gène en l'absence d'homologie de séquence nucléotidique). Ces parthénogenèses présentent des divisions équationnelles de maturation qui sont identiques à la deuxième division méiotique et n'impliquent pas de réduction chromatique. On observe:

- *une unique division équationnelle de maturation*, chez les nématodes, les oligochètes (Lumbricidae) et les crustacés (Anostracés, Cladocères);
- *deux divisions équationnelles de maturation*, chez les Turbellaria, les rotifères, les mollusques (gastéropodes) et les insectes orthoptères (Blattidae, Phasmidae).

2. Parthénogenèse automictique

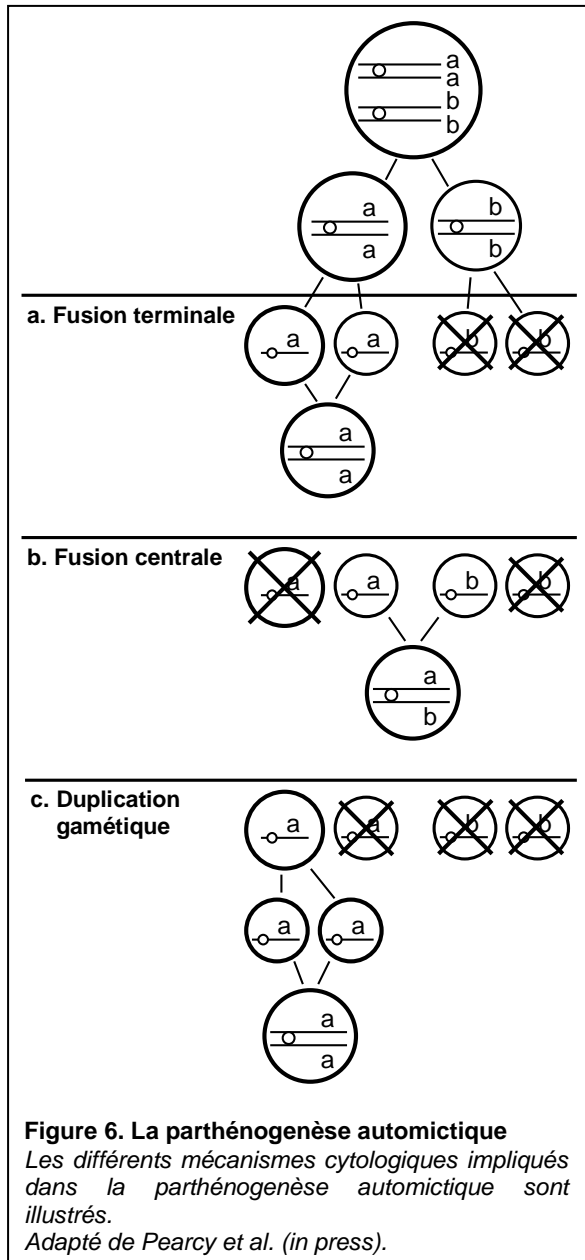
La méiose est préservée. La fusion des 2 noyaux d'individus de sexe opposé est remplacée par la fusion de 2 noyaux haploïdes provenant du même individu. Les paires de chromosomes peuvent subir des crossing-over assurant un brassage intrachromosomique du matériel génétique. Théoriquement, la plupart des cas d'automixie renforcent l'homozygotie. Néanmoins, une certaine variabilité génétique est maintenue au sein de la population grâce à des arrangements chromosomiques comme, par exemple, des crossing-over, des inversions ou encore des translocations. Plusieurs mécanismes cytologiques différents de parthénogenèse automictique peuvent être observés (figure 6):

- a. La fusion terminale*: les deux noyaux polaires, formés à partir de la même cellule suite à la deuxième division méiotique, fusionnent. Si la mère est homozygote, elle ne produira que des

homozygotes. Si elle est hétérozygote, sans crossing-over, tous les descendants seront homozygotes mais différents génotypes seront possibles. Des crossing-over permettent la formation d'hétérozygotes, si la mère est elle-même hétérozygote. Ce mécanisme s'observe chez les nématodes, les oligochètes (Enchytraeidae), les crustacés (Anostracés, isopodes), les arachnides (Acarina), les arthropodes (tardigrades), ainsi que chez plusieurs insectes comme les orthoptères (Acrididae), les homoptères (Coccidae), les thysanoptères (Terebrantia), les diptères (Drosophilidae, Lonchopteridae) et les hyménoptères (Tenthredinidae, Aphelinidae).

- b. La fusion centrale*: les deux noyaux polaires formés à partir de cellules différentes issues de la première division méiotique, fusionnent. Si la mère est homozygote, tous les descendants seront homozygotes. Si la mère est hétérozygote, sans crossing-over, tous les descendants seront hétérozygotes. Si la mère est hétérozygote, avec crossing-over, il y aura des zones homozygotes dans le génome des descendants. Ce mécanisme se retrouve chez les insectes lépidoptères (Psychidae), diptères (Drosophilidae, Lonchopteridae) et hyménoptères (Apidae).

- c. La duplication gamétique*: une des 4 cellules haploïdes obtenues suite à la méiose se duplique et les 2 cellules résultantes fusionnent. Tous les descendants sont homozygotes mais différents génotypes possibles existent. Ce mécanisme a été décrit chez les crustacés (Anostracés) et les arachnides (Acarina), ainsi que chez les insectes orthoptères (Phasmidae), homoptères (Coccidae), lépidoptères (Bombycidae), diptères (Drosophilidae) et hyménoptères (Cynipidae).



d. D'autres mécanismes, plus complexes, font intervenir la polypléidie. Ils concernent plusieurs espèces d'oligochètes, d'insectes et d'arachnides, mais aussi de poissons, d'amphibiens et de reptiles. Nous ne les aborderons pas ici.

3. Parthénogenèse générative ou haploïde

Les œufs peuvent se développer avec ou sans fécondation et donnent respectivement des femelles diploïdes ou des mâles haploïdes. La formation des mâles haploïdes se fait par parthénogenèse générative qui correspond au développement d'un noyau issu de méiose. La parthénogenèse

généralive est, de ce fait, toujours facultative et arrhénotoque. Ce type de parthénogenèse se retrouve chez les nématodes (Oxyuroidea), les rotifères, les insectes homoptères, thysanoptères, coléoptères, hyménoptères et chez les arachnides (Acarina). C'est ce type de parthénogenèse qui est responsable de la production des mâles chez les hyménoptères sociaux.

1.4.3. La parthénogenèse thélytoque chez les hyménoptères

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'ordre des hyménoptères est caractérisé par un déterminisme du sexe de type haplodiploïde. En règle générale, les mâles se développent à partir d'œufs non fécondés et sont haploïdes (parthénogenèse arrhénotoque générative), alors que les femelles sont issues d'œufs fécondés et sont diploïdes. On retrouve également chez les hyménoptères des cas de parthénogenèse thélytoque (càd. où les œufs non fécondés se développent en femelles). Ces parthénogenèses peuvent être apomictique ou automictique.

Ce type de parthénogenèse a été décrit chez plusieurs espèces. Par exemple, chez *Aphytis mytilaspidis* (Aphelinidae), la thélytoque est de type automictique et conduit à la production d'une petite quantité de mâles fertiles. Ceux-ci vont permettre un maintien de l'hétérozygotie au sein de la population (Rössler & Debach, 1973). Chez l'abeille du cap, *Apis mellifera capensis* (Apidae) (Verma & Ruttner, 1983; Greeff, 1996), les ouvrières vierges peuvent pondre des œufs se développant en femelles (reines ou ouvrières). C'est un cas de parthénogenèse automictique.

Chez les fourmis, la thélytoque est un phénomène rare et n'a été observée que chez 6 espèces différentes:

- *Cataglyphis cursor* (Formicinae; Cagniant, 1973): En l'absence de reine, les ouvrières sont capables de produire des femelles et des mâles. On parle alors de thélytoque et d'arrhénotoque occasionnelles.

- *Pristomyrmex pungens* (Myrmicinae; Itow *et al.*, 1984): C'est le seul cas de thélytoquie obligatoire connu aujourd'hui chez les fourmis. Il n'y a que très rarement des mâles et quasiment jamais de reine. Ce sont des ouvrières fécondées (gamergates) qui assument la totalité de la reproduction par thélytoquie. Il existe plusieurs avantages adaptatifs à cette stratégie de reproduction: la colonisation par fragmentation ne nécessite pas d'ailés, il n'y a pas de plafond dans la production d'œufs (les espèces du même genre qui ne pratiquent pas la thélytoquie ont un effectif moyen de colonie significativement plus réduit), et il n'y a pas de "perte" d'énergie par production de reine. Les sociétés étant très populeuses, la reproduction des ouvrières n'engendre qu'un coût très réduit sur la productivité des colonies.

- *Platythyrea punctata* (Ponerinae; Heïnze & Hölldobler, 1995): Chez cette espèce, la thélytoquie est occasionnelle, apomictique (Schilder, 1999) et coexiste avec une reproduction sexuée réalisée par les reines et les gamergates. La parthénogenèse thélytoque n'est réalisée que par les ouvrières et par les intercastes (dont la morphologie est intermédiaire entre les ouvrières et les reines) non fécondées.

- *Cerapachys biroi* (Cerapachyinae; Tsuji & Yamauchi, 1995): Les ouvrières sont capables de se reproduire par thélytoquie. Malgré de fortes ressemblances avec *P. pungens* au niveau du mode de vie et de dispersion, les données ne permettent pas, jusqu'à présent, de déterminer si cette parthénogenèse est également obligatoire.

- *Messor capitatus* (Myrmicinae; Grasso *et al.*, 2000): Dans certaines conditions, des ouvrières orphelines sont capables de produire une descendance femelle, et donc de réaliser une parthénogenèse thélytoque. Des dissections d'ouvrières ont montré que ces dernières ne possèdent pas de spermathèque, ce qui exclut tout accouplement.

- *Wasmannia auropunctata* (Myrmicinae; Fournier *et al.*, 2005): Des analyses génétiques ont montré que les reines de cette espèce sont capables de se reproduire par parthénogenèse apomictique et par reproduction sexuée. Les ouvrières sont, quant à elles, totalement stériles.

2. Reproduction des sociétés: conflits, dispersion et sex-ratio

2.1. Conflits

Paradoxalement, si les asymétries génétiques induites par l'haplodiploïdie ont sans aucun doute favorisé la socialité chez les hyménoptères sociaux (Bourke & Franks, 1995; Crozier & Pamilo, 1996; Aron & Passera, 2000), elles sont également à l'origine de conflits d'intérêts reproductifs entre les individus d'une même société. En effet, les individus formant une société ne sont pas génétiquement identiques et leurs intérêts reproductifs peuvent parfois s'avérer forts différents. Dans ces conditions, ils peuvent chercher à favoriser leur propre succès reproductif (direct et/ou indirect), ceci parfois au détriment des autres membres du groupe (Trivers & Hare, 1976). Ces conflits se manifestent à plusieurs niveaux dont trois sont particulièrement saillants.

2.1.1. Conflits entre reines et ouvrières quant au sex-ratio de la descendance sexuée

Un premier type de conflit oppose la reine aux ouvrières en ce qui concerne la part d'investissement que chaque caste souhaite consacrer à l'élevage des sexués (Trivers & Hare, 1976). La reine est apparentée de façon équivalente à ses filles et ses fils ($r = 0.5$); elle est donc sélectionnée pour favoriser un sex-ratio équilibré (par sélection dépendante de la fréquence; Maynard Smith, 1989). Le point de vue des ouvrières est différent. Lorsque la société ne présente qu'une seule

reine reproductrice (condition monogyne), accouplée avec un seul mâle (condition monandre), et que les ouvrières sont totalement stériles, ces dernières sont trois fois plus apparentées à leurs sœurs ($r = 0.75$) qu'à leurs frères ($r = 0.25$) (figure 2). Elles peuvent alors optimiser leur succès reproductif en biaisant l'investissement énergétique en faveur du sexe femelle dans la proportion de 3 femelles pour 1 mâle. C'est en effet la seule valeur du sex-ratio qui soit évolutivement stable pour les ouvrières. Supposons que l'investissement nécessaire à la production d'un mâle soit égal à celui requis pour produire une femelle. Lorsque le sex-ratio est biaisé à raison de 3:1 (femelle:mâle), les mâles ont 3 fois plus de chances de s'accoupler que les femelles, mais ces dernières disséminent chacune 3 fois plus de copies de gènes que les mâles, de telle sorte que le bénéfice génétique dont jouissent les ouvrières est, en moyenne, identique pour chaque sexe (Passera & Aron, 2005). Si les reines ont la maîtrise du sexe des œufs qu'elles pondent, les ouvrières élèvent les larves et peuvent privilégier un sexe par rapport à l'autre en nourrissant mieux certaines d'entre elles et/ou en supprimant d'autres (Chapuisat & Keller, 1999; Aron *et al.*, 1994, 1995; Aron & Passera, 2000).

A ce jour, plusieurs travaux ont démontré que le sex-ratio à l'échelle des populations est fréquemment biaisé en faveur du sexe femelle, traduisant un contrôle ouvrière du sex-ratio (Bourke & Franks, 1995; Crozier & Pamilo, 1996; Chapuisat & Keller, 1999). Cependant, ce biais est généralement inférieur à celui attendu selon les asymétries génétiques si les ouvrières exercent un contrôle total du sex-ratio. Dans certains cas, le sex-ratio apparaît même équilibré. Outre les contraintes écologiques pouvant influencer la proportion de chaque sexe élevé (voir ci-dessous), un contrôle royal du sex-ratio a été démontré chez quelques espèces. Dans la forme monogyne de la fourmi de feu *Solenopsis invicta*, les reines contrôlent le sex-

ratio des sociétés en limitant le nombre d'œufs diploïdes pondus (Aron *et al.*, 1995; Passera *et al.*, 2001). De même, chez la fourmi méditerranéenne *Pheidole pallidula*, le sex-ratio secondaire des sociétés est directement influencé par le sex-ratio primaire produit par les reines et le caste-ratio (proportion de sexués et d'ouvrières produits à partir du couvain diploïde), ce dernier étant sous l'influence du taux de biosynthèse en hormone juvénile JH-III produit par les reines (de Menten *et al.*, 2005a). En bref, il semble donc exister une grande variabilité inter-spécifique quant au pouvoir relatif de chacune des parties en conflits (reines et ouvrières) pour contrôler le sex-ratio des sociétés (voir également Beekman *et al.*, 2003).

2.1.2. Conflits entre reines et ouvrières quant à l'origine des mâles

Une seconde source majeure de conflits concerne l'origine des mâles produits par la société (Hamilton, 1964; Trivers & Hare, 1976). Chez plusieurs espèces d'hyménoptères sociaux, les ouvrières ne sont pas totalement stériles. Elles ont alors la possibilité de pondre des œufs parthénogénétiques haploïdes à destinée mâle (Bourke, 1988). Comme l'indique la figure 2, la reine trouve toujours un plus grand intérêt génétique dans l'élevage de ses fils ($r = 0.5$) plutôt que de ses petit-fils ($r = 0.25$). Par contre, dans un système social monogyne dont la reine est monandre, la corrélation génétique entre une ouvrière et ses frères est égale à 0.25, alors qu'elle est de 0.5 avec un fils et de 0.375 avec un neveu (le fils d'une autre ouvrière). Par conséquent, les ouvrières peuvent optimiser leur succès reproductif en élevant préférentiellement leurs fils et neveux plutôt que leurs frères. Ces asymétries de corrélation génétique entraînent un conflit entre la reine et les ouvrières en ce qui concerne l'origine des mâles. Du point de vue des ouvrières, il s'agit ici d'une décision collective. Si le coût associé à la reproduction des ouvrières – par exemple en termes de chute de productivité

de la société – est réduit, ce comportement doit être sélectionné (Bourke & Franks, 1995).

2.1.3. Conflit entre ouvrières quant à l'origine des mâles

Si, pour les ouvrières considérées dans leur ensemble, la polyandrie favorise l'élevage de frères ($r = 0.25$) plutôt que de neveux ($r < 0.25$), chaque individu ouvrière peut néanmoins accroître son succès reproductif via la production de ses propres fils ($r = 0.5$; figure 2). Autrement dit, les ouvrières doivent être sélectionnées pour produire leurs propres fils, mais ne pas tolérer la production de mâles par les autres ouvrières de la société. Par conséquent, en situation de polyandrie le conflit opposant la reine aux ouvrières quant à l'origine des mâles se transforme en un conflit entre ouvrières pour la production de mâles. Selon la théorie de la sélection de la parentèle, cette "intolérance" entre ouvrières doit être à l'origine d'un comportement de "police" des ouvrières ("*worker-policing*"), par lequel les ouvrières s'empêchent mutuellement de se reproduire (Ratnieks, 1988), soit en éliminant tout oeuf d'origine ouvrière, soit en agressant toute ouvrière pondreuse (Ratnieks & Visscher, 1989; Frank, 1995; Foster & Ratnieks, 2000, 2001; Hammond & Keller 2004; Passera & Aron 2005).

2.2. Dispersion

Les modes de dispersion sont également responsables de multiples stratégies de reproduction chez les fourmis (Peeters & Ito, 2001). Schématiquement, on peut classer ces stratégies en deux grands ensembles (Hölldobler & Wilson, 1977). Lorsque la reine fraîchement fécondée et nourrissant elle-même ses premières larves est à l'origine d'une nouvelle société, on parle de fondation indépendante. A l'inverse, dans la fondation dépendante, la jeune reine se fait aider par des ouvrières lors de la fondation de la nouvelle société.

La fondation indépendante est caractérisée par le vol nuptial. Il s'agit d'un

phénomène intrigant par sa synchronicité. Les sexués de la même espèce essaient le même jour, au même moment; il en résulte d'impressionnants nuages de fourmis ailées. La synchronisation du vol nuptial est due à la conjonction de plusieurs paramètres climatiques (Kannowski 1959). Chez la fourmi de feu *Solenopsis invicta*, par exemple, le vol nuptial a lieu principalement au printemps et en automne, 24 heures après qu'une pluie abondante ait rendu l'atmosphère très humide, en début d'après-midi, quand la température de l'air oscille entre 25 et 29°C et que l'humidité varie de 45 à 55% (Morrill, 1974; Milio *et al.*, 1988). C'est lorsque les sexués sont à environ 2 mètres du sol que l'accouplement a lieu. Cette stratégie disperse les femelles à 1,5 km de leur point d'envol, mais elles peuvent parcourir jusqu'à 10km. La femelle trouve ensuite une cavité, un abri, où elle commence à pondre. Elle devra nourrir les premières larves à partir de ses propres réserves de graisses. Ses muscles alaires, inutiles à présent, sont histolysés (Janet, 1907). Il lui faudra attendre que les premières ouvrières atteignent l'âge adulte pour être à nouveau alimentée. La fondation indépendante d'une nouvelle colonie est une entreprise périlleuse; Wiernasz & Cole (1995) estiment à 1% le taux de réussite des fondations chez *Pogonomyrmex* sp.

Lors de la fondation dépendante, le vol nuptial est réduit ou même absent. Les reines sont parfois incapables de voler pour des raisons physiques (ailes trop courtes) ou physiologiques (manque de réserves énergétiques; Passera & Keller, 1990). Ce type de fondation est souvent associé à la polygynie (Keller, 1991). Les reines nouvellement fécondées réintègrent la colonie maternelle, sont adoptées par une colonie étrangère, ou fondent une nouvelle colonie, escortées par un groupe d'ouvrières (fondation par bourgeonnement).

2.3. Le sex-ratio

La modulation de la proportion d'individus de chaque sexe arrivant à

maturité sexuelle est l'expression la plus manifeste des stratégies de reproduction chez les hyménoptères sociaux. Le sex-ratio peut être le reflet des asymétries de parenté et du conflit reine-ouvrière (voir p. 13), mais d'autres facteurs influencent également le sex-ratio des colonies.

Chez les fourmis, les femelles sexuées sont généralement plus grosses et représentent donc souvent un investissement plus important que les mâles. Lorsque les ressources sont limitantes, les sociétés vont favoriser la transformation du couvain diploïde en ouvrières plutôt qu'en femelles sexuées, conduisant ainsi à un sex-ratio biaisé en faveur des mâles. A l'inverse, une plus grande proportion du couvain diploïde peut être convertie en sexuées lorsque les ressources sont abondantes, biaisant ainsi le sex-ratio en faveur du sexe femelle (Crozier & Pamilo, 1993; Nonacs 1986; Rosenheim et al., 1996). L'influence de la disponibilité des ressources alimentaires sur le sex-ratio a clairement été démontrée chez plusieurs espèces de fourmis, comme *Formica podzolica* (Deslippe & Savolainen, 1994, 1995), *Myrmica longispinosus* (Herbers & Banschbach, 1998), *Leptothorax nylanderi* (Foitzik & Heinze, 1998), *Myrmica brevispinosa* (Bono & Herbers, 2003), *Aphaenogaster rudis* (Morales & Heithaus, 1998) ou *Pheidole pallidula* (Aron et al., 1999; Fournier et al., 2003).

Chez certaines espèces de fourmis, les mâles dispersent peu, voire parfois pas du tout. Cette faible dispersion peut être à l'origine d'une compétition sexuelle entre mâles apparentés pour l'accès aux femelles (*local mate competition*, LMC; Hamilton, 1967; Alexander & Sherman, 1977). Cette compétition réduit d'autant leur valeur reproductive, et reines et ouvrières trouveront un avantage à biaiser le sex-ratio en faveur du sexe femelle. Des cas de compétition sexuelle ont été décrits chez quelques espèces de fourmis, dont *Messor aciculatus* (Hasegawa & Yamaguchi, 1995) ou *Cardiocondyla obscurior* (Cremer & Heinze, 2002). Cette dernière présente des sociétés

monogynes et polygynes. En outre, elle produit deux types de mâles: des mâles ailés, spécialisés dans la dispersion, et des mâles aptères, qui se reproduisent au sein du nid et engagent des combats mortels avec leurs rivaux pour accéder aux femelles vierges (Kinomura & Yamauchi, 1987; Stuart et al., 1987). En situation de monogynie, les mâles sont frères et donc plus apparentés que dans les systèmes polygynes où la corrélation génétique est fortement diluée. Cremer & Heinze (2002) ont montré que, conformément aux prédictions de la LMC, les colonies monogynes produisent proportionnellement moins de mâles que les colonies polygynes. Ce contrôle du sex-ratio en réponse à l'intensité de la compétition sexuelle est sous l'influence des reines, lesquelles pondent significativement moins d'oeufs haploïdes en situation de monogynie (forte LMC) que de polygynie (faible LMC; de Menten et al., 2005b). De même, la dispersion des jeunes fondatrices est limitée chez les espèces présentant un mode de fondation par bourgeonnement, ce qui induit une forte compétition entre femelles fondatrices apparentées pour l'accès aux ressources (site de nidifications, ressources alimentaires; *local resource competition*, LRC) et réduit leur valeur reproductrice (Clarck, 1978; Frank, 1987). Dans cette situation, l'intérêt des reines et des ouvrières convergent et le sex-ratio est biaisé en faveur du sexe mâle. Chez les fourmis, l'influence de la LRC sur le sex-ratio est difficile à mettre en évidence, car le mode de fondation par bourgeonnement est étroitement associé à la polygynie (Keller, 1991). Or, la polygynie réduit les asymétries de parenté au sein des sociétés, favorisant du même coup un sex-ratio biaisé en faveur du sexe mâle (Crozier & Pamilo, 1996). La polygynie peut ainsi masquer l'effet des stratégies de dispersion. La fourmi *Myrmica ruginodis* présente des populations principalement monogynes avec un mode de fondation indépendante, et des populations polygynes où la fondation s'effectue par bourgeonnement. Walin &

Seppä (2001) ont montré que, conformément aux prédictions de la *LRC*, la production en femelles s'accroît avec la production totale en sexués dans les systèmes monogynes, mais pas dans les systèmes polygynes caractérisés par une plus forte compétition locale pour les ressources.

Objectifs

Cette thèse rassemble les résultats de nos travaux portant sur l'étude des stratégies reproductrices de la fourmi *C. cursor*, une espèce inféodée aux sites arides et ensoleillés du nord de la Méditerranée (Agosti, 1990). Thermophile, elle se nourrit de cadavres d'arthropodes qu'elle récolte principalement aux heures les plus chaudes de la journée. Cette espèce est avant tout caractérisée par la possibilité pour ses ouvrières, qui ne s'accouplent jamais, de pondre en l'absence de la reine (Cagniant, 1973). Ces oeufs se développeront en mâles, par parthénogenèse arrhénotoque, mais ils peuvent aussi donner naissance à des femelles, par parthénogenèse thélytoque. Si la production de mâles par les ouvrières est un phénomène relativement rare chez les Formicidae, la production de femelles par parthénogenèse thélytoque est, elle, exceptionnelle et n'a été rapportée que chez cinq autres espèces à ce jour (voir Introduction, p. 12). Les ouvrières de *C. cursor* pourraient donc potentiellement augmenter leur succès reproductif inclusif en élevant à la fois leurs soeurs et leurs filles.

Cette espèce possède trois autres caractéristiques qui, associées à la capacité des ouvrières à se reproduire par parthénogenèse, font de *C. cursor* un modèle biologique remarquable pour l'étude des stratégies reproductrices chez les Formicidae et, de manière plus générale, tester les prédictions de diverses théories en biologies évolutives, telles la théorie de la sélection de la parentèle ou la théorie du sexe ratio.

Premièrement, cette espèce est considérée comme monogyne, car les observations de terrain révèlent la présence d'une seule reine par colonie (Cagniant, 1980; Lenoir *et al.*, 1988). Cependant, la présence d'une seule reine par colonie n'exclut pas la possibilité d'une polygynie séquentielle (André *et al.*, 2001), et seules des analyses génétiques pourraient confirmer la monogynie. Le premier article présente le développement des marqueurs

microsatel-lites, des outils génétiques qui permettront une analyse socio-génétique précise des sociétés et des populations de cette espèce. Le deuxième article est consacré à l'étude de l'utilisation sélective de la reproduction sexuée et asexuée par les reines de *C. cursor* pour la production de la caste ouvrière et reproductrice, respectivement. Le troisième article met en évidence le mécanisme cytologique de la parthénogenèse thélytoque chez les reines de cette espèce. Nous en inférons le taux de remplacement des reines par des filles d'ouvrières.

Ensuite, les nouvelles reines de *C. cursor* n'effectuent pas de vol nuptial (Lenoir *et al.*, 1988; Passera & Keller, 1990), comme c'est habituellement le cas chez les fourmis monogynes (Keller, 1991). Elles sont fécondées à proximité immédiate du nid maternel par des mâles étrangers issus de sociétés voisines très vraisemblablement

attirés par des phéromones sexuelles (inconnues à ce jour). Lenoir *et al.* (1988) ont suggéré que les femelles pouvaient s'accoupler avec plusieurs mâles différents. Cependant, les accouplements multiples ne signifient pas autant de transferts efficaces de sperme; à nouveau, seule une analyse génétique pourrait confirmer la polyandrie chez cette espèce. Le quatrième article présente nos estimations du nombre d'accouplements des reines de *C. cursor*. Nous testons également quelques-unes des hypothèses permettant de justifier l'évolution et le maintien de la polyandrie.

Enfin, les nouvelles colonies sont fondées par bourgeonnement (*budding*), c'est-à-dire que les nouvelles reines quittent le nid accompagnées d'ouvrières pour établir une nouvelle colonie à proximité (Lenoir *et al.*, 1988). La dispersion des nouvelles reines est donc limitée, ce qui peut influencer la structure génétique des populations (isolement par la distance, ou viscosité génétique), dans la mesure où les sociétés voisines sont souvent apparentées. Ce mode de fondation est exceptionnel pour une espèce monogyne (Keller, 1991). Le cinquième et dernier article de cette thèse met en évidence l'influence des stratégies de dispersion (fondation des colonies par bourgeonnement) sur le sex-ratio de la descendance sexuée.

Article 1.

Développement de marqueurs microsatellites pour la fourmi *Cataglyphis cursor*

Nous avons développé et caractérisé 8 loci microsatellites à partir d'ADN génomique et testé la variabilité de ces loci à partir de l'ADN de 19 ouvrières. Chacun de ces loci s'est révélé hautement polymorphe, avec 5 à 10 allèles par locus et un niveau d'hétérozygotie élevé. Les amplifications inter-spécifiques indiquent également que ces microsatellites sont potentiellement utiles pour l'analyse génétique d'autres espèces appartenant au genre *Cataglyphis*.

Pearcy M., Clémencet J., Chameron S., Aron S. & Doums C. (2004). Characterization of nuclear DNA microsatellite markers in the ant *Cataglyphis cursor*. *Mol. Ecol. Notes* **4**: 642-644.

PRIMER NOTE

Characterization of nuclear DNA microsatellite markers in the ant *Cataglyphis cursor*

M. PEARCY,* J. CLÉMENTCET,† S. CHAMERON,‡ S. ARON* and C. DOUMS†

*Eco-Ethologie Evolutive, Université Libre de Bruxelles, CP 160/12, 1050 Brussels, Belgium, †EPHE & Laboratoire d'Ecologie, Université Paris VI, 75252 Paris Cedex 05, France, ‡Laboratoire Ethologie Expérimentale et Comparée, Université Paris XIII, 93430 Villetaneuse, France

Abstract

The ant *Cataglyphis cursor* is exceptional in that unmated workers are potentially able to lay both male and female eggs. We characterized eight pairs of primers for microsatellite loci, developed from genomic DNA for this species. Variability was tested with DNA from 19 workers and all eight loci were highly polymorphic, displaying 5–10 alleles and a high level of heterozygosity. Cross-species amplifications indicate that these microsatellites might be useful in genetic studies of other species belonging to the genus *Cataglyphis*.

Keywords: ant, *Cataglyphis*, cross-species amplifications, microsatellite, thelytoky

Received 11 May 2004; revision received 7 June 2004; accepted 2 July 2004

Kin selection (Hamilton 1964) explains the evolution of a sterile worker caste among social insects in a context of natural selection. Altruistic individuals do not reproduce but still can transmit copies of their genes to the next generation by favouring reproduction of kin, such as parents and siblings. Ants are a well known example of societies where workers sacrifice their own reproduction to participate in cooperative tasks, such as foraging, nest building or rearing offspring nestmates (Hölldobler & Wilson 1990). In the ant *Cataglyphis cursor*, workers have kept functional ovaries and can lay eggs that will develop into males, by arrhenotokous parthenogenesis, but also into females, by thelytokous parthenogenesis (Cagniant 1979). Worker reproduction is rare in the Formicidae and thelytokous parthenogenesis has been shown in only four other species: *Pristomyrmex pungens* (Itow *et al.* 1984), *Cerapachys biroi* (Tsuji & Yamauchi 1995), *Platythyrea punctata* (Heinze & Hölldobler 1995) and *Messor capitatus* (Grasso *et al.* 2000). Despite its peculiar reproductive biology, population and colony genetic structure in *C. cursor* remains unknown and no genetic markers are available for the genus.

Here, we characterize eight highly polymorphic microsatellite markers from *Cataglyphis cursor* nuclear DNA. We also report the results of cross-amplification of these primers on five other *Cataglyphis* species belonging to four

different groups of the genus: *C. bicolor* (*bicolor* group), *C. fortis* (*fortis* group), *C. mauritanicus* and *C. velox* (*altisquamis* group) and *C. nodus* (*niger* group). In addition to these five species, we also tested these primers on workers belonging to a remote *C. cursor* population from Mongolia.

Genomic DNA was extracted from three cocoons of *C. cursor* collected at Port Leucate (France) using a high salt procedure (Sambrook *et al.* 1989). RNA strands were removed by incubating the sample for 2 h at 37 °C with 1% RNAase. Genomic DNA was then partially digested with the enzyme *Sau3A* and a fraction ranging from 400 to 800 base pairs was isolated after electrophoresis in low melting agarose gel (*NuSieve*®). The resulting fragments were purified with GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences), ligated into a phagemid vector (*pbluescript*®II SK(+), Stratagene), and cloned in *Escherichia coli* XL-1 Blue competent cells (Stratagene). Synthetic oligonucleotides (TC)₁₀ and (TG)₁₀, labelled with the DIG system (Boehringer Mannheim) were used to screen about 3150 recombinant colonies. Out of the 73 positives clones that were successfully sequenced (single strand) by Genome Express (France), 65 contained repeated patterns. Twenty-seven sequences contained mononucleotide sequences: 8 polyA and 21 polyT. Thirty-eight sequences contained dinucleotide sequences. From these sequences, 20 pairs of primers were designed using the online software PRIMER 3 (Rozen & Skaletsky 2000; URL: http://www.molbiol.ox.ac.uk/cgi-bin/primer3_www.cgi/). After a prescreening using

Correspondence: M. Percy. Fax: +32 2650 24 45; E-mail: mpercy@ulb.ac.be

Table 1 Characteristics of microsatellite loci in the ant *Cataglyphis cursor*. The size range, the number of alleles (N_a), the observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities and the frequency of the most common allele [Freq (A)] are based on 19 workers collected in St Hyppolite (France) in 2001

Locus	AN	Repeat motif	Size (bp)	N_a	H_O	H_E	Freq (A)	Primers (5'-3')
Ccur11	AY590645	[GA] ₁₅	239–279	10	0.851	0.827	0.237	F: GATTGGCTTGGCGGTATC* R: GGTCGCAAGAGTCACGAG
Ccur26	AY590646	[GA] ₁₄	102–114	5	0.781	0.780	0.333	F: TGACTCGTGATCTGCTCGTG* R: ATGGGCGTGAATCTCTCTTTTC
Ccur46	AY590647	[TC] ₁₇	151–181	10	0.750	0.733	0.474	F: TGACAACACTACCTGCAATAGACG* R: CCAACCAACGAGATTTCGAC
Ccur58	AY590651	[TG] ₁₅	134–182	9	0.833	0.810	0.316	F: TAGTTGGCTGCTCGAATG* R: TGTGCTGTGCTTGAATCTC
Ccur63b	AY590654	[GA] ₁₉	180–214	9	0.787	0.765	0.421	F: GTGTATTAACCTCTCCGAAGCAAG* R: GTACCTCACCTGGCATAACCG
Ccur76	AY590656	[TG] ₁₉	190–212	9	0.799	0.800	0.389	F: TGCCTCCCGTTGAGTATG R: TGCTTGAAGGTAATGAGC*
Ccur89	AY590658	[AG] ₂₂	126–144	9	0.729	0.780	0.500	F: CTGAAGTCTCCGACATATAGC R: GAACGAGAACCCAGCAAGG*
Ccur99	AY590662	[CA] ₈	101–137	10	0.840	0.840	0.306	F: GCGGAACATTACACGCATAC* R: GTTGAATGACCAGTAACACACG

*Labelled primer.

Table 2 Cross-species amplifications of four polymorphic microsatellite loci. The localization of the sampling is indicated for each species, and the number of individuals (workers) screened is given in brackets. The size range of the amplification product is given for each locus together with the number of alleles found among the sample (in brackets)

Locus	<i>C. fortis</i> (3) Tunisia	<i>C. velox</i> (2) Spain	<i>C. mauritanicus</i> (5) Tunisia	<i>C. bicolor</i> (6) Tunisia	<i>C. nodus</i> (3) Greece	<i>C. cursor</i> (2) Mongolia
Ccur11	243 (1)	245–257 (2)	242–250 (3)	258–267 (3)	—	239–243 (2)
Ccur26	106–126 (2)	104–121 (2)	100–106 (4)	109–119 (3)	94 (1)	94–112 (2)
Ccur46	137 (1)	—	—	—	—	137 (1)
Ccur58	138 (1)	175–193 (2)	138–201 (4)	154 (1)	—	145–154 (2)
Ccur63b	171 (1)	164–185 (2)	171–185 (6)	171 (1)	—	179–192 (2)
Ccur76	—	176–184 (3)	184–194 (4)	—	194–198 (2)	196–206 (3)
Ccur89	118–124 (2)	113–121 (2)	112–114 (2)	118–123 (3)	118 (1)	112–118 (2)
Ccur99	—	122–132 (2)	90–94 (2)	100–117 (2)	102 (1)	103–117 (2)

radioactive dATP, eight markers out of the nine that successfully amplified were selected on the basis of the quality of amplification and potential variability. Their variability was then assessed further on a sample of 19 workers originating from 19 different colonies (one worker per colony) collected in a population close to St Hyppolite (France) in 2001.

Amplifications were carried out in a 10 μ L volume containing about 20 ng of genomic DNA, 0.19 mM of each dNTP, 0.25 μ M of each primer, 1X *Taq* Buffer (containing 15 mM MgCl₂) and 0.03 U *Taq* DNA polymerase (Qiagen). Amplifications were performed in a GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems) thermal cycler with the following parameters: after an initial denaturing step of 2 min at 94 °C, the PCR consisted of 10 cycles of 15 s at 94 °C, 15 s at 52 °C (the annealing temperature) and 30 s at 72 °C, followed by 20 cycles of 15 s at 89 °C (to preserve the fluorescent markers), 15 s at 52 °C and 30 s at 72 °C, with 10 more minutes at 72 °C for the final extension. Amplified

fluorescent fragments were visualized using the automated Applied Biosystems Prism 310 sequencer (Perkin-Elmer, USA). The size of the different alleles was determined using the ROX-400HD internal size standard and the GENESCAN version 3.2.1 analysis software (Applied Biosystems).

All eight loci were highly polymorphic (Table 1). The expected heterozygosity (H_E) ranged from 0.73 to 0.83 and we found five to 10 alleles within the study population. The probability of deviation from Hardy–Weinberg equilibrium or linkage disequilibrium between pair of loci were both calculated using GENEPOP version 3.4 (Raymond & Rousset 1995), and alpha was adjusted using sequential Bonferroni correction for multiple tests. No significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium were detected for any locus, and all pairwise tests of linkage disequilibrium were nonsignificant.

Results of the cross-species amplifications are given in Table 2. Seven of the eight loci amplified successfully on

most other *Cataglyphis* species. The locus Ccur46 successfully amplified only in samples of *C. fortis* and *C. cursor* from Mongolia. The occurrence of different alleles indicate that these primers are potentially useful for genetic studies in other species of this genus.

Acknowledgements

Thanks to M. Knaden and R. Wehner for providing samples for cross-species amplifications, and to B. Viginier for technical assistance. This work was supported by grants from the F.R.I.A. (MP), the Belgian F.N.R.S. (SA) and the French Ministry of Research 'Action concertée incitative jeunes chercheurs 2001' (N°5183) (CD).

References

- Cagniant H (1979) La parthénogénèse thélytoque et arrhénotoque chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonsc. (Hym. Form.). Cycle biologique en élevage des colonies avec reine et des colonies sans reine. *Insectes Sociaux*, **26**, 51–60.
- Grasso DAT, Wenseleers T, Mori A, Le Moli F, Billen J (2000) Thelytokous worker reproduction and lack of *Wolbachia* infection in the harvesting ant *Messor capitatus*. *Ethology, Ecology and Evolution*, **12**, 309–314.
- Hamilton WD (1964) The genetical evolution of social behavior. *Journal of Theoretical Biology*, **7**, 1–52.
- Heinze JB, Hölldobler B (1995) Thelytokous parthenogenesis and dominance hierarchies in the ponerine ant *Plathytyrea punctata*. *Naturwissenschaften*, **82**, 40–41.
- Hölldobler B, Wilson EO (1990) *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Itow T, Kobayashi K, Kubota M, Ogata K, Imai HT, Crozier RH (1984) The reproductive cycle of the queenless ant *Pristomyrmex pungens*. *Insectes Sociaux*, **31**, 87–102.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP, Version 1.2 population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds Krawetz S, Misener S), pp. 365–386. Humana Press, Totowa, NJ. Source code available at http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Tsuji K, Yamauchi K (1995) Production of females by parthenogenesis in the ant *Cerapachys biroi*. *Insectes Sociaux*, **42**, 333–336.

Article 2.

Utilisation conditionnelle de la reproduction sexuée et de la parthénogenèse pour la production des ouvrières et des reines chez la fourmi *Cataglyphis cursor*

Le développement des marqueurs microsatellites nous a permis d'analyser la structure socio-génétique des populations et des sociétés de *C. cursor*. De manière surprenante, cette analyse a révélé que les reines étaient capables d'utiliser la reproduction sexuée et asexuée de manière sélective.

Le succès de la reproduction sexuée au sein des espèces animales a longtemps été considéré comme un paradoxe, dans la mesure où les individus ne transmettent que la moitié de leur génome à leur descendance. *C. cursor* évite ce coût en utilisant des modes de reproduction alternatifs pour la production d'individus reproducteurs (les reines) et stériles (les ouvrières). Les nouvelles reines sont donc produites presque exclusivement par parthénogenèse thélytoque, alors que les ouvrières sont produites par reproduction sexuée. Nos travaux montrent que l'utilisation sélective de la reproduction sexuée et asexuée pour la production de la caste ouvrière et reproductrice permet aux reines de *C. cursor* de maximiser la proportion de gènes transmis à la génération suivante tout en conservant une diversité génétique élevée au sein de la colonie, tirant ainsi profit des avantages de chacun des deux modes de reproduction.

Pearcy M., Aron S., Doums C. & Keller L. (2004). Conditional use of sex and parthenogenesis for worker and queen production in ants. *Science* **306**: 1780-1783.

Many variations of the method are possible. The activity and affect descriptors used to describe episodes should fit the particular topic of investigation. Interactive questionnaires offer further opportunities to tailor the affect terms to the respective episode; for example, when the individual identifies an episode as an interaction with customers rather than with family members, different descriptors could be presented. Other variations could make the method more practical for adoption in conventional surveys. Our preliminary work suggests that much of the benefit of the DRM in producing accurate emotional recall could be retained if respondents are asked to retrieve specific recent episodes of a designated type (e.g., “the last occasion on which you went out to dinner”). When samples are large and interviewing time is scarce, the allocation of different situations to subgroups of respondents makes it possible to achieve comprehensive coverage of situations while minimizing respondent burden. In conjunction with time-use data obtained from other sources, affect profiles of the main activities in which people engage could be integrated to produce a duration-weighted assessment of the experience of the population and of subgroups. The DRM or its variants could also contribute to the development of an accounting system for the well-being of society, a potentially important tool for social policy (32, 33).

References and Notes

1. M. Bergner, M. L. Rothman, *Annu. Rev. Public Health* **8**, 191 (1987).
2. S. Cohen, W. Doyle, R. Turner, C. Alper, D. Skoner, *Psychol. Sci.* **14**, 389 (2003).
3. M. Marmot, *The Status Syndrome* (Bloomsbury, London, 2004).
4. F. T. Juster, in *Time, Goods, and Well-Being*, F. Juster, F. Stafford, Eds. (Institute for Social Research, Ann Arbor, MI, 1985), pp. 397–414.
5. P. van de Ven, B. Kazemier, S. Keuning, *Measuring Well-Being with an Integrated System of Economic and Social Accounts* (Department of National Accounts, Voorburg, Netherlands, 1999).
6. F. Y. Edgeworth, *Mathematical Psychics: An Essay on the Application of Mathematics to the Moral Sciences* (C. K. Paul, London, 1881).
7. D. Kahneman, P. Wakker, R. Sarin, *Q. J. Econ.* **112**, 375 (1997).
8. G. Dow, J. F. Juster, in *Time, Goods, and Well-Being*, F. Juster, F. Stafford, Eds. (Institute for Social Research, Ann Arbor, 1985), pp. 397–413.
9. L. Flood, *Household, Market, and Nonmarket Activities: Procedures and Codes for the 1993 Time-Use Survey* (Uppsala Univ. Dept. Economics, Uppsala, Sweden, 1997), vol. VI.
10. A. Campbell, *The Sense of Well-Being in America* (McGraw-Hill, New York, 1981).
11. F. M. Andrews, S. B. Whithey, *Social Indicators of Well-Being: Americans' Perceptions of Life Quality* (Plenum, New York, 1976).
12. M. Csikszentmihalyi, R. E. Larsen, *J. Nerv. Ment. Dis.* **175**, 526 (1987).
13. A. A. Stone, S. S. Shiffman, M. W. DeVries, in *Well-Being: The Foundations of Hedonic Psychology*, D. Kahneman, E. Diener, N. Schwarz, Eds. (Russell-Sage, New York, 1999), pp. 61–84.
14. M. D. Robinson, G. L. Clore, *Psychol. Bull.* **128**, 934 (2002).
15. R. Belli, *Memory* **6**, 383 (1998).

16. Materials and methods are available as supporting material on *Science Online*.
17. A. A. Stone et al., *J. Pers. Soc. Psychol.* **74**, 1670 (1998). Respondents with high levels of job stress were recruited in New York ($n = 88$ men, 91 women; average age 40.0 years; 89% white; 58% married; 50% had some college). Situations and affect descriptors were similar to the DRM study.
18. K. N. Fortson, *Monthly Labor Rev.* **127**, 18 (2004).
19. We conducted an auxiliary random-digit-dial phone survey of 69 women, who ranked the activities from most to least enjoyable. Kendall's W coefficient of concordance among the ranks was 0.47, slightly higher than the concordance of economists' rankings of journals (20).
20. K. Axaroglou, V. Theoharakis, *J. Euro. Econ. Assoc.* **1**, 1402 (2003).
21. Thirty-nine job features (e.g., tenure and job level) were entered into a regression to predict duration-weighted enjoyment at work (16).
22. N. K. Semmer, S. Grebner, A. Elfering, in *Research in Occupational Stress and Well-being*, P. Perrewé, D. Ganster, Eds. (JAI, Amsterdam, 2004), vol. 3, pp. 207–263.
23. Twenty personal features (e.g., age and marital status) predicted duration-weighted enjoyment at work (16).
24. We computed enjoyment at home for respondents who reported “no problem at all” in keeping up “enough enthusiasm to get things done” during the last month and for respondents who reported “somewhat of a problem.” The difference between the groups spanned 46% of the enjoyment scale.

25. R. A. Easterlin, *J. Econ. Behav. Org.* **27**, 35 (1995).
26. P. Brickman, D. T. Campbell, in *Adaptation-Level Theory*, M. Appley, Ed. (Academic Press, New York, 1971), pp. 215–231.
27. The first question in the survey was “How satisfied are you with your life as a whole these days? Are you very satisfied, satisfied, not very satisfied, or not at all satisfied?”.
28. D. Kahneman, in *Choices, Values and Frames*, D. Kahneman, A. Tversky, Eds. (Cambridge Univ. Press, New York, 2000), chap. 38.
29. D. A. Schkade, D. Kahneman, *Psychol. Sci.* **9**, 340 (1998).
30. S. Lyubomirsky, K. M. Sheldon, D. Schkade, *Rev. Gen. Psychol.*, in press.
31. G. Becker, *Econ. J.* **75**, 493 (1965).
32. D. Kahneman, A. B. Krueger, D. A. Schkade, N. Schwarz, A. A. Stone, *Am. Econ. Rev.* **94**, 429 (2004).
33. E. Diener, M. Seligman, *Psychol. Sci. Pub. Int.* **5**, 1 (2004).
34. This research was supported by the William and Flora Hewlett Foundation, and also by the Woodrow Wilson School of Public and International Affairs at Princeton, the NSF, and the National Institute on Aging. Order of authorship is alphabetical. D.K. is affiliated with the Gallup Organization. A.A.S. holds equity in and is the Associate Chair of the Scientific Advisory Board of invivodata, Inc., a company that markets an electronic patient diary system.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/306/5702/1776/DC1
Materials and Methods

2 August 2004; accepted 30 September 2004

Conditional Use of Sex and Parthenogenesis for Worker and Queen Production in Ants

Morgan Pearcy,¹ Serge Aron,^{1*} Claudie Doums,² Laurent Keller³

The near-ubiquity of sexual reproduction in animal species has long been considered a paradox because sexually reproducing individuals transmit only half of their genome to their progeny. Here, we show that the ant *Cataglyphis cursor* circumvents this cost by using alternative modes of reproduction for the production of reproductive and nonreproductive offspring. New queens are almost exclusively produced by parthenogenesis, whereas workers are produced by normal sexual reproduction. By selectively using sex for somatic growth and parthenogenesis for germline production, *C. cursor* has taken advantage of the ant caste system to benefit from the advantages of both sexual and asexual reproduction.

The main advantage of asexual reproduction is that it confers a twofold advantage over sexuality by allowing, generation by generation, the transmission of twice the number of genes to offspring (1, 2). However, asexual reproduction is also associated with both short-term and long-term disadvantages, including a lower genetic diversity of offspring

and a reduced rate of adaptive evolution of species (3, 4). The nature and the degree of the cost associated with asexual reproduction is expected to vary across taxa, depending on the biology of the species and the type of environment in which they live (1–3).

In ants, as in other Hymenoptera, females are usually produced by sexual reproduction and are diploid, whereas males develop from unfertilized eggs and are haploid (3). The diploid fertilized eggs can develop into either new queens (gynes) or workers, with the developmental switch generally under environmental control (5). In the Cape honey bee and five ant species, however, unmated workers may reproduce by thelytokous parthenogenesis (6–11); that is, they may produce female

¹Behavioural and Evolutionary Ecology, CP 160/12, Université Libre de Bruxelles, av. F. D. Roosevelt 50, B-1050 Brussels, Belgium. ²Fonctionnement et Evolution des Systèmes Ecologiques, Université Paris VI, 7 quai St. Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France. ³Department of Ecology and Evolution, Bâtiment de Biologie, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: saron@ulb.ac.be

offspring from unfertilized eggs. While conducting a population genetic study of one of these species, the ant *Cataglyphis cursor*, we discovered that not only unmated workers but also mated queens can use thelytokous parthenogenesis. Pedigree analyses indicated that queens use automictic parthenogenesis with central fusion where two of the four products of meiosis merge. Unlike workers, queens use this mode of reproduction specifically to produce new queens.

Cataglyphis cursor is a common ant in the dry forests of Europe. Colonies usually contain a single queen and up to 3000 workers. Only few colonies produce gynes, and the number of gynes produced per colony is small. This is because *C. cursor* has an unusual mating system whereby gynes mate near the parental nest before leaving the colony with adult workers to initiate new colonies 3.2 to 11.3 m away (12). Previous studies also indicate that *C. cursor* workers can produce both gynes and workers parthenogenetically in colonies that have lost the mother queen (7).

We collected 38 large colonies in Southern France and genotyped 532 workers at four highly polymorphic microsatellite loci (expected heterozygosities, 0.833 to 0.944) (13). The genotypes indicated that 35 of these colonies contained a single reproductive queen (monogyny), whereas three colonies contained offspring from at least two queens. Analysis of lab-raised worker progeny ($n = 437$ freshly eclosed workers) from 12 queens showed that they had mated with an average of 5.6 ± 1.3 males (range, 4 to 8).

A detailed analysis of the 35 monogynous colonies showed that most of the workers in these colonies could only have been produced by sexual reproduction. Overall, 476 of the 489 workers (97.3%) genotyped in the 35 colonies harbored, at one or several loci, alleles that were not present in the mother queen and came from one of the queen's mates. It is impossible to determine whether the 13 workers harboring only alleles identical to those of their mother were fathered by a male that had no allele distinct from those of the queen or whether they had been parthenogenetically produced. Because the four microsatellite loci were highly polymorphic, the probability of mating with a male harboring no diagnostic allele at any of

the four loci was low, ranging from 0.0001 to 0.013 across colonies according to the queen's genotype. Thus, of the 476 workers, only one was expected to have no diagnostic allele. Hence, it is likely that some or all of the 13 workers with no diagnostic paternal allele may indeed have been asexually produced (the estimated proportion of asexually produced workers is 2.5% when corrected for the probability of nondetection of paternal alleles).

A total of 56 gynes were produced by 10 of the 35 monogynous colonies. In contrast to workers, most of these gynes (54 of 56) had alleles at the four loci that could all be attributed to the queen (Fig. 1A), hence these gynes had been produced by parthenogenesis. The alternative explanation, that these 54 gynes had been fathered by a male having no diagnostic alleles, can be ruled out. Queens and males came from the same gene pool, as indicated by a lack of significant difference in allele frequencies for the four loci (Fisher exact test, all $P > 0.05$) and the workers' *Fis* value (an index of observed versus expected homozygosity), which was not significantly different from zero ($Fis = 0.011 \pm 0.015$, $n = 35$ colonies; two-tailed *t* test, $t = 0.691$, $P = 0.494$). This, together with the high allelic diversity, resulted in a very high probability to detect a male's genetic contribution. However, none of the gynes produced in nine of the 10 colonies had any diagnostic allele, even though the likelihood of such a matched mating was lower than 0.013 in each of the nine colonies (range, 0.0001 to 0.013). Overall, the probability that all the fathers of the gynes produced in the nine

colonies had no diagnostic alleles was $P < 10^{-28}$. Indeed, the genotypes of workers in these nine colonies confirmed that all or most of the males that mated with the queens had diagnostic alleles at one or more loci (Fig. 1B). The outcome of the vast majority of gynes being produced by parthenogenesis was that the relatedness between queens and gynes was very high ($r = 0.864 \pm 0.046$, $n = 56$ gynes) and significantly greater ($P < 0.001$) than the theoretical value of 0.50 expected under sexual reproduction.

Most of the 54 parthenogenetic gynes were neither genetically identical to each other within a colony nor genetically identical to their mother queen. The discrepancies resulted from gynes being homozygous at some loci where the mother queen was heterozygous. In all cases, the gynes were homozygous for one of the two maternal alleles. This is the expected pattern under automictic parthenogenesis with central fusion. Because two of the four products of meiosis merge, the offspring have the same genotype as their mother for the loci that did not cross over, whereas the offspring is homozygous for one of the two maternal alleles if crossing-over did occur (14, 15). The frequency of transition from heterozygosity is expected to vary across loci depending on their distance to the centromere (15). Consistent with this prediction, the frequency of transition from heterozygosity to homozygosity varied significantly across the four loci, presumably reflecting differences in the distance between each locus and the centromere (Table 1; $\chi^2 = 25.53$, $P < 0.0001$).

The expected outcome of automictic parthenogenesis is a gradual increase in homo-

Table 1. Proportion of gynes homozygous for a given locus when the mother was heterozygous at that locus. The sample size for each locus is indicated.

Locus	Sample size	Percentage of gynes homozygous
<i>Ccur11</i>	53	5.7
<i>Ccur46</i>	47	46.8
<i>Ccur58</i>	47	34.0
<i>Ccur63b</i>	41	17.1

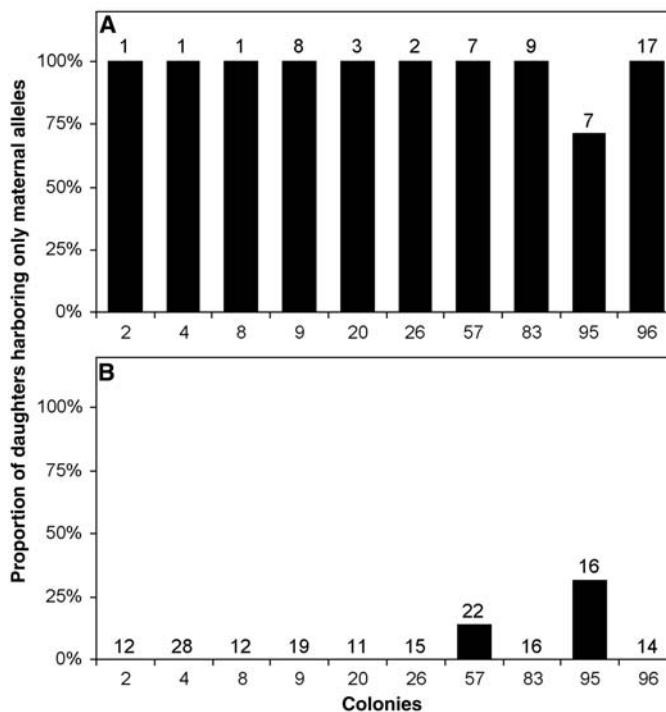


Fig. 1. Respective proportion of gynes (A) and workers (B) harboring maternal alleles only, and therefore interpreted as parthenogenetic daughters, in each of 10 colonies (colony numbers are laboratory designations). The sample size for each colony is indicated above the bars.

zygosity over time (16). Indeed, the overall level of homozygosity was significantly higher in gynes than in workers (Fig. 2; Fisher's exact test on the number of homozygous versus heterozygous loci in gynes and workers: $P < 0.0001$). Accordingly, F statistics revealed a significant excess of homozygosity in gynes ($F = 0.396 \pm 0.12$, $P < 0.001$) and queens ($F = 0.255 \pm 0.051$, $P < 0.001$) but not in workers from the same colonies ($F = 0.002 \pm 0.016$, $P = 0.45$). By increasing the levels of homozygosity, parthenogenesis should result in reduced queen survival and fitness, much like inbreeding does. However, the fitness effect might be limited for ant queens because they stay in the protected environment of the nest, except during colony founding. Even at this stage, the intensity of this cost should vary according to the mode of colony founding, with selection against more homozygous queens being higher in species where queens start a new colony on their own and lower in species, such as *C. cursor*, where queens do not go through a stage of independent colony founding (12).

In addition, two processes appear to counteract the process of genetic homogenization induced by automictic parthenogenesis. The first is the occasional production of gynes by sexual reproduction. The overall production of such gynes was 3.6% (2 of 56) in the 10 colonies studied. The second process is the occasional queen production by worker parthenogenesis. Because workers are usually produced by sexual reproduction, their contribution to gyne production will contribute to the maintenance of heterozygosity in gynes and queens, just as under queen sexual reproduction.

Although *C. cursor* queens do not require mating to produce diploid offspring, they have retained sexual reproduction to produce workers, which suggests that sexual reproduction has important benefits for colony function. The observed mating frequencies in

this species lie on the high end of the continuum of mating frequencies reported in ants (17). A possible explanation is that genetic input from an increased number of mates compensates for the negative effect of high queen homozygosity on colony genetic diversity. Parthenogenetic production of workers at the level observed for gynes would lower colony genetic diversity, which could lead to reduced defense against parasites, less efficient division of labor, and a decreased range of environmental conditions that a colony can tolerate (18–20). These costs are akin to those thought to lead to the instability of parthenogenetic reproduction in nonsocial organisms (2). Multiple mating lowered the overall relatedness of nestmate workers to $r = 0.42$ ($SE_{\text{jackknife}} = 0.02$, $n = 35$), a value well within the range of values reported in other ants (21). Thus, the high queen mating frequency may cancel out reduced genetic diversity at the colony level stemming from the relatively high queen homozygosity.

Using alternative modes of reproduction for the queen and worker castes may also enhance cooperation within the social group by aligning the interests of queens and workers. Parthenogenetic production of gynes by queens reduces conflict with workers because, just like queens, workers are significantly more closely related ($t = 2.31$, $df = 43$, $P = 0.03$) to the parthenogenetic gynes ($r = 0.59$, $SE_{\text{jackknife}} = 0.07$, $n = 10$) than they would be to sexually produced gynes or to gynes produced parthenogenetically by other workers (these two values are identical to the relatedness between workers, $r = 0.42$). As a result, workers should police the reproduction of other workers (22). The almost complete lack of worker-produced gynes in colonies containing a queen is consistent with this idea.

Conditional use of parthenogenesis for queen production might also occur in other ants, yet it may remain unnoticed because it

primarily occurs in dependent-founding species where it is most difficult to detect. In ants there is a strong association between the mode of colony founding and the number of queens, with dependent colony founding being almost exclusively restricted to species with high numbers of queens per nest (23, 24). The likelihood of detecting parthenogenesis with genetic markers is low in such species because it is very difficult to determine the maternity of female offspring. As a result, only a handful of studies in highly polygynous ants are sufficiently detailed to have enabled the detection of parthenogenesis.

This study shows that by taking advantage of the social caste system, *C. cursor* colonies can benefit from the advantages of both sexual and asexual reproduction. By using alternative modes of reproduction for the queen and worker castes, queens can increase the transmission rate of their genes to their reproductive female offspring while maintaining genetic diversity and social cohesion in the worker population. These findings, together with those of other recent genetic studies (25–29), indicate greater flexibility of the ant reproductive and social systems, thus providing an ideal ground to test various evolutionary predictions.

References and Notes

1. G. C. Williams, *Sex and Evolution* (Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, 1975).
2. J. Maynard Smith, *The Evolution of Sex* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1978).
3. G. Bell, *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality* (Univ. of California Press, Berkeley, CA, 1982).
4. S. A. West, C. M. Lively, A. F. Read, *J. Evol. Biol.* **12**, 1003 (1999).
5. E. O. Wilson, *The Insect Societies* (Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1971).
6. S. Verma, F. Ruttner, *Apidologie (Celle)* **14**, 41 (1983).
7. H. Cagniant, *Insect. Soc.* **26**, 51 (1979).
8. T. Itow *et al.*, *Insect. Soc.* **31**, 87 (1984).
9. K. Tsuji, K. Yamauchi, *Insect. Soc.* **42**, 333 (1995).
10. J. B. Heinze, B. Hölldobler, *Naturwissenschaften* **82**, 40 (1995).
11. D. A. T. Grasso, T. Wenseleers, A. Mori, F. Le Moli, J. Billen, *Ethol. Ecol. Evol.* **12**, 309 (2000).
12. A. Lenoir, L. Quérard, N. Pondicq, F. Bertoin, *Psyche (Stuttgart)* **95**, 21 (1988).
13. See supporting data on Science Online.
14. E. Suomalainen, A. Saura, J. Lokki, *Cytology and Evolution in Parthenogenesis* (CRC Press, Boca Raton, FL, 1987).
15. E. Baudry *et al.*, *Genetics*, in press.
16. J.-C. Simon, F. Delmotte, C. Rispe, T. Crease, *Biol. J. Linn. Soc.* **79**, 151 (2003).
17. J. E. Strassmann, *Insect. Soc.* **48**, 1 (2001).
18. P. W. Sherman, T. D. Seeley, H. K. Reeve, *Am. Nat.* **131**, 602 (1988).
19. R. H. Crozier, R. E. Page, *Behav. Ecol. Sociobiol.* **18**, 105 (1985).
20. B. J. Cole, D. C. Wiernasz, *Science* **285**, 891 (1999).
21. R. H. Crozier, P. Pamilo, *Evolution of Social Insect Colonies: Sex Allocation and Kin Selection* (Oxford Univ. Press, Oxford, 1996).
22. F. L. W. Ratnieks, *Am. Nat.* **132**, 217 (1988).
23. L. Keller, *Ethol. Ecol. Evol.* **3**, 307 (1991).
24. A. F. G. Bourke, N. R. Franks, *Social Evolution in Ants* (Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, 1995).
25. S. Helms Cahan *et al.*, *Proc. R. Soc. London Ser. B.* **269**, 1871 (2002).

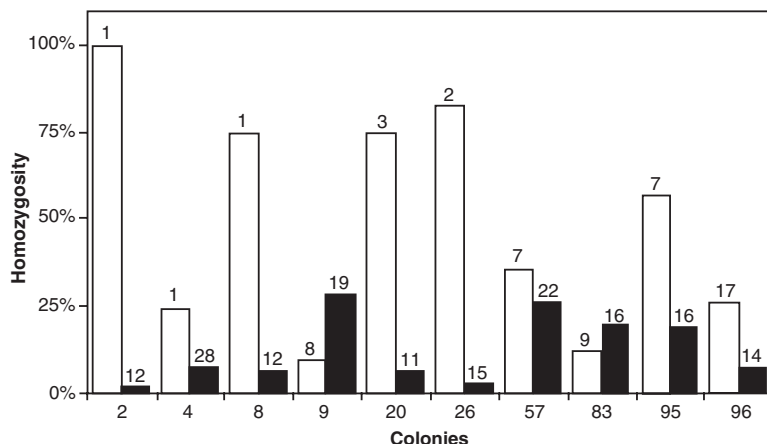


Fig. 2. Overall homozygosity detected in gynes (white) and workers (black) at all four loci, for each of 10 colonies. The sample size for each colony is indicated above the bars.

26. G. E. Julian, J. H. Fewell, J. Gadau, R. A. Johnson, D. Larrabee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8157 (2002).
 27. V. P. Volny, D. M. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6108 (2002).
 28. S. Helms Cahan, L. Keller, *Nature* **424**, 306 (2003).
 29. A. Hartmann, J. Wantia, J. A. Torres, J. Heinze, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 12836 (2003).
 30. We thank L. Beukeboom, M. Chapuisat, P. Christe,

R. Hammond, S. H. Cahan, J. M. Pasteels, K. Parker, and I. Sanders for their comments on the manuscript. Supported by a doctoral grant from Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (M.P.) and grants from the Belgian Fond National de la Recherche Scientifique (S.A.), the French Ministry of Research "Action concertée incitative jeunes chercheurs 2001" (C.D.), and the Swiss National Science Foundation (L.K.).

Supporting Online Material
www.sciencemag.org/cgi/content/full/306/5702/1780/DC1
 Materials and Methods
 References

21 September 2004; accepted 5 October 2004

Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide

Simon N. Stuart,^{1*} Janice S. Chanson,¹ Neil A. Cox,¹
 Bruce E. Young,² Ana S. L. Rodrigues,³ Debra L. Fischman,³
 Robert W. Waller³

The first global assessment of amphibians provides new context for the well-publicized phenomenon of amphibian declines. Amphibians are more threatened and are declining more rapidly than either birds or mammals. Although many declines are due to habitat loss and overutilization, other, unidentified processes threaten 48% of rapidly declining species and are driving species most quickly to extinction. Declines are nonrandom in terms of species' ecological preferences, geographic ranges, and taxonomic associations and are most prevalent among Neotropical montane, stream-associated species. The lack of conservation remedies for these poorly understood declines means that hundreds of amphibian species now face extinction.

Scientists first became concerned about widespread amphibian population declines when they met in 1989 at the First World Congress of Herpetology. Historical data indicate that declines began as early as the 1970s in the western United States (1, 2), Puerto Rico (3), and northeastern Australia (4). Subsequent reports revealed the severity of the declines. At one site in Costa Rica, 40% of the amphibian fauna disappeared over a short period in the late 1980s (5). Sudden disappearances of montane species were noted simultaneously in Costa Rica, Ecuador, and Venezuela (5–8). In some regions, many declines took place in seemingly pristine habitats (1–8). These reports were initially received with some skepticism because amphibian populations often fluctuate widely (9), but tests of probabilistic null models showed that the declines were far more widespread and severe than would be expected under normal conditions of demographic variation (5). This finding, in addition to many further reports of declines in the 1990s (8, 10–13), was pivotal in convincing most herpetologists that amphibian declines are nonrandom unidirectional events.

The lack of a comprehensive picture of the extent and severity of amphibian declines prompted us to conduct the IUCN–The World Conservation Union Global Amphibian Assessment (GAA) to gather data on the distribution, abundance, population trends, habitat associations, and threats for all 5743 described species of amphibians (14, 15). From this information, we used the IUCN

Red List Criteria (16) to determine the level of threat to every species. The raw GAA data are publicly available (14). The results demonstrate that amphibians are far more threatened than either birds (17) or mammals (18), with 1856 species (32.5%) being globally threatened [that is, listed in the IUCN Red List Categories (16) of Vulnerable, Endangered, or Critically Endangered], as compared with 12% of birds (1211 species) (17) and 23% of mammals (1130 species) (18). At least 2468 amphibian species (43.2%) are experiencing some form of population decrease, whereas only 28 (0.5%) are increasing and 1552 (27.2%) are stable; 1661 (29.1%) species have an unknown trend.

Many amphibian species are on the brink of extinction, with 427 species (7.4%) listed as Critically Endangered (CR) (the IUCN category of highest threat), as compared with 179 birds (1.8%) (17) and 184 mammals (3.8%) (18). The level of threat to amphibians is undoubtedly underestimated because 1294 species (22.5%) are too poorly known to assess [Data Deficient (DD)], as compared with only 78 birds (0.8%) (17) and 256 mammals (5.3%) (18). A significant proportion of DD amphibians is likely to be globally threatened. Analysis of trends in population and habitat availability indicates

Table 1. Habitat preferences and biogeographic affinities of rapidly declining and enigmatic-decline amphibians in relation to all amphibian species (15). Rapidly declining species are those that now qualify for listing in a IUCN Red List Category of higher threat than they would have had in 1980. Enigmatic-decline species are rapidly declining species that have shown dramatic declines, even where suitable habitat remains, for reasons that are not fully explained.

Habitat preferences	Total number of species (%)	Number of rapidly declining species (%)	Number of enigmatic-decline species (%)
Forest	4699 (81.8)	365 (82.6)	187 (90.3)***↑
Savanna	487 (8.5)	7 (1.6)***↓	0 (0.0)***↓
Shrubland	814 (14.2)	47 (10.6)*↓	14 (6.8)***↓
Grassland	953 (16.6)	81 (18.3)	39 (18.8)
Flowing water	2650 (46.1)	277 (62.7)***↑	164 (79.2)***↑
Marshes/swamps	760 (13.2)	43 (9.7)*↓	14 (6.8)**↓
Still water bodies	2030 (35.3)	107 (24.2)***↓	28 (13.5)***↓
Artificial terrestrial habitats	1304 (22.7)	40 (9.0)***↓	22 (10.6)***↓
Tropical lowland habitats	3392 (59.1)	212 (48.0)**↓	79 (38.2)***↓
Tropical montane habitats	2714 (47.3)	251 (56.8)***↑	155 (74.9)***↑
Biogeographic realms			
Afrotropical	951 (16.6)	28 (6.3)***↓	1 (0.5)***↓
Australasian/Oceanic	561 (9.8)	36 (8.1)	23 (11.1)
Australia and New Zealand	219 (3.8)	32 (7.2)***↑	23 (11.1)***↑
Indomalayan	938 (16.3)	59 (13.3)	1 (0.5)***↓
Nearctic	331 (5.8)	24 (5.4)	9 (4.3)
Neotropical	2,825 (49.2)	279 (63.1)***↑	174 (84.1)***↑
Palaearctic	451 (7.9)	34 (7.7)	2 (1.0)***↓

¹IUCN Species Survival Commission/Conservation International Center for Applied Biodiversity Science Biodiversity Assessment Unit, 1919 M Street N.W., Washington, DC 20036, USA. ²NatureServe, Apartado 75-5655, Monteverde, Puntarenas, Costa Rica. ³Center for Applied Biodiversity Science, Conservation International, 1919 M Street N.W., Suite 600, Washington, DC 20036, USA.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: s.stuart@conservation.org

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (27). ↑Significantly higher than average; ↓significantly lower than average.

Supporting online material

Methods

Sampling

Thirty-eight nests were excavated in Spring 2001, 2002 and 2003 in Port Leucate (Southern France) just before the emergence of the first adult gynes and males. For each colony a sample of 11 to 30 workers (532 workers overall) was immediately frozen for subsequent genetic analyses. The colonies were returned to the laboratory where males and gynes were collected upon emergence. Gynes were produced in only 10 (26%) of the colonies and their number was relatively small (1 to 17 per colony, 56 overall) which is typical for this species (Cagniant, 1980).

Genetic analyses

All individuals were genotyped at four microsatellite loci (*Ccur46*, *Ccur11*, *Ccur58* and *Ccur63b*) exhibiting 11, 13, 14 and 11 alleles, respectively. DNA extraction, amplification and primer sequences are described elsewhere (Pearcy *et al.* 2004). *F*-statistics, allele frequencies, inbreeding and relatedness coefficients were estimated using the program Relatedness 4.2c (Queller & Goodnight, 1989). Colonies were weighted equally and standard errors were obtained by jackknifing over colonies. To estimate the number of matings by queens, 437 callow workers were collected from 12 laboratory-reared colonies ($X \pm SD = 36.4 \pm 9.4$) in the end of August 2001 for mother-offspring genetic analyses. All these callows developed from eggs laid by the queen in the laboratory as developmental time from the egg to the adult stage is less than 40 days (Cagniant, 1979) and the colonies had been set up in the laboratory 90 days earlier. From this sample of mother-offspring combinations, we calculated the minimum number of mating per queen.

Non-detection probability

To ascertain the probability that a queen mated with a male with no diagnostic alleles, we determined for each queen and each

locus the probability that a male would share one of the queen's allele. When the queen is heterozygous at the *i*th locus this probability is $P_{non-detection} = (f_{1i} + f_{2i})$ where f_{1i} and f_{2i} are, respectively, the frequency of the first and the second allele at the *i*th locus in the studied population. When the queen is homozygous the probability is equal to the population frequency of this allele, (f_{ii}). To obtain the overall probability of absence of any diagnostic allele we multiplied, for each queen, the values obtained for each of the four loci. The expected proportion of workers harbouring no diagnostic allele is estimated as $W_e = \sum P_i x_i / x_t$ where P_i is the probability of non-detection relative to the *i*th queen, x_i is the number of workers sampled in the *i*th colony and x_t is the overall number of workers sampled.

References

- Cagniant H. (1980). La parthénogenèse thélytoque et arrhénotoque des ouvrières de la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonscolombe. Etude en élevage de la productivité de sociétés avec reine et de sociétés sans reine. *Insect. Soc.* **27**: 157-174.
- Pearcy M., Clémencet J., Chaméron S., Aron S. & Doums C. (2004a). Characterization of nuclear DNA microsatellite markers in the ant *Cataglyphis cursor*. *Mol. Ecol. Notes* **4**: 642-644.
- Queller D.C. & Goodnight K.F. (1989). Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**: 258-275.
- Cagniant H. (1979). La parthénogenèse thélytoque et arrhénotoque chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonsc. (Hym.Form.). Cycle biologique en élevage des colonies avec reine et des colonies sans reine. *Ins. Soc.* **26**: 51-60.

Article 3.

La parthénogenèse thélytoque et ses conséquences sur la consanguinité

L'inspection du pedigree des gynes produites par reproduction asexuée a révélé que celles-ci ne sont pas toujours génétiquement identiques à leur mère. En effet, certaines gynes sont homozygotes pour un locus où leur mère est hétérozygote, le double allèle étant toujours un des allèles maternels. Ces "erreurs de duplication" représentent une opportunité intéressante de déterminer le mode de parthénogenèse chez *C. cursor* et, de manière plus fondamentale, de déterminer le taux de reproduction ouvrière. En effet, différents mécanismes cytologiques peuvent sous-tendre la parthénogenèse thélytoque, chacun d'entre eux ayant un impact différent sur la génétique des populations. L'analyse du pedigree nous a permis de déterminer le taux de transition vers l'homozygotie, et ce pour quatre loci hautement polymorphes. En comparant les quatre taux aux proportions attendues sous les différents modes de parthénogenèse, nous avons découvert que la parthénogenèse automictique avec fusion centrale des noyaux polaires était le seul mode de parthénogenèse correspondant à nos données. Nous avons ensuite développé un modèle mathématique pour lier le taux d'homozygotie observé chez les reines et la proportion de reines produites par les ouvrières et les reines, en partant des postulats suivants: (i) la parthénogenèse est automictique avec fusion centrale et (ii) les lignées de reines sont parthénogénétiques, ce qui augmente la consanguinité à chaque génération, alors que les ouvrières sont issues d'oeufs fertilisés et ne sont donc pas consanguines. Les résultats indiquent que plus de 60% des colonies étaient dirigées par une reine issue des ouvrières. Cette proportion est élevée et suggère que la longévité des reines devrait être réduite. La parthénogenèse thélytoque chez *C. cursor* peut avoir été sélectionnée pour faire face à la mortalité importante des reines et, à l'origine, pour permettre aux ouvrières de remplacer la reine quand elle vient à disparaître.

Pearcy M., Hardy O., Aron S. (in press). Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant. *Heredity*.

Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant

Morgan Pearcy¹, Olivier Hardy¹, and Serge Aron¹

¹ Behavioral and Evolutionary Ecology, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

Corresponding author:

Morgan Pearcy

Behavioral and Evolutionary Ecology, CP 160/12

Université Libre de Bruxelles

50, av. F.D. Roosevelt

B - 1050 Brussels

Belgium

Phone: + 32 2 650 22 67

Fax: + 32 2 650 24 45

e-mail: mpearcy@ulb.ac.be

Keywords: Ants, parthenogenesis, *Cataglyphis cursor*, social organization, inbreeding, queen turnover

Running Title: Thelytokous parthenogenesis and inbreeding

Word Count: 3 374 words (excluding abstract, references, tables and figures)

Abstract

Thelytokous parthenogenesis, *i.e.* the production of diploid daughters from unfertilised eggs, may involve various cytological mechanisms, each having a different impact on the genetic structure of populations. Here, we determined the cytological mechanism of thelytokous parthenogenesis and its impact on inbreeding in the ant *Cataglyphis cursor*, a species where queens use both sexual and asexual reproduction to produce respectively workers and new queens. It has been suggested that thelytokous parthenogenesis in *C. cursor* might have been selected for to face high queen mortality and, originally, to allow workers to replace the queen when she passes away. We first determined the mode of thelytokous parthenogenesis by comparing the rate of transition to homozygosity at four highly polymorphic loci to expectations under the different modes of parthenogenesis. Our data show that thelytoky is achieved through automictic parthenogenesis with central fusion. We then estimated the proportion of colonies headed by worker-produced queens in a natural population. We designed a model linking the observed homozygosity in queens to the proportion of queens produced by workers, based on the assumption that (i) parthenogenesis is automictic with central fusion and (ii) queen lineage is asexually-produced resulting in an increase of the inbreeding over generations, whereas workers are sexually-produced and therefore not inbred. Our results indicate that more than 60% of the colonies should be headed by a worker-produced queen, suggesting that queen's lifespan is low in this species.

Introduction

Hymenoptera (ants, bees, wasps) are characterized by a haplodiploid sex determining system, whereby males arise from unfertilized eggs through arrhenotokous parthenogenesis and are haploid, whereas females develop from fertilized eggs and are diploid. In a few species, however, unmated females may produce diploid daughters from unfertilized eggs through thelytokous parthenogenesis. Thelytokous parthenogenesis is uncommon in the animal kingdom and has only been reported in about 1500 species (White 1984). In Hymenoptera, thelytoky has been documented in some taxa, including *Cynipidae*, *Tenthredinidae*, *Aphelinidae*, *Ichneumonidae*, *Apidae* and *Formicidae* (reviewed in Slobodchikoff and Daly 1971; Suomalainen *et al.*, 1987).

On a cytological basis, thelytokous parthenogenesis can be divided into two main types. In apomictic (or ameiotic) parthenogenesis, there is no recombination of alleles and the offspring are "true clones" of the mother. In automictic (or meiotic) parthenogenesis, the first stages of meiosis are similar to the ones in sexual reproduction, but fusion occurs between two nuclei originating from the same individual. Gene recombination can occur. Different mechanisms are known to restore the ploidy level in individuals developing from automictic parthenogenesis (see figure 1): terminal fusion, central fusion, gamete duplication and several alternative mechanisms referred to as "random fusion". The majority of parthenogens for which the cytological mechanism has been investigated in animals are automictic (Cook 1993).

The mode of thelytokous parthenogenesis is important to assess in population genetics studies because each mode has a different impact on inbreeding. In automictic parthenogenesis with terminal fusion (figure 1a), the offspring is completely homozygous, except when recombination occurs between the centromere and the locus. When the locus is far enough from the centromere, crossing-over occur and one may consider that alleles segregate independently. In this situation, the probability for an heterozygous locus of turning homozygous equals the mathematical probability of picking two identical alleles (a or b) among two pairs of alleles (aa and bb) *without replacement*, that is $1/3$. Hence, each heterozygous locus has a probability ranging from $1/3$ (far from centromere) to 1 (close to centromere) of becoming homozygous (table 1). In automictic parthenogenesis with central fusion (figure 1b), the offspring is genetically similar to the mother, except when there is recombination. With a similar reasoning, each heterozygous locus has a probability ranging from 0 (close to centromere) to $1/3$ (far from centromere) of becoming homozygous. In automictic parthenogenesis with "random fusion" (figure 1c), one may consider that all four

chromatids segregate independently, and each heterozygous locus has a probability of 1/3 of becoming homozygous, independent of its position on the chromosome. In automictic parthenogenesis with gamete duplication (figure 1d), the offspring is homozygous for all loci. Eventually, in apomictic parthenogenesis, there is no recombination and no increase in homozygosity. Table 1 summarizes how the different modes of parthenogenesis affect inbreeding.

In social Hymenoptera, it has been shown that thelytoky of *Apis mellifera capensis* workers is controlled by a single locus (Lattorff *et al.*, 2005). Cytological analysis indicated that diploidization results from automictic parthenogenesis with central fusion, *i.e.* the fusion of two of the four meiotic products that have a central position on the spindles and that were separated at the first meiotic division, whereas the two terminal nuclei degenerate (Verma and Ruttner, 1983; Baudry *et al.*, 2004). In ants, thelytokous parthenogenesis has been unambiguously demonstrated in six phylogenetically distant species only: *Cataglyphis cursor* (Cagniant, 1973), *Pristomyrmex pungens* (Itow *et al.*, 1984), *Cerapachys biroi* (Tsuji and Yamauchi, 1995), *Platythyrea punctata* (Heinze and Hölldobler, 1995; Schilder *et al.*, 1999), *Messor capitatus* (Grasso *et al.*, 2000) and *Wasmannia auropunctata* (Fournier *et al.*, in press). In the ponerine ant *P. punctata*, Schilder *et al.* (1999) showed that all individuals belonging to the same population are almost genetically identical to each other, suggesting that thelytokous parthenogenesis is apomictic. In the five other species, the mode of parthenogenesis underlying thelytoky remains unknown.

In this paper, we investigated the cytological mechanism of thelytokous parthenogenesis and its impact on inbreeding in the ant *Cataglyphis cursor*. In this species, workers are able to produce females (workers and queens) parthenogenetically in colonies that have lost the mother queen (Cagniant, 1973). It has been suggested that this ability would allow workers to replace the queen (Lenoir and Cagniant, 1986), but this hypothesis has not been investigated so far. Recently, it has been shown that not only unmated workers but also mated queens of *C. cursor* can use thelytokous parthenogenesis (Pearcy *et al.*, 2004b). While workers are produced by normal sexual reproduction from fertilized eggs, new queens (gynes) are almost exclusively produced by parthenogenesis. Data suggested that thelytoky proceeded by central fusion, but this hypothesis was not unambiguously demonstrated.

Here, we aimed to solve two major issues raised by these findings. First, we determined the mode of parthenogenesis of *C. cursor*. By using genetic markers, we compared the pedigree of the queen and her thelytokous daughters to estimate the rates of transition to

homozygosity at each locus, and compared these values to the expected rates of homozygosity under different modes of parthenogenesis. Second, we estimated the proportion of colonies headed by a replacement queen produced by the workers in a natural population. This was achieved by comparing the observed level of inbreeding of queens with the estimated rate of transitions to homozygosity for each locus, using expectations for a population at equilibrium.

Material and Methods

Field collection and sampling

Cataglyphis cursor is found in the stretches of steppe and Mediterranean forest up to dry forest, and is discontinuously distributed from central Spain to Mongolia (Agosti, 1990). Nests of *C. cursor* possess a single entrance and usually one vertical gallery leading to rooms located up to 1 meter deep, sometimes right above the water level. This species is characterized by the absence of overwintering brood (Cagniant 1976). Queens lay eggs from early March to early September. Adult sexuals of *C. cursor* emerge in mid-May; mating occurs in the nest in early June, and is followed 1 to 3 weeks later by colony budding (Lenoir *et. al.*, 1988). Transfer of workers and brood between the mother and daughter nests can last for some more weeks after which colonies remain isolated from each other.

Thirty-five nests of *C. cursor* were excavated in the end of April/early May 2001 at St-Hyppolite (southern France; 42.82° North, 2.99° East), before the emergence of the first sexuals. Colonies whose entrance were located too close (distance < 1m) from each other were not collected so as to prevent mixing individuals from different nests. Adults (queens and workers) as well as brood at various stages (eggs, larvae and both worker and sexual pupae) were collected and brought into the laboratory. A sample of workers from each nest was immediately stored at – 80°C for subsequent genetic analyses. Colonies were housed in artificial nests. They were maintained under laboratory conditions (26 ± 2°C and 12h:12h L:D) and were fed on cockroaches, sugar water and grape. Colonies were censused twice a week and all sexuals emerging from the pupae were collected and deep-frozen.

DNA extraction and microsatellite analysis

Four microsatellite loci (Ccur-46, Ccur-11, Ccur-58 and Ccur-63b; Pearcy *et. al.*, 2004a) exhibiting respectively 11, 13, 14 and 11 alleles were used to determine the genotype of individuals. Individual ant DNA was extracted by homogenization in a digestive solution (100mM NaCl, 50mM Tris, 1mM EDTA, 0.5% SDS, and 200 µg/ml proteinase K (BIOGENE)) and incubated for 2 hours at 55°C. Genomic DNA was purified by phenol/chloroform and precipitated with ethanol following standard protocols, and then suspended in 100 µl. Amplifications were carried out in a 10 µl volume using the standard 10x Buffer and Taq from QIAGEN Polymerase kit (Pearcy *et al.*, 2004a). Amplified fluorescent fragments were visualized using an automated ABI Prism 310 sequencer.

Data analysis

1. Allele segregation and mode of parthenogenesis

From the 35 nests sampled, 10 produced gynes and the number of gynes per colony was usually small (1 to 17, $n= 56$ in total). To assess allele segregation under thelytokous parthenogenesis, we determined for each locus the proportion of homozygous gynes produced by heterozygous mothers, R . Thus, R corresponds to the generational rate of transition to homozygosity and quantifies how parthenogenesis increases the inbreeding coefficient. Under parthenogenesis with terminal or central fusion, R is expected to vary among loci according to their position relative to the centromere (table 1).

We compared R values with theoretical expectations (r) for five different modes of thelytokous parthenogenesis (as a convention, we use lower case letters to denote parameters and capital letters for corresponding estimators): apomixis ($r= 0$), automixis with gamete duplication ($r= 1$), terminal fusion ($r= 1/3$ to 1), fusion of two products of the first meiotic division, here referred as random fusion ($r= 1/3$), and central fusion ($r= 0$ to $1/3$). Chi-square tests were used to determine which mode of parthenogenesis was consistent with the observed rate of transition to homozygosity for each locus. When r is comprised within a range of values, the value closest to the observed R was used for the test. For the two exclusive modes of parthenogenesis where no or all offspring are expected to be homozygous (*i.e.*, apomixis or automixis with gamete duplication, respectively), P -values were considered equal to 0 when at least one individual was not consistent with these expectations for a given locus.

2. Inbreeding coefficient

Twelve to 30 workers ($\bar{x} \pm \text{SD} = 15.3 \pm 5.8$; $n= 535$) and the queen ($n= 33$; 2 queens died before genetic analyses) were typed from each nest. The individual inbreeding (the probability that two alleles within individuals are identical by descent) was estimated for workers (F_w) and for queens (F_q) by the program SPAGeDi (Hardy and Vekemans, 2002) using J. Nason's estimator (Loiselle *et al.*, 1995).

3. Proportion of colonies headed by a worker-produced queen

The proportion of colonies headed by a replacement queen produced by the workers was estimated from a model predicting the inbreeding of queens (f_q) from the generational rate of transition to homozygosity (r) and the proportion of worker-produced queens (w). The model assumes that queens are produced by automictic parthenogenesis with central fusion, and that

workers are produced sexually and are not inbred. These assumptions hold for *C. cursor* (see results).

At a given locus, the probability of identity-by-descent for the two alleles of a parthenogenetically-produced queen equals 1 if her mother carried alleles already identical by descent, and r otherwise. Hence, the inbreeding of a queen at the next generation (f_q') can be expressed according to the inbreeding of its parents (f):

$$f_q' = f + (1 - f)r$$

Considering that the mother can be a worker ($f = 0$) with probability w , or a queen ($f = f_q$) with probability $1 - w$, the average inbreeding of daughter queens is:

$$f_q' = (1-w).(f_q + (1 - f_q) r) + w.r$$

At equilibrium, when the average inbreeding of queens does not change between generations, $f_q' = f_q$, so that

$$f_q = \frac{r}{r + w(1 - r)} \quad (1)$$

Thus, the equilibrium inbreeding of queens ranges between r (all produced by workers) and 1 (all produced by queens). By inverting equation (1) and replacing parameters by their respective locus specific estimators, one can get an estimator of the proportion of worker-produced queens (W):

$$W = \frac{(1 - F_q)R}{(1 - R)F_q} \quad (2)$$

Since the mode of parthenogenesis is assumed to be automixis with central fusion, we restricted the range of R values between 0 and 1/3 (estimates above 1/3 were reduced to 1/3). Previous study (Pearcy *et al.* 2004b) showed that the proportion of queens arising from sexual reproduction is very low (about 4%). Consequently, sexually-produced queens were not considered in the model.

Results

Mode of parthenogenesis

The proportion of homozygous gynes produced by heterozygous mothers (R) ranged between 0.06 and 0.44, depending on the locus (table 2). These values were significantly different for at least 2 loci from those expected under apomixis, automixis with terminal fusion, gamete duplication, or random fusion. By contrast, none were different from the values expected under automictic parthenogenesis with central fusion, showing that this cytological mechanism is involved in the production of thelytokous daughters by queens of *Cataglyphis cursor*.

Inbreeding and proportion of worker-produced queens

The inbreeding coefficient at each locus was not significantly different from 0 for workers. By contrast, it ranged from 0.02 to 0.42 for queens and was significant for three of the four loci analyzed (table 3).

Applying equation (2), our data show that more than 60% of the colonies in the study population were headed by a worker-produced queen. Locus-specific estimates of W varied from 0.63 to 0.87 for the three loci Ccur-46, Ccur-58 and Ccur-63b (table 3). Locus Ccur-11 gives $W > 1$ because $R > F_q$. The low rate of transition to homozygosity (R) at Ccur-11 suggests that this locus is close to the centromere, making this locus not very informative concerning the impact of parthenogenesis on inbreeding. The fact that our estimates of W for Ccur-11 is out of the expected range stems from the high variance associated with the low value of R (table 2).

Discussion

Our results show that the cytological mechanism responsible for thelytokous parthenogenesis in queens of the ant *C. cursor* is automictic parthenogenesis with central fusion. Whether the same mechanism underlies the parthenogenetic production of females by workers remains to be verified, but the hypothesis that parthenogenesis evolved once in this species seems more parsimonious. Automictic parthenogenesis with central fusion is also involved in the production of females by unmated workers in the cape honeybee *Apis mellifera capensis* (Verma and Ruttner, 1983). Interestingly, Baudry *et al.* (2004) reported an average reduction of heterozygosity per generation and per individual (R) of about 0.19, a value well in the range of 0.06 - 0.33 (mean: 0.21) found in this study. By contrast with *C. cursor*, Schilder *et al.* (1999) reported that reproduction in parthenogenetic populations of the ant *Platythyrea punctata* is apomictic. This suggests that different modes of thelytokous parthenogenesis evolved independently in different lineages of the Formicidae.

Automictic parthenogenesis results in an increased level of homozygosity, which may cause inbreeding depression. The main mechanism responsible for inbreeding depression depends on the genetic load of recessive deleterious alleles (*partial dominance hypothesis*; Charlesworth and Charlesworth 1999; Roff 2002). Anything that would reduce the genetic load would therefore also reduce inbreeding depression, which results in two predictions. First, prolonged inbreeding should lead to purging of the genetic load due to increased exposure of deleterious mutations in homozygotes (Lande and Schemske 1985; Charlesworth and Charlesworth 1987; Waller 1993). Second, in species with haploid-male sex determinism such as Hymenoptera, deleterious mutations are regularly exposed to selection in males. Selection therefore acts as a powerful purge for deleterious alleles, which explains why Hymenoptera should be less prone to inbreeding depression (Smith and Shaw, 1980; Saito *et al.*, 2000; Brückner, 1978; Crozier, 1985; Werren, 1993). Both hypotheses suggest that the genetic load associated with inbreeding should be reduced in the ant *Cataglyphis cursor*, where queens are produced parthenogenetically and show a high level of homozygosity. Moreover, it has been suggested that queens of *C. cursor* are less subject to inbreeding depression than most ant species because they found new colonies by budding. The absence of mating flight and the ability to start a new colony with the help of adult workers should indeed lower selective pressure on queens (Pearcy *et al.*, 2004b). Another possible genetic consequence of increased homozygosity due to automictic parthenogenesis is the production of diploid males. Diploid males develop from eggs that are homozygous at the sex-determining locus (or loci) and are

functionally sterile, so that their production generates a genetic load to the colony (Crozier, 1977; Cook, 1993). However, adult diploid males have not been found in a large subsample of *C. cursor* males (Pearcy *et al.*, in prep).

In *C. cursor*, two non-mutually exclusive processes may counteract genetic homogenization induced by automictic parthenogenesis. First, previous studies showed that 3.6% of gynes are produced by sexual reproduction (Pearcy *et al.*, 2004b). This proportion seems however too small to account on its own for the level of heterozygosity (range: 0.57-0.94) observed in queens. Second, workers can produce gynes in the absence of the mother queen (Cagniant, 1979). Because workers arise from sexual reproduction, their contribution to the next generation should decrease the level of inbreeding. Consistently, our results indicate that inbreeding coefficient for workers does not differ from zero.

Our genetic analyses also show that more than 60% of the colonies are headed by queens produced by workers in the study population. Our estimate of worker-produced queens may have been slightly overestimated, because females arising from sexual reproduction of mother queens are genetically similar to (and are therefore counted as) those arising from worker reproduction. However, as mentioned above, females arising from sexual reproduction of mother queens are rare (Pearcy *et al.* 2004b) and can not substantially bias our estimates.

The high proportion of colonies headed by worker-produced queens found in this study strongly suggests that queen replacement is a common phenomenon in the ant *C. cursor*. In spring, freshly inseminated queens of this species may either leave the nest with a group of workers (colony budding) or stay in the nest and replace the mother queen (queen replacement). Both options result in the same colony genetic architecture. However, production of eggs developing into sexuals is restricted to a short period of time in early spring, and adult sexuals emerge within 40 days (Cagniant, 1979). Therefore, replacement of a mother queen by one of her own thelytokous daughters may occur only if she dies in the meantime, making colony budding a more likely explanation for worker-produced queens in early spring. Conversely, if the mother queen dies outside of the period of sexual production, workers will start to produce sexual offspring from the next spring leading to queen replacement. Variations over time in colony kin structure due to the replacement of old queen(s) by newly inseminated ones (*i.e.*, queen turnover) has been documented in several ant species (e.g., Evans, 1996; Goodisman and Ross, 1999; André *et al.*, 2001; reviewed in Heinze and Keller, 2000). However, queen turnover in thelytokous ant species has received little attention. To our

knowledge, our study allows a first estimation of the rate of queen replacement by worker-produced queens in a natural population of a thelytokous ant.

In *C. cursor*, thelytokous parthenogenesis might have been selected for to face high queen mortality and replace the queen when she passes away (Lenoir and Cagniant, 1986). Keller and Genoud (1997) emphasized the close association between queen lifespan and (i) the colony kin structure and (ii) the mode of colony foundation in ants. They showed that the lifespan of queens is greater in monogynous than in polygynous species, and greater in independent than in dependent founding species. In most ants, monogyny is associated with independent colony founding, whereas polygyny is associated with dependent colony founding. Colonies of *C. cursor* do not fit with this general pattern: they are monogynous and foundation proceeds by budding. There is thus no prediction for queen lifespan in this species. Queen life expectancy remains unknown in the genus *Cataglyphis*, both under natural and laboratory conditions. As for workers, lifespan has been reported in a few species to be extremely low. For instance, foragers of *C. bicolor* reportedly live on average 6.1 days (Schmid-Hempel and Schmid-Hempel, 1984). Such a short life expectancy of worker foragers also occurs in *C. cursor* (Lenoir, pers. com.). Since workers of *C. cursor* reproduce in queenless colonies only (Cagniant, 1980), the high proportion of colonies headed by a worker-produced queen found here suggests that the lifespan of queens should be relatively short in this species. In their study, Keller and Genoud (1997) also did not consider ant species where workers can produce females parthenogenetically, allowing queen replacement by workers. Whether this ability is associated with a short queen life expectancy remains unknown.

Acknowledgements

We thank E. Baudry, M. Chapuisat, C. Doums and two anonymous referees for their useful suggestions and comments on the manuscript. Thanks also to L. Brazier, S. Chameron, L. de Menten, C. Tirard, P. Van den Hove and B. Viginier for taking part to sample collection, and D. Fournier, B. Viginier, M. Richard for their assistance while genotyping. This work was supported by grants from the Belgian Fond National de la Recherche Scientifique - F.N.R.S. (SA and OH) and the Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture - F.R.I.A. (MP).

References

- Agosti D (1990). Review and reclassification of *Cataglyphis* (Hymenoptera Formicidae). *J Nat Hist* **24**: 1457-1505.
- André JB, Peeters C, Doums C (2001). Serial polygyny and colony genetic structure in the monogynous queenless ant *Diacamma cyaneiventre*. *Behav Ecol Sociobiol* **50**: 72-80.
- Baudry E, Kryger P, Allsopp MH, Koeniger N, Vautrin D, Mougél F *et al* (2004). Whole-genome scan in thelytokous laying workers of the Cape honeybee (*Apis mellifera capensis*): central fusion, reduced recombination rates, and centromere mapping using half-tetrad analysis. *Genetics* **167**: 243-252.
- Brückner D (1978). Why are there inbreeding effects in haplo-diploid systems? *Evolution* **32**: 456-458.
- Cagniant H (1973). Apparition d'ouvrières a partir d'œufs pondus par des ouvrières chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonscolombe (Hymenopteres : Formicidae). *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D, Sciences naturelles* **277**: 2197-2198.
- Cagniant H (1976). Distribution, écologie et nid de la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonscolombe. *Vie Milieu*, **26**: 265-276.
- Cagniant H (1979). La parthénogénèse thélytoque et arrhénotoque chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonsc. (Hym. Form.). Cycle biologique en élevage des colonies avec reine et des colonies sans reine. *Insectes Soc* **26**: 51-60.
- Cagniant H (1980). Étude des stades larvaires de la lignée des ailes et de la lignée des ouvrières dans des colonies avec reine et des colonies sans reine chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonsc. *Bull Soc Hist Nat Toulouse* **116**: 192-206.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1999). The genetic basis of inbreeding depression. *Genet Res* **74**: 329-340
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu Rev Ecol Syst* **18**: 237-268.

- Cook JM (1993). Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity* **71**: 421-435.
- Crozier RH (1977). Evolutionary genetics of the Hymenoptera. *Annu Rev Entomol* **22**: 263-288.
- Crozier RH (1985). Adaptive consequences of male-haploidy. ch. 1.3.4: 201-222. In: Helle W, Sabelis MW (eds) *Spider mites. Their biology, natural enemies and control. Vol. 1A*. Elsevier.
- Evans JD (1996). Queen longevity, queen adoption and posthumous indirect fitness in the facultatively polygynous ant *Myrmica tahoensis*. *Behav Ecol Sociobiol* **39**: 275-284.
- Fournier D, Estoup A, Orivel J, Foucaud J, Jourdan H, Le Breton J, Keller L (2005). Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. *Nature* **435**: 1230-1234.
- Goodisman MAD, Ross KG (1999). Queen recruitment in a multiple-queen population of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behav Ecol* **10**(4): 428-435.
- Grasso DAT, Wenseleers T, Mori A, Le Moli F, Billen J (2000). Thelytokous worker reproduction and lack of *Wolbachia* infection in the harvesting ant *Messor capitatus*. *Ethol Ecol Evol* **12**: 309-314.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002). SPAGEDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* **2**: 618–620.
- Heinze JB, Hölldobler B (1995). Thelytokous parthenogenesis and dominance hierarchies in the ponerine ant *Plathytyrea punctata*. *Naturwissenschaften* **82**: 40-41.
- Heinze J, Keller L (2000). Alternative reproductive strategies, a queen perspective in ants. *Trends Ecol Evol* **15**(12): 508-512.
- Itow T, Kobayashi K, Kubota M, Ogata K, Imai HT, Crozier RH (1984). The reproductive cycle of the queenless ant *Pristomyrmex pungens*. *Insectes Soc* **31**: 87-102.
- Keller L, Genoud M (1997). Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. *Nature* **389**: 958-960.

- Lande R, Schemske DW (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* **39**: 24-40.
- Lattorff HMG, Moritz RFA, Fuchs S (2005). A single locus determines thelytokous parthenogenesis of laying honeybee workers (*Apis mellifera capensis*). *Heredity*, **94**: 533-537.
- Lenoir A, Cagniant H (1986). Role of worker thelytoky in colonies of the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera: Formicidae). *Entomologia generalis* **11**: 153-157.
- Lenoir A, Quérard L, Pondicq N, Berton F (1988). Reproduction and dispersal of the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera Formicidae). *Psyche* **95**: 21-44.
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995). Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am J Bot* **82**:1420–1425.
- Pearcy M, Clémencet J, Chameron S, Aron S, Doums C (2004a). Characterization of nuclear DNA microsatellite markers in the ant *Cataglyphis cursor*. *Mol. Ecol. Notes* **4**: 642-644.
- Pearcy M, Aron S, Doums C, Keller L (2004). Conditional use of sex and parthenogenesis for worker and queen production in ants. *Science*, **306**: 1780-1783.
- Roff DA (2002). Inbreeding depression: tests of the overdominance and partial dominance hypotheses. *Evolution* **56**(4):768-775.
- Saito Y, Sahari K, Mori K (2000). Inbreeding depression by recessive deleterious genes affecting female fecundity of a haplodiploid mite. *J Evol Biol* **13**(4): 668-678.
- Schilder K, Heinze J, Gross R, Hölldobler B (1999). Microsatellites reveal clonal structure of populations of the thelytokous ant *Platythyrea punctata* (F. Smith) (Hymenoptera; Formicidae). *Mol Ecol* **8**: 1497-1507.
- Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R (1984). Life duration and turnover of foragers in the ant *Cataglyphis bicolor* (Hymenoptera, Formicidae). *Insect Soc* **31**:345-360.
- Slobodchikoff CN, Daly HV (1971). Systematic and evolutionary implications of parthenogenesis in the Hymenoptera. *Am Zool* **11**: 273-282.

Smith RH, Shaw MR (1980). Haplodiploid sex ratios and the mutation rate. *Nature* **287**: 728-729.

Suomalainen E, Saura A, Lokki J (1987). *Cytology and evolution in parthenogenesis*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Tsuji K, Yamauchi K (1995). Production of females by parthenogenesis in the ant *Cerapachys biroi*. *Insect Soc* **42**: 333-336.

Verma S, Ruttner F (1983). Cytological analysis of thelytokous parthenogenesis in the Cape honeybee (*Apis mellifera capensis* Escholtz). *Apidologie* **14**:47-58.

Waller DM (1993). The statics and dynamics of mating system evolution. In: Thornhill NW (eds) *The natural history of inbreeding and outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives*. Univ. Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.

Werren JH (1993). The evolution of inbreeding in haplodiploid organisms. In: Thornhill NW (eds), *The natural history of inbreeding and outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives*. Univ. Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.

White M (1984). Chromosomal mechanisms in animal reproduction. *Bull Zool* **51**: 1-23.

Figure 1.

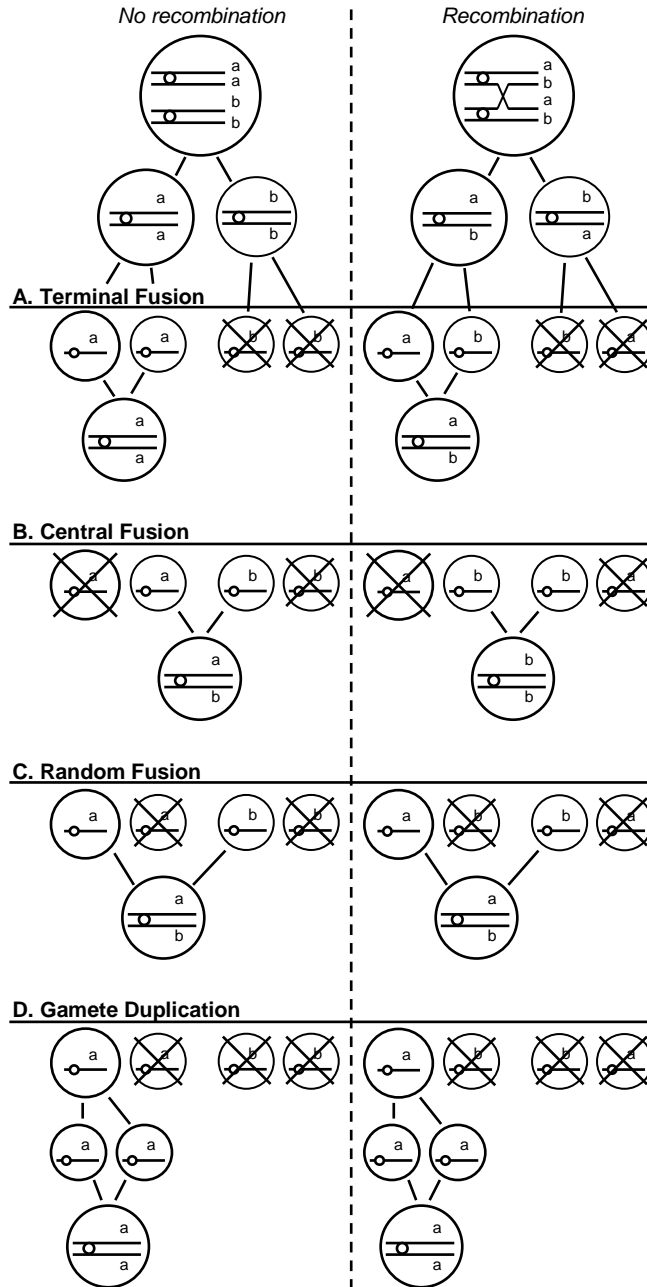


Table 1. Range of the expected rates of transition to homozygosity of an heterozygous locus (r) for different modes of parthenogenesis according to the distance to the centromere.

Mode of parthenogenesis	Locus position	
	close to centromere (no recombination)	far from centromere (many crossing-over)
Terminal Fusion	1.00	0.33
Central Fusion	0.00	0.33
Random Fusion	0.33	0.33
Gamete Duplication	1.00	1.00
Apomictic	0.00	0.00

Table 2. Observed rates of transition to homozygosity during parthenogenesis and consistency with different modes of parthenogenesis.

Nt : number of offspring from heterozygous mother; No : number of transitions to homozygosity; R : observed rate of transition to homozygosity; r : expected rate (or range of rates) of transition to homozygosity (see table 1).

Chi-square tests of consistency of R values with r : *ns*: not significant, ***: highly significant ($P < 0.001$). When r is a range, the test was performed considering the r closest to R within the range.

Locus	Nt	No	R (95% CI)	Automyxy				Apomyxy			
				Gamete		Terminal		Central		Random	
				Duplication	Fusion	Fusion	Fusion	Fusion	Fusion	Fusion	Fusion
Ccur-11	53	3	0.06 (0.02 - 0.15)	***	***	***	<i>ns</i>	***	***		
Ccur-46	46	20	0.44 (0.29 - 0.60)	***	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	***		
Ccur-58	47	16	0.34 (0.21 - 0.50)	***	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	***		
Ccur-63b	41	7	0.17 (0.08 - 0.34)	***	***	<i>ns</i>	<i>ns</i>	***	***		

Table 3. Observed inbreeding coefficients in workers ($n= 514$) and queens ($n= 33$), and estimation of the rate of worker-produced queens.

F_w : inbreeding of workers. F_q : inbreeding of queens. R : estimated rate of transition to homozygosity during parthenogenesis (bounded between 0 and 1/3 in accordance with theoretical expectations for automictic parthenogenesis with central fusion). W : estimated rate of worker-produced queens from F_q and R when applying eq. (2). * inbreeding significantly > 0 . $W > 1$ means that an estimate above one has been obtained.

Locus	F_w	F_q	R	W
Ccur-11	0.01	0.02	0.06	>1
Ccur-46	-0.02	0.37*	0.33	0.87
Ccur-58	0.03	0.42*	0.33	0.70
Ccur-63b	0.02	0.25*	0.17	0.63

Titles and legends to figures

Figure 1. *Different cytological mechanisms during meiosis leading to automictic parthenogenesis and their impact on inbreeding at a locus when a crossing-over between the locus and the centromere occurs or not. Modified from Suomalainen et al. (1987).*

Circles represent nuclei. Horizontal lines represent chromatids, with small circles showing the location of the centromere and letters representing alleles at a given locus. The parent is heterozygous (ab) and parthenogenesis causes inbreeding when its progeny becomes homozygote (aa or bb).

Article 4.

Accouplements multiples chez la fourmi *Cataglyphis cursor*: Test des hypothèses de la limitation spermatique et du fardeau en mâles diploïdes

Bien que les reines de la fourmi *C. cursor* soient capables de produire une descendance diploïde par parthénogenèse thélytoque, elles ont conservé la reproduction sexuée pour la production d'ouvrières et s'accouplent avec plusieurs mâles. Ceci suggère fortement que la reproduction sexuée est avantageuse pour le fonctionnement de la colonie. Différentes hypothèses ont été avancées pour justifier l'évolution et le maintien de la polyandrie chez les insectes sociaux. Dans cet article, nous testons les hypothèses de la "limitation spermatique" et du "fardeau en mâles diploïdes" chez *C. cursor*. Nos résultats indiquent que les reines de cette espèce s'accouplent avec 4 à 8 mâles, les pères contribuant de manière équivalente à la production du couvain dans 75% des colonies. Il n'y a pas d'association significative entre le nombre d'accouplements et la taille de la colonie, et les mâles possèdent, en moyenne, suffisamment de sperme pour satisfaire les besoins d'une reine. L'analyse du niveau de ploïdie de 179 mâles indique qu'ils étaient tous haploïdes. Ces résultats ne supportent ni l'hypothèse de la "limitation spermatique", ni celle du "fardeau en mâles diploïdes" pour justifier l'évolution de la polyandrie chez cette espèce. L'absence de biais de paternité dans la plupart des colonies représente aussi un argument important contre l'hypothèse de la "limitation spermatique", et le comportement des nouvelles reines lors de l'accouplement suggère qu'elles recherchent activement de nouveaux partenaires sexuels et que la polyandrie n'est pas une simple conséquence de la coercition sexuelle des mâles. Au contraire, nous suggérons que *C. cursor* pourrait bénéficier d'une augmentation de la résistance aux pathogènes et parasites résultant de la diversité génétique et/ou permettre aux reines de réduire le conflit opposant reines et ouvrières concernant l'origine des mâles.

Pearcy M., Allard D., Timmermans I. & Aron S. (in prep). Multiple mating in the ant *Cataglyphis cursor*: testing the sperm limitation and the diploid load hypotheses.

**Multiple mating in the ant *Cataglyphis cursor*:
testing the sperm limitation and the diploid load hypotheses**

Morgan Pearcy¹, Diane Allard², Iris Timmermans¹ & Serge Aron¹

¹ Behavioral and Evolutionary Ecology - CP 160/12

Université Libre de Bruxelles (U.L.B.)

Avenue FD Roosevelt, 50

B-1050 Brussels

Belgium

² Laboratory for Entomology

Katholieke Universiteit Leuven (K.U.L.)

Naamsestraat, 59

B-3000 Leuven

Belgium

Contact:

Morgan Pearcy, corresponding author

Phone : +32 2 650 22 67

Fax : +32 2 650 24 45

E-mail : mpearcy@ulb.ac.be

Abstract

Multiple mating by queens in insect societies (polyandry) is detrimental to kin selection since it lowers within-colony relatedness and, hence, social cohesion. Several hypotheses have been put forward to explain the evolution and maintenance of polyandry. In this paper, we tested the "sperm limitation" and the "diploid load" hypotheses in the polyandrous ant *C. cursor*. Our results reveal that queens of this species mate up to 8 times, with fathers contributing equally to the brood in 75% of the colonies. Overall, there was no association between the mating frequency and the colony size, and males carry, on average, enough sperm in their seminal vesicles to fill one queens' spermatheca. Analyses of the nuclear DNA-content of 179 males revealed that all were haploid. These results support neither the "sperm limitation" hypothesis nor the "diploid load" to account for the queen mating frequency reported in this ant. The absence of paternity skew in most colonies also represents a strong argument against the "sperm competition" hypothesis, and the mating behaviour of new queens suggests that they actively seek to mate multiply and that polyandry is not a mere consequence of male sexual coercion. On the contrary, we suggest that *C. cursor* might benefit from increased resistance to parasites and pathogens due to colony genetic variability and/or allow queens to reduce the queen-worker conflict over sexual parentage.

Introduction

In social insects, workers give up most or all of their own reproduction to help relatives in their colonies reproduce. Hamilton's (1964a,b) kin selection and inclusive fitness theories provided the evolutionary background to explain the evolution and maintenance of such a reproductive altruism. Workers may benefit helping relatives reproduce as long as the relatives they aid share a higher than average proportion of their genes with the workers and effectively pass on copies of the workers' genes to the next generation. Relatedness between colony members is therefore pivotal in kin selection theory, because it directly influences the benefits from indirect fitness. In social Hymenoptera, within-colony relatedness is usually high, because of the haplodiploid sex determinism system (Crozier, 1971). In colonies headed by a single, once-mated queen, workers are more closely related to their sisters ($r = 0.75$) than to their own male and female offspring ($r = 0.5$).

However, two primary factors are known to alter the colony kin structure and, hence, within-colony relatedness: the number and relatedness of reproducing queens in a nest, and the number and relative contribution of males to colony offspring (Bourke & Franks, 1995, Crozier & Pamilo, 1996). Multiple queen colonies (polygyny) have been reported in many ant species. Under polygyny, within-colony relatedness is directly affected by the relatedness among queens and it may approach zero when queens are unrelated (Queller, 1993). Multiple mating by queens (polyandry) also lowers relatedness but not as dramatically as polygyny, because workers offspring still remain half sisters and their relatedness never drops below 0.25.

Multiple mating is detrimental to kin selection, since it reduces workers' benefits from inclusive fitness. In ants, most species are strictly monoandrous or, at best, occasionally polyandrous, with an effective queen mating frequency ($M_{e,p}$) lower than 2 (Boomsma & Ratnieks, 1996; Strassmann, 2001; Crozier & Fjerdingstad, 2001). Exceptions to effective monoandry are scarce, though sometimes remarkable; polyandry levels exceeding 2 have been reported in the genus *Atta* ($M_{e,p} = 3.1$, Murakami *et al.*, 2000), *Acromyrmex* ($M_{e,p} = 3.9$, Boomsma *et al.*, 1999), *Pogonomyrmex* ($M_{e,p} = 6.8$, Cole & Wiernasz, 2000), *Dorylus* ($M_{e,p} = 17.5$, Kronauer *et al.*, 2004) and *Eciton* ($M_{e,p} = 33.4$, Denny *et al.*, 2004).

Two sets of hypotheses have been put forward to explain multiple mating in social insects. The first is based on the fact that multiple mating often leads to multiple paternity of the queen's offspring and thus to increased genetic diversity within her colony. Increased genetic diversity has been hypothesized to enhance colony fitness by increasing disease resistance or worker task efficiency, or by lowering the load of sterile diploid males (which

result when a paternal male shares a sex locus allele with the queen) (Page, 1980; Crozier & Page, 1985; Sherman *et al.*, 1988; Pamilo *et al.*, 1994; Page *et al.*, 1995; Baer & Schmid-Hempel, 1999). In addition, multiple paternity makes the genetic value of male and female reproductives more equal for the workers (as it is for the queen). This reduces worker-queen fitness conflict over the sex ratio (Trivers & Hare, 1976; Moritz, 1985), and may enhance the fitness of the queen (Ratnieks and Boomsma, 1995; Sundström & Ratnieks, 1998). So far, several empirical tests of the hypothesis have shown that genetic variability efficiently increases polyethism (Robinson & Page, 1988; Snyder, 1992, 1993; Page *et al.* 1995; Gordon 1996; Julian & Cahan, 1999) and resistance to pathogens (Hugues & Boomsma, 2004, 2005), and one study emphasized the role of improved parasite resistance due to polyandry on colony fitness (Baer & Schmidt-Hempel, 1999, 2001).

The second hypothesis is connected to the fact that queens only mate on a single nuptial flight (Bourke & Franks, 1995). The number of sperm stored during the mating flight thus places an upper limit on a queen's maximum lifetime output of fertilised eggs (*e.g.* Tschinkel, 1987), and may constrain the size of her worker force and, eventually, the number of reproductive offspring produced. It was therefore hypothesised that ant queens mate with several males in order to obtain larger sperm stores (Hamilton, 1964; Cole, 1983). The hypothesis was criticized by Crozier and Page (1985) who argued that males should be selected to have enough sperm to satisfy the sperm requirements of a queen. However, this criticism can not *a priori* invalidate the "sperm limitation" hypothesis, since male sperm content might be constrained by selection on other components of male fitness (such as flight ability; Fjerdingstad & Boomsma, 1997), and since males may parcel out their sperm between different queens (Boomsma, 1996; Reichardt & Wheeler, 1996; Boomsma & Sundström, 1998).

A previous study of the thelytokous ant *Cataglyphis cursor* showed that colonies are headed by multiply-mated queens (Pearcy *et al.*, 2004b). In this species, workers arise from fertilized eggs, while sexuals are parthenogenetically produced. Thus, polyandry alters the genetic composition of the worker force but has no effect on reproductives. Parthenogenesis is automictic with central fusion of the polar nuclei (Pearcy *et al.*, in press), what increases homozygosity of reproductive daughters. This can lead to the production of diploid males and therefore represent a load for the colony. Here, we investigated the "sperm limitation" and the "diploid load" hypotheses as possible evolutionary causes responsible for the evolution of polyandry in this species.

Material and methods

Field collection and sampling

Fifty-seven nests of *Cataglyphis cursor* were excavated in the end of April/early May in 2001, 2002 and 2003 at St-Hyppolite (southern France; 42.82° North, 2.99° East), before the emergence of the first sexuals. Colonies whose entrance were located too close from each other were not collected so as to prevent mixing individuals from different nests. All adults (queens and workers) as well as brood at various stages (eggs, larvae and sexual pupae) were collected and brought into the laboratory. The number of workers per colony was counted (mean colony size \pm SD= 752.4 \pm 602.4; range: 78 - 2658; Percy & Aron, submitted). Colonies were maintained under laboratory conditions (26 \pm 2°C and 12h:12h L:D) and fed on cockroaches, sugar water and grape. They were censused twice a week and all sexuals emerging from the pupae were collected; males were kept apart with a subsample of workers for subsequent sperm and ploidy analyses (see below), whereas young sexual females were deep-frozen for other purposes.

DNA extraction and microsatellite analysis

To estimate the number of mating by queens, 12 colonies comprising the queen and her nestmate workers were reared under laboratory conditions. All the brood was carefully removed from the nests immediately after collection. Callow workers were sampled 4 months after harvest for subsequent mother-offspring genetic analyses. Since development from the egg to the adult stage lasts up to 40 days, all callow workers originated from eggs laid by the colony queen in the laboratory. A sample of 437 callow workers (mean \pm SD= 36.4 \pm 9.4) were genotyped at four polymorphic microsatellite loci (*Ccur11*, *Ccur46*, *Ccur58* and *Ccur63b*; Percy *et al.*, 2004a). Individual ant DNA was extracted by homogenization in a digestive solution (100mM NaCl, 50mM Tris, 1mM EDTA, 0.5% SDS, and 200 μ g/ml proteinase K (BIOGENE)) and incubated for 2 hours at 55°C. Genomic DNA was purified by phenol/chloroform and precipitated with ethanol following standard protocols (Sambrock *et al.*, 1989), and then suspended in 100 μ l. Amplifications were carried out in a 10 μ l volume using the standard 10x Buffer and Taq from QIAGEN Polymerase kit (Percy *et al.*, 2004a). Amplified fluorescent fragments were visualized using an automated ABI Prism 3100 sequencer.

Queen mating frequency and paternity skew

The absolute number of mating per queen (M_p) was determined from pedigree analyses from mother-offspring combinations. The effective number of mating per queen ($M_{e,p}$) was estimated following Nielsen *et al.* (2003; equ. 16),

$$M_{e,p} = \frac{(n-1)^2}{\sum_{i=1}^k p_i^2 (n+1)(n-2)+3-n}$$

where n is the sample size and p_i is the proportional contribution to the brood of the i th mate.

Because two males may share the same alleles at the 4 loci studied, we estimated this non-detection error for each colony by calculating the probability that two mates bear the same alleles as (Boomsma and Ratnieks, 1996),

$$P_{non-detect} = \sum_j \prod_i f_{ij}$$

where f_{ij} is the frequency at the population level of the allele carried by the j th male at the i th locus. On the other hand, there is always a probability that an additional patriline was not sampled, but still present among the brood, because of the limited sample size. This non-sampling error was estimated using the formula (Foster *et al.* 1999),

$$P_{nonsampling} = (1-f)^n$$

where n is the number of offspring analyzed and f is the proportional representation of a father among the brood.

Skewness in paternity (the unequal contribution of each father in the brood) of a given colony was quantified according to Pamilo and Crozier (1996),

$$S = \frac{M_p - M_{e,p}}{M_p - 1}$$

where M_p is the total number of male mates and $M_{e,p}$ is the effective number of male mates, both estimated from the callow workers pedigree (see above). We determined, for each colony, the statistical significance of the male skew using a G -test for goodness-of-fit under the null hypothesis that all males contributed equally to progeny production.

Sperm count

Sperm was counted from $n= 11$ queen spermatheca and $n= 33$ male seminal vesicles. Males were dissected when they showed attempts to depart for nuptial flight, *i.e.* one or two weeks after their eclosion. Dissection of queens and males was handled in Ringer solution. Both spermatheca and seminal vesicles were emptied in a staining solution of DAPI fluorochrome

(4', 6-diamidino-2-phenylindole), and the number of sperm cells was counted by flow cytometry (Ploidy Analyser PAI, Partec; see Aron *et al.* 2003 for details).

Diploid males

To establish the existence of adult diploid males, we determined the ploidy level (haploid or diploid) of $n= 179$ males sampled from $N= 4$ colonies. Because diploid muscle cells are found in haploid Hymenopteran males (Aron *et al.*, 2005), heads only were used for ploidy analyses. DNA of cells nuclei was stained with DAPI fluorochrome, and the nuclear DNA-content of each male's cells was determined by flow cytometry.

Results

Queen mating frequency and paternity skew

The distribution of genotypes in parent-offspring combinations was consistent with queens being multiply mated. Over the 12 colonies sampled, we found that the queen was mated with 4 to 8 different males. The harmonic mean number (\pm SD) of fathers detected per colony was $M_p = 5.56 \pm 1.34$ and the effective number of mating per queen reached a value of $M_{e,p} = 4.63 \pm 1.35$. There was no association between the absolute mating frequency (M_p) and the colony size (Spearman rank correlation, $r_s = 0.29$, $n = 12$, $P = 0.35$). Both the population-wide non-detection error due to two males bearing the same alleles at all loci ($P_{non-detect} = 0.003 \pm 0.003$) and the non-sampling error due to limited sample size ($P_{non-sampling} = 0.038 \pm 0.049$) were very low. It is therefore unlikely that our data were affected by these potential sources of errors.

Pedigree analysis showed that the respective contribution of the male mates varied across colonies, with the majority male siring 0.25 to 0.5 of the offspring. The paternity skew over all colonies ranged from 0 to 0.55 and was on average $S = 0.18 \pm 0.17$. There was a significant deviation from equal father contribution in 3 colonies (G -test for goodness-of-fit with Bonferroni correction, $P = 0.003$, $P = 0.001$ and $P < 0.001$). In the 9 remaining colonies, however, there was no evidence for unequal contribution of fathers.

Sperm count

Sperm counts showed that, over the 11 *C. cursor* queens examined, the mean spermathecal sperm store was $n = 109.7 \pm 37.9 \times 10^3$ sperm cells, with large interindividual variations (range: 37.8 - 165.8 $\times 10^3$). Average sperm amount in queens' spermatheca was lower than sperm content of males' seminal vesicles. Males carried on average $n = 158.5 \pm 156.7 \times 10^3$ sperm cells, ranging from 48.8 to 800.6 $\times 10^3$ sperm cells.

Diploid males

The flow cytometry analyses revealed that none of the 179 males in our sample were diploid.

Discussion

Our data show that queens of *Cataglyphis cursor* are strictly polyandrous, mating with up to 8 males. Consistent with these results, field observations indicate that queens repeatedly leave the mother nest to mate with the surrounding males, then re-enter the nest (Lenoir *et al.*, 1988; pers. obs.). The fact that queens actively seek to mate several times strongly suggests that polyandry represents a valuable increase in their fitness. However, our data support neither the "sperm limitation" hypothesis, nor the "diploid load" hypothesis as the evolutionary causes for polyandry in this species. The quantity of sperm carried by males, though highly variable, seems sufficient to fill one queens' spermatheca, and colony size is not associated with mating frequency. Across ants, Boomsma & Ratnieks (1996) showed that the number of matings is associated with colony size when polygynous species are excluded from the analysis, as predicted by the "sperm-limitation" hypothesis (Cole, 1983). A previous study revealed that multiple mating allows queen of *Atta colombica* to effectively increase their sperm store, suggesting that polyandry could be an adaptive strategy to avoid sperm depletion in this species (Fjerdingstad & Boomsma, 1998). It should be noted that colonies of the leaf-cutter ant *Atta colombica* are huge (millions of workers) and queens are long-lived (10 to 16 years). Large colony size is also typical of other polyandrous species such as *Acromyrmex octospinosus* (over 1000 workers; Murakami *et al.*, 2000), *Pogonomyrmex occidentalis* (up to 8800 workers; Lavigne, 1969), *Dorylus molestus* (millions workers; Raignier & Van Boven, 1955) or *Eciton burchellii* (up to half a million workers; Franks, 1985). By contrast, in *C. cursor*, colonies are quite small, usually comprising hundreds of workers (range: 78 - 2658; $N=57$ colonies) and queens experience a short life expectancy (Pearcy *et al.*, in press). These results strongly suggest that, in this species, sperm amount is not a limiting factor for queen fitness and that multiple mating is not selected for to avoid sperm depletion. Additional data concerning the association between queen mating frequency and the amount of sperm stored will soon be available for *C. cursor* and should allow further testing the "sperm-limitation" hypothesis.

Our data also failed to detect diploid males in the study sample, indicating that diploid males are rare or even absent in *C. cursor*. Two proximal mechanisms may explain absence of adult diploid males. First, cytological mechanisms may prevent homozygosity at CSD loci, such as multiple-loci complementary sex determination (ml-CSD) (Crozier, 1971) or genomic imprinting (Beukeboom, 1995). In ml-CSD, only individuals homozygous at all sex loci develop as diploid males, so that diploid male load remains unlikely in an outbred species like

C. cursor. To date, ml-CSD has not been proven in a social Hymenoptera. Under genomic imprinting, one or more loci are differently imprinted on paternal versus maternal genes (Beukeboom, 1995). Genomic imprinting can not be tested without appropriated cytogenetic markers such as the parental-sex-ratio chromosome (PSR) in *Nasonia vitripennis* (Dobson & Tanouye, 1998; Beukeboom & Werren, 2000), which unfortunately are not available for any ant species. Second, the absence of diploid males may stem from workers selectively eliminating diploid males at the larval stage. To date, it is not possible to test this hypothesis since the tools allowing the discrimination between a female and a diploid male at larval stage are not available. Nevertheless, the complete absence of diploid males is direct evidence against the "diploid load" hypothesis in *C. cursor*. If diploid males were an important selective pressure justifying the evolution of polyandry, one would expect a significant proportion of diploid males among adults. The influence of the "diploid load" hypothesis is not straightforward; polyandry will be favoured when costs linked to diploid male production are low (*e.g.* when diploid males are eliminated almost immediately). Conversely, monoandry should be selected when these costs are high. The intensity of the selection for mono- or polyandry depends on diploid male frequency (Boomsma & Ratnieks, 1996; Crozier & Fjerdingstad, 2001). For instance, in *Formica* ants, monoandry may have been favoured in monogynous species, where costs of diploid male productions are high (Pamilo *et al.*, 1994). The influence of the diploid load has not been demonstrated in polyandrous ants yet. Mathematical models indicated that, in the honeybee *Apis mellifera*, low mating frequency would increase the risks of high mortality among the brood due to diploid males (Tarpy & Page, 2001). However, authors admitted that diploid load could hardly account for more than 10 mating, which often occurs in this species.

This work, together with the unusual life history of *C. cursor*, allows further consideration of the evolutionary causes of multiple mating in this species. If multiple mating by queens of *C. cursor* increased their fitness through post-copulatory sperm competition, one would expect a significant bias in males contribution to the brood, with the fittest male(s) fathering a larger fraction of workers (Simmons, 2001). We detected an unequal contribution of fathers in only 3 colonies over 12 (25%), strongly suggesting that sperm competition has no significant effect in most colonies. Few empirical evidences support the "polyandry for sperm competition" hypothesis in social insects. Differences in male's ability to fertilize eggs was demonstrated once in *Apis mellifera* (Harbo, 1990), but this result was not confirmed later on (Sasaki *et al.*, 1995; Haberl & Tautz, 1998; Frank *et al.*, 1999). According to the "mating by

convenience" hypothesis (Thornhill & Alcock, 1983), sexual coercion was also evoked as a cause of multiple mating. Again, little support for this hypothesis has been found in social Hymenoptera where a nuptial flight often prevents sexual coercion. However, a recent study indicates that queens of the polygynous ant *Plagiolepis pygmaea* may accept additional mates by convenience. In this species, where mating allegedly occurs within the nest (Trontti *et al.*, 2005), sex ratio is highly male-biased (over 95%; Aron, in prep) and each female is most probably attended simultaneously by multiple males, providing a strong incentive for convenience polyandry. The sexual coercion hypothesis is unlikely in *C. cursor*, where new queens leave the nest repeatedly to copulate with several males close to nest entrance (Lenoir *et al.*, 1988; pers. obs.). This indicates that multiple mating is an active strategy by queens and not a mere consequence of males' willingness to mate.

Genetic variability acquired through multiple mating has been assumed to enhance colony resistance to pathogens and parasites (Hamilton, 1987; Sherman *et al.* 1988). In ants, within-colony genetic diversity has been shown to effectively lower the parasite pressure in artificial groups of *Acromyrmex echinator* workers (Hugues & Boomsma, 2004, 2005). Artificial inseminations of the bumblebee *Bombus terrestris* demonstrated that high-diversity colonies had fewer parasites and showed greater reproductive success, on average, than did low-diversity colonies, strongly suggesting that parasite pressure may favour multiple mating by queens (Baer & Schmidt-Hempel, 1999). This hypothesis may prove especially relevant for a scavenger ant such as *C. cursor*, where workers are potentially exposed to pathogens developing on dead arthropods.

Queens might also exploit multiple mating to reduce the conflict that opposes them to the workers regarding the maternity of males (Ratnieks, 1988). In many ant species, workers are not completely sterile and are able to lay unfertilized (haploid) eggs that will develop into males (Bourke, 1988; Choe, 1988). In colonies headed by a single, once-mated queen, workers may promote their fitness by rearing their sons ($r= 0.5$) and nephews ($r= 0.375$) rather than queen's sons ($r= 0.25$). However, when workers are offspring of a queen mated to more than two males, workers are more related to their own sons, but less related to other workers' sons ($r < 0.25$) than to queen's sons. As a result, workers are expected to prevent each other from reproducing and to favour production of queen produced males (Woyciachowski & Lomnicki, 1987; Ratnieks, 1988). In the wasp *Dolichovespula saxonica*, queens are usually mated with 1 to 4 males. Consistent with the predictions of kin selection, workers selectively remove worker-laid eggs when the queen has mated with two or more males and rear worker's sons in

monoandrous colonies (Ratnieks, 1988). In *C. cursor*, polyandry lowers within-colony relatedness ($r= 0.42$; Pearcy *et al.* 2004b), and result in that workers, who are able to reproduce, are more related to their reproductive sisters and brothers ($r= 0.62$ and $r= 0.32$, respectively; Pearcy & Aron, submitted) than to the parthenogenetic daughters and sons of other workers ($r= 0.42$ and $r= 0.21$, respectively; estimated from within-colony relatedness). Multiple mating may therefore have been selected in queens of this species to force workers to rear their sibs instead of their own offspring.

On the other hand, two biological traits of *C. cursor* considerably reduce the costs of mating multiply. First, the absence of nuptial flight lowers the energetic costs and the risks of predation associated with multiple mating (Passera & Keller, 1990; Boomsma & Ratnieks, 1996). Second, in this species, reproductives of both sexes are produced asexually, and the reduced within-colony relatedness due to multiple patriline among workers does not affect relatedness between workers and sexuals (Pearcy *et al.*, 2004b).

In conclusion, multiple mating in *C. cursor* was probably not selected for to increase the sperm stores of queens, or to avoid diploid males production. We did not detect the presumed effects of a post-copulatory sperm competition, and the observations of female mating behaviour are direct evidences against the "mating by convenience" hypothesis. In the light of our results and natural history traits of this species, future researches should focus on tests of the "genetic diversity" and the "conflict" hypotheses as relevant explanations to account for the evolution of polyandry in this ant.

Acknowledgments

We thank L. Passera for fruitful discussions and comments on the manuscript and C. Hoyois for her contribution to DNA extractions. This work was supported by a Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (F.R.I.A.) doctoral grant (MP, IT) and grants from the belgian Fond National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S.) (SA).

References

- Aron S, de Menten L & Van Bockstaele DR (2003). Brood sex ratio determination by flow cytometry in ants. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 471-475.
- Aron S, De Menten L, Roisin Y, Van Bockstaele DR & Blank SM (2005) When hymenopteran males reinvented diploidy. *Current Biology*, **15**, 824-827.
- Baer B & Schmid-Hempel P (1999) Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. *Nature*, **397**, 151-154.
- Baer B & Schmid-Hempel P (2001). Unexpected consequences of polyandry for parasitism and fitness in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Evolution* 55:1639-1643.
- Beukeboom LW (1995) Sex determination in Hymenoptera - a need for genetic and molecular studies. *Bioessays*, **17**, 813-817.
- Beukeboom LW & Werren JH (2000) The Paternal Sex Ratio (PSR) chromosome in natural populations of *Nasonia* (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal Evolutionary Biology*, **13**, 967-975.
- Boomsma JJ (1996) Split sex ratios and queen-male conflict over sperm allocation. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **263**, 697-704.
- Boomsma JJ, Fjerdingstad EJ & Frydenberg J (1999) Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leafcutter ants. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **266**, 249-254.
- Boomsma JJ, Ratnieks FLW (1996) Paternity in eusocial Hymenoptera. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, **351**, 947-975.
- Boomsma JJ & Sundström L (1998) Patterns of paternity skew in *Formica* ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **42**, 85-92.
- Bourke AFG & Franks NR (1995) *Social Evolution in Ants*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

- Bourke AFG (1988) Worker reproduction in the higher eusocial Hymenoptera. *Q Rev Biol*, **63**, 291-311.
- Choe JC (1988) Worker reproduction and social evolution in ants (Hymenoptera, Formicidae). In: *Advances in myrmecology* (ed. Trager JC), pp. 163-187. EJ Brill, Leiden.
- Cole BJ (1983) Multiple mating and the evolution of social behavior in the Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **12**, 191-201.
- Cole BJ & Wiernasz DC. (2000) Colony size and reproduction in the western harvester ant, *Pogonomyrmex occidentalis*. *Insectes Sociaux*, **47**, 249-255.
- Crozier RH (1971) Heterozygosity and sex determination in haplo-diploidy. *American Naturalist*, **105**, 399-412.
- Crozier RH & Page RE (1985) On being the right size, male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **18**, 105-115.
- Crozier RH & Pamilo P (1996) *Evolution of social insect colonies*. Oxford University Press, Oxford.
- Crozier RH & Fjerdingstad EJ (2001) Polyandry in social Hymenoptera: Disunity in diversity? *Ann. Zool. Fenn.* **38**, 267-285.
- Denny AJ, Franks NR, Powell S & Edwards KJ. (2004) Exceptionally high levels of multiple mating in an army ant. *Naturwissenschaften*, **91**, 396-399.
- Dobson SL & Tanouye MA (1998) Evidence for a genomic imprinting sex determination mechanism in *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Genetics*, **149**, 233-242.
- Fjerdingstad EJ & Boomsma JJ (1997) Variation in size and sperm content of sexuals in the leafcutter ant *Atta colombica*. *Insectes Soc.*, **44**, 209-218.
- Fjerdingstad EJ & Boomsma JJ (1998) Multiple mating increases the sperm stores of *Atta colombica* leafcutter ant queens. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **42**(4), 257-261.

- Foster KRP, Seppä P, Ratnieks FLW & Thorén PA (1999) Low paternity in the hornet *Vespa crabro* indicates that multiple mating by queens is derived in vespine wasps. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **46**, 252-257.
- Franck P, Coussy H, Le CY, Solignac M, Garnery L & Cornuet JM (1999) Microsatellite analysis of sperm admixture in honeybee. *Insect Mol. Biol.* **8**, 419-421.
- Franks NR (1985) Reproduction, foraging efficiency and worker polymorphism in army ants. In: Holldobler B & Lindauer M eds, *Experimental Behavioral Ecology and Sociobiology: in Memoriam Karl Von Frisch, 1886–1982*, pp. 91–107. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Gordon DM (1996) The organization of work in social insect colonies. *Nature* **380**, 121-124.
- Haberl M & Tautz D (1998) Sperm usage in honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **423**, 247-255.
- Hamilton WD (1964) The genetical evolution of social behavior I. *Journal of Theoretical Biology*, **7**, 1-16.
- Hamilton W D (1964) The genetical evolution of social behavior II. *Journal of Theoretical Biology*, **7**, 17-52.
- Hamilton WD (1987) Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraints of social evolution. In: Ito Y, Brown JL & Kikkawa J eds, *Animal societies: theory and facts*, pp. 81-102. Japanese Scientific Society, Tokyo.
- Harbo JR (1990) Artificial mixing of spermatozoa from honeybees and evidence for sperm competition. *Journal of Apicultural Research* **29**(3), 151-158.
- Hughes WOH & Boomsma JJ (2004) Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. *Evolution*, **58**, 1251-1260.
- Hughes WOH & Boomsma JJ (2005) Does genetic diversity hinder parasite evolution in social insect colonies? *Journal of Evolutionary Biology*, in press.
- Julian G & Cahan S (1999) Undertaking specialization in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor*. *Animal Behaviour* **58**, 437-442.

- Kronauer DJC, Schöning C, Pedersen JS, Boomsma JJ & Gadau J (2004) Extreme queen mating frequency and colony fission in African army ants. *Molecular Ecology*, **13**, 2381–2388.
- Lavigne RJ (1969) Bionomics and nest structure of *Pogonomyrmex occidentalis* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **62**, 1166-1175.
- Lenoir A, Quérard L, Pondicq N & Berton F (1988) Reproduction and dispersal of the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera Formicidae). *Psyche*, **95**, 21-44.
- Moritz RFA (1985) The effects of multiple mating on the worker-queen conflict in *Apis mellifera*. *Behav Ecol Sociobiol* **16**, 1986
- Murakami T, Higashi S & Windsor D (2000) Mating frequency colony size polyethism and sex ratio in fungus-growing ants (Attini). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **48**, 276-284.
- Nielsen R, Tarpay DR & Reeve HK (2003) Estimating effective paternity number in social insects and the effective number of alleles in a population. *Molecular Ecology*, **12**, 3157-3164.
- Page RE Jr (1980) The evolution of multiple mating behavior by honey bee queens (*Apis mellifera* L). *Genetics*, **96**, 263-273.
- Page RE Jr, Robinson GE, Fondrk MK & Nasr ME (1995) Effects of worker genotypic diversity on honey bee colony development and behavior (*Apis mellifera* L). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **36**, 387-396.
- Pamilo P, Sundström L, Fortelius W & Rosengren R (1994) Diploid males and colony level selection in *Formica* ants. *Ethol. Ecol. Evol.* **6**, 221-235.
- Passera L & Keller L (1990) Loss of mating flight and shift in the pattern of carbohydrate storage in sexuals of ants (Hymenoptera; Formicidae). *J. Comp. Biochem. Syst. Environ Physiol.*, **160**, 207-211.
- Pearcy M, Clémencet J, Chameron S, Aron S & Doums C (2004a) Characterization of nuclear DNA microsatellite markers in the ant *Cataglyphis cursor*. *Mol Ecol Notes* **4**, 642-644.
- Pearcy M, Aron S, Doums C & Keller L (2004b) Conditional use of sex and parthenogenesis for worker and queen production in ants. *Science* **306**, 1780-1783.

- Pearcy M, Hardy O & Aron S (in press) Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant.
- Pearcy M & Aron S (submitted) Local resource competition and sex ratio in the ant *Cataglyphis cursor*.
- Queller DC (1993) Genetic relatedness and its components in polygynous colonies of social insects. In: *Queen Number and Sociality in Insects* (ed. Keller L), pp. 132-152. Oxford University Press, Oxford.
- Raigner A & van Boven J (1955) Etude taxonomique, biologique et biometrique des *Dorylus* du sous-genre *Anomma* (Hymenoptera, Formicidae). *Ann. Mus. Royal Congo Belge, n.s. 4, Sciences Zoologiques* **2**, 1-359.
- Ratnieks FLW (1988) Reproductive harmony via mutual policing by workers in ensocial Hymenoptera. *American Naturalist*, **132**, 217-236.
- Ratnieks FLW & Boomsma JJ (1995) Facultative sex allocation by workers and the evolution of polyandry by queens in social Hymenoptera. *American Naturalist*, **145**(6), 969-993.
- Reichardt AK & Wheeler DE (1996). Multiple mating in the ant *Acromyrmex versicolor*: a case of female control. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **38**, 219-225.
- Robinson GE & Page RE (1988) Genetic determination of guarding and undertaking in honey bee colonies. *Nature* **333**, 356-358.
- Sambrock J, Fritsch EF & Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sasaki K, Satoh T & Obara Y (1995) Sperm utilization by honey bee queens: DNA fingerprinting analysis. *Applied Entomology and Zoology* **30**, 335-341.
- Sherman PW, Seeley TD & Reeve HK (1988) Parasites, pathogens, and polyandry in social Hymenoptera. *Am. Nat.*, **131**, 602-610.
- Simmons LW, (2001) *Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects.* Princeton University Press, Princeton.

- Snyder LE (1992) The genetics of social behavior in a polygynous ant. *Naturwissenschaften* **79**, 525-527.
- Snyder LE (1993) Non-random behavioural interactions among genetic subgroups in a polygynous ant. *Anim. Behav.*, **46**, 431-439.
- Strassmann JE (2001) The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insect. Soc.*, **48**, 1-13.
- Sundström L & Ratnieks FLW (1998) Sex ratio conflicts mating frequency and queen fitness in the ant *Formica truncorum*. *Behav. Ecol.* **9**, 116-121.
- Tarpy DR & Page Jr RE. (2001) The curious promiscuity of queen honey bees (*Apis mellifera*): evolutionary and behavioral mechanisms. *Ann. Zool. Fenn.* **38**, 255-265.
- Thornhill R & Alcock J (1983). *The Evolution of Insect Mating Systems*. Harvard University, Cambridge.
- Trivers RL & Hare H (1976) Haplodiploidy and the evolution of the social insects. *Science*, **191**, 249-263.
- Trontti K., Aron S. & Sundström L. (2005) Inbreeding and kinship in the ant *Plagiolepis pygmaea*. *Molecular Ecology*, **14**, 2007-2015.
- Tschinkel WR (1987) Fire ant queen longevity and age: estimation by sperm depletion. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, **80**, 263-266.
- Woyciechowski M & Lomnicki A (1987) Multiple mating of queens and the sterility of workers among eusocial Hymenoptera. *Journal of Theoretical Biology*, **128**, 317-327.

Article 5.

Compétition locale pour les ressources et sex-ratio chez la fourmi *Cataglyphis cursor*

L'utilisation sélective de la reproduction sexuée et asexuée pour la production de la caste ouvrière et reproductrice, respectivement, a une conséquence importante sur les asymétries de parentés entre les ouvrières et les reproducteurs des deux sexes: bien que la structure socio-génétique des sociétés soit potentiellement variable (nombre d'accouplements, remplacement de la reine, etc.), celle-ci n'influence pas la parenté entre ouvrières et les reproducteurs. La stabilité des asymétries de parentés facilite d'autant la mise en évidence de l'influence des facteurs écologiques et des stratégies de reproduction sur le sex-ratio.

L'hypothèse de la compétition locale pour les ressources (*local resource competition*, LRC) prédit que, lorsque les descendants entrent en compétition avec leur mère, le sex-ratio de la descendance devrait être biaisé en faveur du sexe dispersant. Chez les fourmis, une LRC se produit typiquement chez les fourmis polygynes, où la fondation des nouvelles sociétés se produit par bourgeonnement. Ceci résulte en une forte structuration de la population et un sex-ratio biaisé en faveur des mâles à l'échelle de la population. En situation de polygynie, cependant, l'effet de la LRC sur le sex-ratio est souvent masqué par la diminution des asymétries de parenté au sein de la colonie. De plus, les facteurs environnementaux, tels la disponibilité des ressources, peuvent également influencer le sex-ratio chez les fourmis. Nous avons étudié le sex-ratio chez *C. cursor*, où les colonies se reproduisent par bourgeonnement et les sexués mâles et femelles sont produits par parthénogenèse, de sorte que les variations inter-coloniales dans les asymétries de parentés devraient être réduites. Nos résultats montrent que le sex-ratio chez *C. cursor* est fortement biaisé en faveur des mâles tant au niveau des colonies qu'à celui de la population. Les analyses génétiques révèlent une structuration spatiale significative de la population d'étude, en accord avec la faible dispersion des femelles. Conformément à nos attentes dans une situation où les individus reproducteurs sont produits de manière asexuée, seules de faibles variations d'asymétries de parenté entre ouvrières et sexués ont été détectées, et elles ne sont pas associées au sex-ratio. Contrairement aux prédictions de l'hypothèse de la disponibilité aux ressources, le biais mâle augmente significativement avec la taille de la colonie et l'investissement en mâles - à la différence de l'investissement en femelles - est positivement corrélé à l'investissement total en sexués. De manière globale, ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que la LRC est responsable des variations du sex-ratio chez *C. cursor*.

Local resource competition and sex ratio in the ant *Cataglyphis cursor*

¹Morgan Pearcy, ¹Serge Aron

¹Behavioural and Evolutionary Ecology, CP 160/12

Université Libre de Bruxelles

Avenue F.D. Roosevelt, 50

B-1050 Bruxelles

Belgium

Contacts:

Morgan Pearcy, corresponding author

Tel: +32.2.650.22.67

Fax: +32.2.650.24.45

E-mail: mpearcy@ulb.ac.be

Running title: Local resource competition in the ant *Cataglyphis cursor*

Abstract

The local resource competition (LRC) hypothesis predicts that wherever philopatric offspring compete for resources with their mothers, offspring sex ratios should be biased in favour of the dispersing sex. In ants, LRC is typically found in polygynous (multiple-queen) species where foundation of new nests occurs by budding, which results in a strong population structure and a male-biased population-wide sex ratio. However, under polygyny, the effect of LRC on sex allocation is often blurred by the effect of lowered relatedness asymmetries among colony members. Moreover, environmental factors, such as the availability of resources, have also been shown to deeply influence sex allocation in ants. We investigated sex allocation in the monogynous (single-queen) ant *Cataglyphis cursor*, a species where colonies reproduce by budding and both male and female sexuals are produced through parthenogenesis, so that between-colony variations in relatedness asymmetries should be reduced. Our results show that sex allocation in *C. cursor* is highly male-biased both at the colony and population levels. Genetic analyses indicate a significant isolation-by-distance in the study population, consistent with limited dispersal of females. As expected from asexual reproduction, only weak variations in relatedness asymmetry of workers towards sexual offspring occur across colonies and they are not associated with colony sex ratio. In contrast with the predictions of the resource availability hypothesis, the male bias significantly increases with colony size and investment in males, but not in females, is positively correlated with total investment in sexuals. Overall, these results are consistent with the predictions of the LRC to account for sex ratio variation in this species.

Keywords: *Sex ratio, local resource competition, relatedness, Cataglyphis cursor, Formicidae*

Introduction

Social Hymenoptera have been the focus of much empirical and theoretical work for testing the predictions of sex ratio (Fischer, 1930) and kin selection (Hamilton, 1964) theories. So far, most studies emphasized the effect of relatedness asymmetries and resource abundance on sex allocation. Asymmetry in relatedness of females and males towards the workers that raise them arise from the haplodiploid sex determining system of Hymenoptera, which causes full sisters to be three times more related to each other ($r= 0.75$) than they are to their brothers ($r= 0.25$). Fischerian sex ratio selection should thus result in a 3:1 female bias, when workers (which are always females) raise full siblings and control sex allocation (Trivers and Hare, 1976). Female bias is expected to decrease concomitantly with a decrease in relatedness asymmetries, both at the population and colony level. The most important factors reducing relatedness asymmetries are the presence of more than one reproductive queen per colony (polygyny) when queens are related, multiple mating by queens (polyandry) and worker reproduction (Boomsma and Grafen, 1991; Bourke and Franks, 1995; Crozier and Pamilo, 1996; Trivers and Hare, 1976). Cross-species analyses over a large range of Hymenoptera show that colonies with high relatedness asymmetries tend to produce more females than colonies with lower relatedness asymmetries, consistent with workers controlling sex allocation (Chapuisant and Keller, 1999; Queller and Strassmann, 1998; Sundström, 1994; Sundström *et al.*, 1996).

Resource availability may also cause sex ratio variation among colonies. Two models examine explicitly resource-dependent sex investment ratios. First, resource abundance directly affects caste determination among the diploid brood, that is, whether a diploid egg will develop into a sterile worker or a winged queen. Food-constrained colonies should produce workers rather than winged females, while their haploid brood will still develop into adult males, promoting a male-biased sex ratio. On the other hand, well-fed colonies can convert a large proportion of the diploid brood into reproductive females; they should rear both males and females, with a relative overinvestment in winged females (Crozier and Pamilo, 1993; Nonacs, 1986). Second, the multifaceted parental investment hypothesis (MPIH, Rosenheim *et al.*, 1996) proposes that resource-limited colonies specialize on the production of the cheaper sex, usually males, whereas colonies with sufficient resources but limited by the rate of brood production specialize on the production of the most costly sex, that is, winged females. Thus, predictions of the resource abundance and MPIH hypotheses are similar in that both predict an association between productivity and sex allocation, with more productive colonies investing proportionally more in queen production (Crozier and Pamilo, 1993; Nonacs, 1986; Rosenheim

et al., 1996). Several studies have shown a positive association between reproductive output and relative investment in females in ants (Banschbach and Herbers, 1996; Deslippe and Savolainen, 1995; Morales and Heithaus, 1998; Ode and Rissing, 2002 but see *e.g.* Aron *et al.*, 2001; Backus and Herbers, 1992; Herbers and Banschbach, 1999 for different results).

A key factor which has received relatively little attention is the influence of dispersal strategies of both sexes on sex allocation. When dispersal is sex-dependant, fitness return from investing to the less dispersing sex is a diminishing function of the investment, *i.e.* the less dispersing sex becomes devaluated. Under local mate competition (LMC; Hamilton, 1967), competition among sons for mates lowers the reproductive value of males with increased investment in sexuals. When LMC exists, the constant male hypothesis predicts that colonies should produce males up to some threshold and then invest all remaining resources in female reproductives, resulting in a female-biased sex ratio at the population level (Frank, 1987). Conversely, under local resource competition (LRC; Clark, 1978), dispersal of females is limited and related queens compete for access to resources (nest sites, food), so that the fitness return through females decreases with increased investment relative to the fitness return through males. Thus, LRC predicts an association between productivity and sex allocation, with more productive colonies investing proportionally more in male production. Under LRC, the constant female hypothesis predicts that colonies should invest the same amount of resources in females and all remaining resources in males. With increasing access to resources, investment in males is expected to increase while investment in females should remain constant (Frank, 1987). In ants, LRC is typically found in polygynous species where foundation of new colonies occurs by budding (Keller, 1991), *i.e.* young mated queens leave the colony with adult workers to initiate new colonies nearby, which results in a strong population structure and a male-biased population-wide sex ratio (Chan and Bourke, 1994; Pamilo and Rosengren, 1983; Sundström, 1993, 1995; Walin and Seppä, 2001; Ward, 1983). In such species, however, the effect of local resource competition on sex allocation is often blurred by the effect of lowered relatedness asymmetries due to polygyny.

In this paper, we investigated the sex allocation patterns in the ant *Cataglyphis cursor*. Colonies of this species are strictly monogynous (Cagniant, 1976, Percy *et al.*, 2004b), and queens mate multiply (Percy *et al.*, 2004b), which should lower relatedness asymmetries. Nevertheless, a recent study showed that queens use sexual reproduction for workers and thelytokous parthenogenesis for new queens production (Percy *et al.*, 2004b). Males arise from unfertilized eggs, as is usually the case in Hymenoptera. Since both male and female

sexualls are produced asexually, asymmetries in relatedness are not affected by queen mating frequency and, hence, no between-colony variation in relatedness asymmetries is expected. Unmated workers of *C. cursor* can produce males by arrhenotokous parthenogenesis and females by thelytokous parthenogenesis (Cagniant, 1973). However, behavioural studies suggested that workers never reproduce in queenright colonies (Cagniant, 1979); this requires confirmation through genetic analyses. An interesting feature of the species is that, while strictly monogynous, colonies reproduce by budding (Clémencet *et al.*, 2005; Lenoir *et al.*, 1988). Local resource competition is therefore likely to affect colony sex ratios in *C. cursor*. We analyzed the genetic structure of population and societies, examined worker reproduction through genetic analyses and tested the effects of relatedness asymmetries, resource availability and local resource competition on colony sex ratio.

Material and Methods

Field collection and sampling

Cataglyphis cursor is found in the stretches of steppe and Mediterranean forest up to dry forest, and is discontinuously distributed from central Spain to Mongolia (Agosti, 1990). Nests of *C. cursor* possess a single entrance and usually one vertical gallery leading to rooms located up to 1 meter deep. In this species, there is no overwintering brood (Cagniant, 1976). Production of sexuals and workers is separate in time; sexuals emerge on mid-May from the very first eggs laid at the end of the winter, while workers are produced later on, in summer. Mating occurs in or close to the nest in early June, and is followed 1 to 3 weeks later by colony budding (Lenoir *et al.*, 1988). Transfer of workers and brood between the mother and daughter nests can last for a few weeks, after which colonies remain isolated from each other.

Fifty-seven nests of *C. cursor* were completely excavated in the end of April/early May in 2001, 2002 and 2003 at St-Hyppolite (southern France; 42.82° North, 2.99° East), before the emergence of the first sexuals. Colonies whose entrance were located too close from each other were not collected so as to prevent mixing individuals from different nests. All adults (queens and workers) as well as brood at various stages (eggs, larvae and sexual pupae) were collected and brought into the laboratory. The number of workers per colony was counted (mean colony size \pm SD= 752.4 \pm 602.4; range: 78 - 2658) and a sample of workers from each nest was immediately stored at -80°C for subsequent genetic analyses. Colonies were housed in artificial nests. They were maintained under laboratory conditions (26 \pm 2°C and 12h:12h L:D) and were fed on cockroaches, sugar water and grape. Colonies were censused twice a week and all sexuals emerging from the pupae were collected and deep-frozen.

DNA extraction and microsatellite analysis

To assess the kin structure of the colonies, a sample of workers (mean \pm S.D. = 16.07 \pm 6.04; range: 7-28), the queen and up to 32 sexuals taken from 35 colonies were genotyped at four polymorphic microsatellite loci (*Ccur11*, *Ccur46*, *Ccur58* and *Ccur63b*; Pearcy *et al.*, 2004a). Individual ant DNA was extracted by homogenization in a digestive solution (100mM NaCl, 50mM Tris, 1mM EDTA, 0.5% SDS, and 200 μ g/ml proteinase K (BIOGENE)) and incubated for 2 hours at 55°C. Genomic DNA was purified by phenol/chloroform and precipitated with ethanol following standard protocols, and then suspended in 100 μ l. Amplifications were carried out in a 10 μ l volume using the standard 10x Buffer and Taq from QIAGEN

Polymerase kit (Pearcy *et al.*, 2004a). Amplified fluorescent fragments were visualized using an automated ABI Prism 310 sequencer.

Population and colony genetic structure

Twelve to 30 workers ($\bar{x} \pm \text{SD} = 15.3 \pm 5.8$; $n = 535$) and the queen ($n = 33$; 2 queens died before genetic analyses) were typed from a sample of 35 nests. Relatedness coefficients were estimated using the program RELATEDNESS 4.2c according to the method described by Queller and Goodnight (1989). Colonies were weighted equally and standard errors were obtained by jackknifing over colonies. Isolation-by-distance was investigated by plotting $[F_{st}/(1-F_{st})]$ coefficients between pairs of colonies against the log of geographical distance (Slatkin, 1993). Significance of correlation coefficient between genetic differentiation and geographical distance was assessed with Mantel test using GENEPOP 3.2a (Raymond and Rousset, 1995) with 10000 permutations. In addition, we investigated whether adjacent colonies (*i.e.*, nearest neighbouring nest) had nonzero interrelatedness by using RELATEDNESS 4.2c. Life-for-life relatednesses are used throughout.

The possibility of worker reproduction was assessed by comparing the genotype of the males with the queen's genotype; worker reproduction was assessed from males genotype only, because worker-produced females are not genetically distinguishable from the queen's own diploid offspring. Seventy-one males were typed from 9 colonies ($\bar{x} \pm \text{SD} = 7.9 \pm 4.3$). Sons of queens must carry a queen-derived allele at all loci and, as a group, they should not display more than two alleles at a single locus. Sons of workers may carry with equal probability either an allele derived from the mother or the father of the worker. Any male that carry a non-queen allele is a worker's son. However, because sons of workers may carry queen alleles at all loci by chance, this probability of non-detection was estimated following Foster *et al.* (2001),

$$P_{\text{non-detect}} = \sum_i^n p_i (0.5^{l_i})$$

where n is the number of patriline in the nest, p_i is the proportional contribution of the i th father to the brood and l_i is the number of informative loci analysed at the i th patriline. An informative locus is one where the queen and her mate have different alleles so that the workers carry an allele that the queen does not.

Sex ratio analysis

Investment ratio was expressed as the proportional investment in females among sexuals. Reproductives of both sexes were dried for 48h at 55°C and then weighted at the nearest 0.01 mg. Sexual dimorphism is weak in the species; the average dry weight of mature females was $D_f = 4.08 \pm 0.69$ mg and that of males $D_m = 3.33 \pm 0.49$ mg. Investment ratios were calculated by multiplying each colony male and female number with their respective dry weight. Data were corrected by using Boomsma's (1989) energetic cost ratio $(D_f/D_m)^{0.7}$. Colonies producing less than 5 sexuals were not considered in our analysis because low sexual production increases the probability of extreme sex ratios.

Statistical analyses

To explore the effect of relatedness asymmetries, colony size and total sexual productivity on colony sex ratios, a logistic binomial regression model was carried out using the procedure GLM in the software R (Ihaka and Gentleman, 1996). This model assumes that the dependent variable is a probability that follows a binomial distribution, and can account for variation in sample size. Spearman rank correlations were used to test for an association between colony size or investment in each sex and total sexual productivity using the software GRAPHPAD INSTAT[®].

Results

Population genetic structure

There was a significant correlation between genetic differentiation between pairs of colonies and the geographical distance (Mantel test: $P= 0.028$), indicating low but notable isolation-by-distance pattern in the study population. Genetic viscosity was also supported by the significant nonzero relatedness between adjacent nests ($r= 0.23$; $SE_{\text{jackknife}}= 0.02$, $n= 35$ nests; two-tailed t -test, $P< 0.001$).

The mean population-wide genetic relatedness among workers was $r= 0.42$ ($SE_{\text{jackknife}}= 0.02$, $n= 35$ nests), consistent with queens being mated with 4-8 males in the study population (Pearcy *et al.* 2004b). None of the 71 males ($n= 9$ colonies) examined carried non-queen alleles. The average probability of non-detection of worker-produced males was low and equal to 0.13. This indicates that worker reproduction is rare or even absent in queenright colonies of *C. cursor*.

Colony sex ratios

From the 57 colonies sampled, 20 (35%) produced sexuals. There was a positive association between colony size and sexual production (Spearman rank correlation, $r_s= 0.50$, $n= 57$, $P< 0.001$). Only 14 colonies (26%) raised more than 5 sexuals: 9 produced females and all 14 produced males (figure 1). From these colonies, we collected 59 females and 231 males, resulting in a male-biased population-wide numerical sex ratio (proportion of females among sexuals) of 0.20. The population-wide sex investment ratio in females was 0.24, giving a 1:3.2 female to male investment ratio.

Relatedness asymmetries and sex ratio

As expected from the production of winged females through thelytokous parthenogenesis, relatedness between the queen and their sexual daughters was close to 1, and twice the relatedness between the queen and their sons (table 1). By contrast, the mean relatedness of workers, who are sexually produced, to reproductive females was not different from 0.5 (two-tailed t -test, $t= 1.63$, $P= 0.14$). The life-for-life relatedness of workers to males was also not significantly different from 0.25 expected in colonies headed by a single queen, independently of queen mating frequency (two-tailed t -test, $t= 1.76$, $P= 0.12$). The standard errors (jackknife) associated with these relatedness values are low, indicating limited variations between colonies in their kin structure. Relatedness asymmetry of workers towards females and males ranged

from 1.6 to 2.4 across colonies, and was on average 1.98:1. Colony sex ratio was not correlated with variations in relatedness asymmetry (logistic regression, $n=9$, $P=0.14$).

Resource availability and sex ratio

Among the 14 colonies producing sexuals, there was no association between colony size and total sexual productivity (Spearman rank correlation, $r_s = -0.11$, $n=14$, $P=0.71$). However, sex allocation was significantly negatively correlated with colony size, with larger colonies investing proportionally more in male production (logistic regression, $n=14$, $P<0.001$; figure 2a). Similarly, there was a negative, albeit nonsignificant association between the proportional investment in females and total sexual productivity (logistic regression, $P=0.75$, $n=14$; figure 2b).

Local resource competition and sex ratio

Consistent with the predictions of local resource competition, the investment in males increased significantly with total sexual productivity (Spearman rank correlation, $r_s = 0.83$, $n=14$, $P<0.001$), whereas investment in females did not ($r_s = 0.48$, $P=0.08$; figure 3). These trends are robust and significance remained unchanged even when the extreme values of total sexual productivity (productivity values of 293 and 170) were removed from the analysis (investment in males and females for $n=13$: $r_s = 0.79$, $P=0.001$ and $r_s = 0.35$, $P=0.24$, respectively; for $n=12$: $r_s = 0.73$, $P=0.009$ and $r_s = 0.17$, $P=0.60$).

Discussion

Our results show that sex ratio in *Cataglyphis cursor* is male-biased both at the colony and population levels, and that male bias significantly increases with colony size. More importantly, investment in males, but not in females, is positively correlated with total investment in sexuals. These results are consistent with the predictions of the local resource competition between related females to account for sex ratio variation in this species. Local resource competition is also supported by the positive correlation between genetic and geographic distance (see also Clémencet *et al.* 2005 for similar results), suggesting that related colonies experience competition for access to food sources and/or nest sites. In dependent-founding species, worker production must be regarded as an investment in females because they support young queens to successfully establish new nests (Hamilton, 1975; Macevicz, 1979; Pamilo, 1991). Estimating investment in females for a colony may prove complex, because the number and composition of the buds are variable so that it is difficult to assess the number of workers involved in the budding process and, thus, the proportional investment in workers that should be counted as investment in the female sex. In *C. cursor*, workers emerge after colony budding. Sexual production, mating and budding occur successively until the end of spring, while workers are produced after budding, in summer. The cost associated with departure of old workers from the mother nest is therefore reduced. Moreover, there is no direct competition for allocation of resources between sexuals and workers (Pamilo, 1991); resources that are not spent into sexual production are not simply channelled into worker production. As a result, the male-biased sex investment ratio reported here in *C. cursor* should not be considerably overestimated.

Neither relatedness asymmetry, nor resource availability or worker reproduction explains sex ratio variations across colonies in *C. cursor*. Relatedness asymmetries towards reproductives indicate that queens' and workers' interests converge since both are on average twice as much related to female sexuals than to males. This stems from the unusual mating system of this species, whereby reproductives of both sexes are produced through parthenogenesis while workers arise from fertilized eggs. Consistent with the parthenogenetic production of sexuals, our data show that asymmetries of relatedness are stable across colonies and fail to justify between colony sex ratio variations in *C. cursor*. The resource availability hypothesis may also be ruled out to explain sex ratio variations in the population studied. According to this hypothesis, small colonies should favour male production, whereas large and well-fed colonies should favour females. In direct contradiction with these predictions, our results show that sex ratio is significantly more male-biased in large colonies than in small

ones. Moreover, colonies producing few sexuals tend to produce proportionally more females than colonies with high sexual output. Finally, our genetic analyses revealed no worker-produced male, consistent with the absence of worker reproduction in queenright colonies (Cagniant, 1979).

Under LRC, the constant female hypothesis predicts the production of a constant amount of females before investing additional resources into males, resulting in a negative association between proportional investment in females and total sexual production (Frank, 1987). Although our data support a clear effect of LRC on population-level sex allocation in *C. cursor*, they are not fully consistent with the CFH. First, 5 out of the 14 colonies sampled did not rear females at all. Large variation in female production is also direct evidence against CFH, which predicts low variation in female production across colonies. Female production varied from 0 to 18, but remained still less variable than male production (0 to 72). Second, our data show a negative, though not significant association between proportional investment in females and total sexual productivity. However, the fact that few colonies produce sexuals in this species greatly limited our sampling and, hence, does not allow an unambiguous test of this hypothesis.

In ants, a male-biased sex ratio at the population level is usually found in polygynous species. One reason is that the presence of multiple reproductive queens reduces the worker's relatedness asymmetries (Trivers and Hare, 1976). Another is that, while monogynous ant species usually reproduce by emitting dispersing sexuals (new queens and males), polygynous ants often exhibit colony budding (Keller, 1991). This results in local resource competition among daughter queens, which predicts male-biased sex ratio at the population level (Clark, 1978; Pamilo, 1991). The ant *C. cursor* is remarkable in that this strictly monogynous species reproduces by budding. In addition, both male and female sexuals are produced by parthenogenesis (respectively, arrhenotoky and thelytoky), so that relatedness asymmetries do not vary between colonies. Our current findings therefore strongly support local resource competition as the primary factor affecting sex ratio in this species.

Acknowledgments

We thank M. Gilbert for his help for statistical analyses, D. Fournier, B. Viginier, M. Richard for their assistance while genotyping, and L. Keller for his useful comments and suggestions on the manuscript. This work was supported by the Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et

l'Agriculture (F.R.I.A.) doctoral grant (MP) and grants from the belgian Fond National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S.) (SA).

References

- Agosti D, 1990. Review and reclassification of *Cataglyphis* (Hymenoptera, Formicidae). *J Nat Hist* 24:1457-1505.
- Aron S, Keller L, Passera L, 2001. Role of resource availability on sex, caste and reproductive allocation ratios in the Argentine ant *Linepithema humile*. *J Anim Ecol* 70:831-839.
- Backus V L, Herbers JM, 1992. Sexual allocation ratios in forest ants - food limitation does not explain observed patterns. *Behav Ecol Sociobiol* 30:425-429.
- Banschbach VS, Herbers JM, 1996. Complex colony structure in social insects: II. Reproduction, queen-worker conflict, and levels of selection. *Evolution* 50:298-307.
- Boomsma JJ, 1989. Sex-investment ratios in ants: has female bias been systematically overestimated? *Am Nat* 133:517-532.
- Boomsma JJ, Grafen A, 1991. Colony-level sex ratio selection in the eusocial Hymenoptera. *J Evol Biol* 3:383-407.
- Bourke AFG, Franks NR, 1995. *Social evolution in ants*. Princeton: Princeton University Press.
- Cagniant H, 1973. Apparition d'ouvrières a partir d'œufs pondus par des ouvrières chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonscolombe (Hymenopteres : Formicidae). *C R Acad Sc Paris, Série D* 277:2197-2198.
- Cagniant H, 1976. Distribution, écologie et nid de la fourmi *Cataglyphis cursor* fonscolombe (Hyménoptères: Formicidae). *Vie et Milieu* 26:265-276.
- Cagniant H, 1979. La parthénogénese thélytoque et arrhénotoque chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonsc., Hym. Form. Cycle biologique en élevage des colonies avec reine et des colonies sans reine. *Insect Soc* 26:51-60.
- Chan GL, Bourke AFG, 1994. Split sex ratios in a multiple-queen ant population. *Proc R Soc Lond B* 258:261-266.
- Chapuisat M, Keller L, 1999. Testing kin selection with sex allocation data in eusocial Hymenoptera. *Heredity* 82:473-478.

- Clark AB, 1978. Sex ratio and local resource competition in a prosimian primate. *Science* 201:163-165.
- Clémencet J, Viginier B, Doums C, 2005. Hierarchical analysis of population genetic structure in the monogynous ant *Cataglyphis cursor* using microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Mol Ecol* 14(12):3735-3744.
- Crozier RH, Pamilo P, 1993. Sex allocation in social insects: problems in prediction and estimation. In: *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites* (Wrensch DL, Ebbert MA, eds). New York: Chapman and Hall; 369-383.
- Crozier RH, Pamilo P, 1996. *Evolution of social insect colonies*. Oxford: Oxford University Press.
- Deslippe RJ, Savolainen R, 1995. Mechanisms of competition in a guild of formicine ants. *Oikos* 72:67-73.
- Fisher R, 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford: Clarendon.
- Foster KR, Ratnieks FLW, Gyllenstrand N, Thorén PA, 2001. Colony kin structure and male production in *Dolichovespula* wasps. *Mol Ecol* 10:1003-1010.
- Frank SA, 1987. Individual and population sex allocation patterns. *Theor Popul Biol* 31:47-74.
- Hamilton WD, 1964. The genetical evolution of social behavior I., II. *J Theor Biol* 7:1-52.
- Hamilton WD, 1967. Extraordinary sex ratios. *Science* 156:477-488.
- Hamilton WD, 1975. Innate social aptitudes of man: an approach from evolutionary genetics. In: *Biosocial Anthropology* (Fox R, ed.). London: Malaby Press; 133-153.
- Herbers JM, Banschbach VS, 1999. Plasticity of social organization in a forest ant species. *Behav Ecol Sociobiol* 45:451-465.
- Ihaka R, Gentleman R, 1996. R: a language for data analysis and graphics. *J Comp Graph Stat* 5:299-314.

- Keller L, 1991. Queen number, mode of colony founding and queen reproductive success in ants (Hymenoptera Formicidae). *Ethol Ecol Evol* 4:307-316.
- Lenoir A, Quérard L, Pondicq N, Berton F, 1988. Reproduction and dispersal of the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera Formicidae). *Psyche* 95:21-44.
- Macevicz S, 1979. Some consequences of Fisher's sex ratio principle for social Hymenoptera that reproduce by colony fission. *Am Nat* 113:363-71.
- Morales MA, Heithaus ER, 1998. Food from seed-dispersal mutualism shifts sex ratios in colonies of the ant, *Aphaenogaster rudis*. *Ecology* 79:734-739.
- Nonacs P, 1986. Sex ratio determination within colonies of ants. *Evolution* 40:199-204.
- Ode PJ, Rissing SW, 2002. Resource abundance and sex allocation by queen and workers in the harvester ant, *Messor pergandei*. *Behav Ecol Sociobiol* 51:548-556.
- Pamilo P, Rosengren R, 1983. Sex ratio strategies in Formica ants. *Oikos* 40:24-35.
- Pamilo P, 1991. Evolution of colony characteristics in social insects. I. Sex allocation. *Am Nat* 137:83-107.
- Pearcy M, Clémencet J, Chameron S, Aron S, Doums C, 2004a. Characterization of nuclear DNA microsatellite markers in the ant *Cataglyphis cursor*. *Mol Ecol Notes* 4:642-644.
- Pearcy M, Aron S, Doums C, Keller L, 2004b. Conditional use of sex and parthenogenesis for worker and queen production in ants. *Science* 306:1780-1783.
- Queller DC, Goodnight KF, 1989. Estimation of genetic relatedness using allozyme data. *Evolution* 43:258-275.
- Queller DC, Strassmann JE, 1998. Kin selection and social insects. *Bioscience* 48:165-175.
- Raymond M, Rousset F, 1995. Genepop (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86:248-249.
- Rosenheim JA, Nonacs P, Mangel M, 1996. Sex ratios and multifaceted parental investment. *Am Nat* 148, 501-535.

Slatkin M, 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47(1):264-279.

Sundström L, Chapuisat M, Keller L, 1996. Conditional manipulation of sex ratios by ant workers: a test of kin selection theory. *Science* 274:993-995.

Sundström L, 1993. Genetic population structure and sociogenetic organisation in *Formica truncorum* (Hymenoptera; Formicidae). *Behav Ecol Sociobiol* 33:345-354.

Sundström L, 1994. Sex ratio bias, relatedness asymmetry and queen mating frequency in ants. *Nature* 367:266-268.

Sundström L, 1995. Sex allocation and colony maintenance in monogyne and polygyne colonies of *Formica truncorum* (Hymenoptera, Formicidae) - the impact of kinship and mating structure. *Am Nat* 146:182–201.

Trivers RL, Hare H, 1976. Haplodiploidy and the evolution of social insects. *Science* 191:249-263.

Walsh L, Seppä P, 2001. Resource allocation in the red ant *Myrmica ruginodis* - an interplay of genetics and ecology. *J Evol Biol* 14:694-707.

Ward PS, 1983. Genetic relatedness and colony organization in a species complex of ponerine ants. II. Patterns of sex ratio investment. *Behav Ecol Sociobiol* 12:301-307.

Figure legends

Figure 1: Distribution of the proportional investment in females (investment sex ratio corrected for sex-specific differences in energetic cost) produced by individual colonies of *Cataglyphis cursor*. Black area represents colonies producing exclusively males; no colony produced only females.

Figure 2: Proportional investment in females as a function of colony size (2.a) and total sexual productivity (2.b).

Figure 3: Total investment in males (plain line) and in female reproductives (dotted line) as a function of total sexual productivity. Tendency lines are given for both males and females, yet non significant for the latter.

Tables and table legends

	Queen	Worker
Sexual females	0.99 ± 0.01	0.62 ± 0.07
Males	0.49 ± 0.01	0.32 ± 0.08

Table 1: Life-for-life relatedness estimates (\pm SE) of queens and workers to sexual male and female offspring in *C. cursor*.

Figure 1.

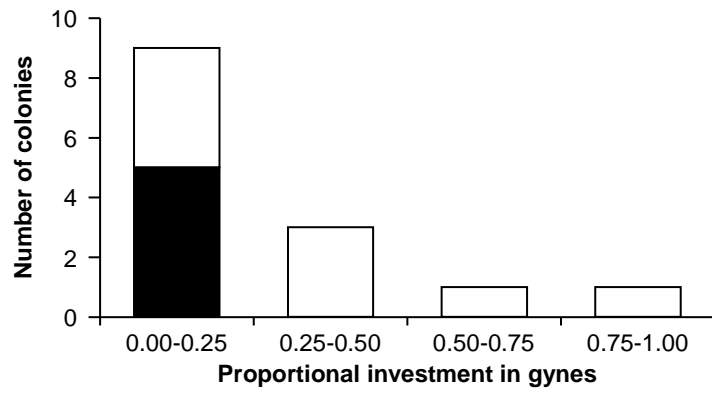


Figure 2.

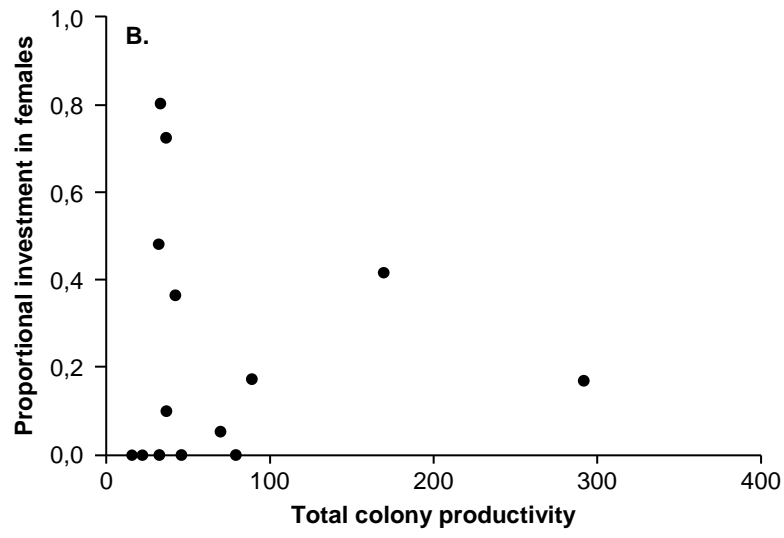
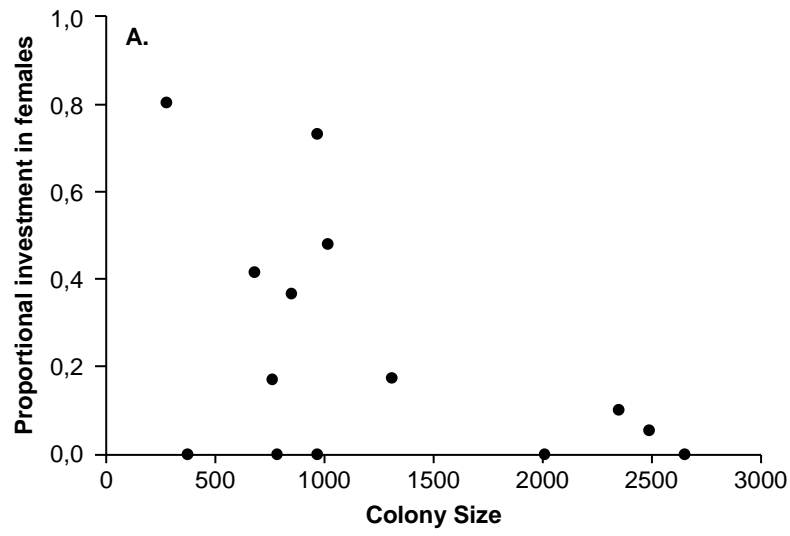
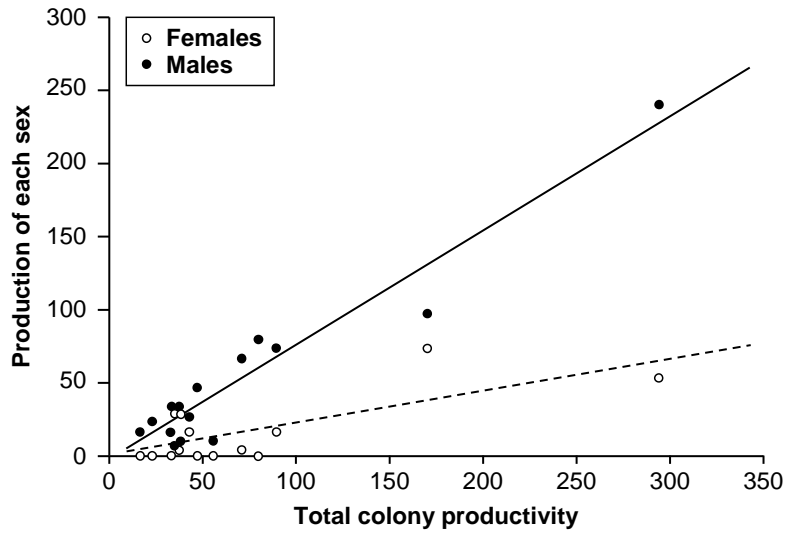


Figure 3.



Conclusion

Les travaux rassemblés dans cette thèse jettent un éclairage nouveau sur différents aspects des stratégies de la reproduction chez la fourmi *Cataglyphis cursor*. Plus particulièrement, nous avons développé des loci microsatellites pour étudier la structure génétique des sociétés et des populations de cette espèce. Ces marqueurs se sont montrés très performants et ont permis d'obtenir des données génétiques pertinentes à l'origine de chacun des différents travaux réalisés dans cet ouvrage.

Le résultat le plus surprenant de nos analyses génétiques est la découverte de la capacité des reines de *C. cursor* à utiliser conditionnellement la reproduction sexuée ou asexuée. Nos résultats montrent que les ouvrières sont issues de plusieurs lignées paternelles différentes (polyandrie), alors que les jeunes femelles reproductrices sont, elles, produites par parthénogenèse thélytoque. L'utilisation conditionnelle de la reproduction sexuée et asexuée respectivement pour la production de la caste ouvrière et reproductrice, permet aux reines de cette espèce de maximiser le taux de transmission de leurs gènes à la descendance reproductrice, tout en conservant un niveau de diversité génétique élevé au sein de chaque société. L'aspect particulièrement adaptatif de cette stratégie conduit à s'interroger sur les raisons qui font de *C. cursor* une espèce propice à l'évolution d'une telle stratégie de reproduction. A la seule exception de la parthénogenèse apomictique, la parthénogenèse thélytoque entraîne une augmentation de l'homozygotie à chaque génération. Cette augmentation du taux d'homozygotie devrait diminuer les chances de survie et le succès reproductif des reines

dans la mesure où elle permet l'expression d'allèles récessifs délétères qui auraient pu échapper aux pressions de sélection, exactement comme en situation de consanguinité (Charlesworth & Charlesworth 1999; Roff 2002; Keller & Waller 2002). Toutefois, l'impact sur le succès reproductif devrait être limité pour les reines de *C. cursor*, et ce pour deux raisons. Premièrement, les Hyménoptères, comme tous les organismes haplo-diploïdes, devraient être moins affectés par la dépression de consanguinité que les organismes diplo-diploïdes dans la mesure où les mutations délétères récessives sont régulièrement exposées aux pressions de sélections chez les mâles haploïdes (Bruckner, 1978; Crozier, 1985; Werren, 1993). Ensuite, chez cette espèce, la fondation de nouvelles colonies ne s'effectue jamais de manière solitaire mais toujours par bourgeonnement. Les reines de *C. cursor*, constamment protégées et assistées par les ouvrières, sont vraisemblablement moins soumises aux pressions de sélection que les reines qui fondent les nouvelles colonies seules après un vol nuptial.

Cette hypothèse suggère qu'une telle stratégie reproductrice pourrait exister chez d'autres hyménoptères sociaux à fondation dépendante. Pourtant, l'existence d'une telle utilisation conditionnelle de la reproduction sexuée et asexuée par les reines n'avait encore jamais été rapportée dans la littérature. Nous envisageons la possibilité que cette stratégie soit plus fréquente que ce qu'il n'y paraît, mais qu'elle soit passée inaperçue. En effet, chez les fourmis, les stratégies de dispersion sont intimement associées au nombre de reines dans une société; les reines des espèces monogynes fondent habituellement leur colonie de manière indépendante, alors que celles des espèces polygynes fondent par bourgeonnement (Keller 1991). Or, l'utilisation de la parthénogenèse pour la production des jeunes reines a de grandes chances de passer inaperçue dans une société polygyne, au sein de laquelle l'étude de la structure socio-génétique est rendue complexe par la présence de plusieurs lignées maternelles. A cet égard, l'existence surprenante d'un mode de fondation dépendant chez *C. cursor*, une espèce monogyne, a peut-être permis de mettre en évidence un phénomène plus fréquent qu'initialement supposé. Cette hypothèse semble au moins partiellement soutenue par la découverte récente de l'utilisation conditionnelle de la reproduction sexuée et asexuée chez la petite fourmi de feu *Wasmannia auropunctata* (Fournier *et al.* 2005), une espèce hautement polygyne. Chez *W. auropunctata*, comme chez *C. cursor*, les nouvelles sociétés sont fondées par bourgeonnement. De même, les reines produisent les ouvrières par reproduction sexuée et les nouvelles reines par parthénogenèse. Cependant, cette espèce se démarque de *C. cursor* par trois aspects de sa reproduction. (i) Les ouvrières sont complètement stériles (Ulloa-Chacon & Cherix, 1988). (ii) La parthénogenèse thélytoque est apomyctique (Fournier *et al.* 2005). Ainsi, les descendants parthéno-génétiques sont de véritables clones de leur

mère. Chez *C. cursor*, certaines femelles reproductrices sont homozygotes pour un locus où leur mère est hétérozygote, le double allèle étant toujours un des allèles maternels; la parthénogenèse automictique avec fusion centrale des noyaux polaires est le seul mécanisme cytologique qui puisse justifier ce résultat. (iii) Les mâles de *W. auropunctata* ne portent que des allèles paternels, et sont donc des clones de leur père. Ce résultat révèle l'existence d'un mécanisme d'exclusion du matériel génétique maternel. La reproduction clonale par les mâles a été rapportée chez *Apis mellifa* (Koeniger *et al.*, 1989) bien que les supposés fils clonaux aient pu être, en réalité, des mâles diploïdes. Des exemples d'exclusion du matériel génétique d'un des deux parents ont été décrits chez les poissons, les amphibiens, et plusieurs espèces d'insectes (Simon *et al.*, 2003; Normark, 2003). Toutefois, il s'agissait à chaque fois du génome paternel. Chez *W. auropunctata*, le clonage des mères et des pères résulte en un cloisonnement des pools géniques mâles et femelles! Les gènes ne s'associent finalement qu'au sein des ouvrières, qui ne se reproduisent jamais.

Bien que les reines de *C. cursor* soient capables de produire une descendance diploïde par parthénogenèse, elles ont conservé la reproduction sexuée pour la caste ouvrière et s'accouplent avec plusieurs mâles. Ceci indique que la reproduction sexuée a une fonction importante au niveau de la colonie. De nombreuses hypothèses ont été avancées pour justifier l'évolution et le maintien de la polyandrie chez les insectes sociaux (voir Introduction, p. 5). La dissection des vésicules séminales des mâles et des spermathèques des femelles suggère que les reines de cette espèce ne s'accouplent pas à plusieurs reprises pour accroître leur réserve de sperme. L'absence de mâles diploïdes indique également qu'il ne s'agit pas d'une stratégie visant à limiter les coûts associés à la production de tels mâles. Parmi les différentes hypothèses envisagées

afin de justifier la polyandrie chez les insectes sociaux, deux semblent particulièrement pertinentes pour *C. cursor*. Premièrement, plusieurs travaux réalisés chez l'abeille domestique *Apis mellifera* (Palmer & Oldroyd, 2003), chez le bourdon *Bombus terrestris* (Baer & Schmidt-Hempel, 1999) et chez la fourmi *Acromyrmex echinator* (Hugues & Boomsma, 2004, 2005) ont démontré que l'accroissement de la diversité génétique engendrée par la polyandrie augmente la résistance aux parasites et/ou aux pathogènes. Ce phénomène pourrait jouer un rôle important chez *C. cursor* qui se nourrit de cadavres d'arthropodes où se développent bactéries et autres pathogènes. Deuxièmement, les ouvrières de *C. cursor* ont conservé la capacité de pondre des oeufs non fertilisés qui se développeront en mâles, par parthénogenèse arrhénotoque, et en femelles, par parthénogenèse thélytoque, et peuvent par conséquent accroître leur succès reproductif en participant à la production de sexués. Si le succès reproductif d'une ouvrière est toujours optimisé par la production de ses propres fils ($r=0.50$), le degré de parenté entre une ouvrière et ses neveux (les mâles issus des autres ouvrières) dépend, lui, du nombre d'accouplements de la reine. En situation de polyandrie, les ouvrières sont plus apparentées à leurs frères qu'à leurs neveux, ce qui devrait conduire à l'évolution d'un comportement de "police" des ouvrières, par lequel ces dernières éliminent tout oeuf pondu par une congénère (*worker-policing*; Ratnieks & Visscher, 1989; Foster & Ratnieks, 2000, 2001), ou d'auto-restrainte (*self restrain*; Ratnieks, 1988; Frank, 1995; Hammond & Keller 2004). L'absence de reproduction chez les ouvrières est d'autant plus pertinente chez une espèce où les sociétés sont d'effectif réduit, car l'existence de quelques pondeuses peut avoir un impact immédiat sur la productivité globale des sociétés (Hartmann *et al.*, 2003). La polyandrie pourrait donc avoir été sélectionnée pour limiter les conflits sociaux

opposant reines et ouvrières quant à la maternité des sexués.

Conformément aux prédictions de la police des ouvrières ou de l'auto-restrainte, nos observations indiquent que les ouvrières ne se reproduisent pas en présence de la reine. Le maintien au cours de l'évolution de la capacité des ouvrières à produire une descendance mâle et femelle trouve sa valeur adaptative dans la possibilité pour les ouvrières de remplacer la reine si cette dernière venait à disparaître. Un modèle mathématique liant le taux de transition vers l'homozygotie à la proportion de reines issues de la reproduction des ouvrières révèle que plus de 60% des sociétés comportent une reine issue de la reproduction des ouvrières. Cette proportion est extrêmement élevée et suggère que la longévité des reines devrait être réduite. Les expériences de Cagniant (1980) sur les sociétés orphelines montrent que, en l'absence de la reine, les ouvrières produisent des sexués mâles et femelles. Une hypothèse est que les mâles s'accouplent avec les femelles au sein du nid. Les ouvrières pourraient alors remplacer la reine à n'importe quelle période de l'année. Néanmoins, ce scénario semble peu probable, parce que les nids orphelins ne produisent des sexués qu'à la sortie de l'hibernation; l'été, le couvain diploïde se développe en ouvrières, comme dans les sociétés qui possèdent une reine (Cagniant, 1979; pers. obs.). Une autre hypothèse est que la cohabitation de plusieurs jeunes sexuées au printemps entraîne une intense compétition pour l'accès à la reproduction. Chez *C. cursor*, les fondations indépendantes n'ont jamais été rapportées, le bourgeonnement est le seul mode de fondation connu. Comme les sociétés sont petites, il est probable que seul un nombre très restreint de jeunes femelles sexuées accède finalement au statut de reine. Cette compétition pourrait être à l'origine de l'absence de vol nuptial chez cette espèce. En effet, les reproductrices augmenteraient les chances de retrouver leur nid d'origine

en limitant l'éloignement de ce dernier, conduisant, à terme, à l'absence de vol nuptial.

Un aspect particulier des stratégies de reproduction qui a fait l'objet de nos études est le sex-ratio de la descendance sexuée. La fondation des nouvelles colonies par bourgeonnement peut entraîner une compétition locale pour les ressources (*local resource competition*, LRC) entre femelles apparentées (Clarck, 1978), qui résulte en un biais du sex-ratio en faveur du sexe mâle. Chez les fourmis, la fondation par bourgeonnement se produit typiquement chez les espèces polygynes, où l'effet de la LRC sur le sex-ratio est souvent masqué par la diminution des asymétries de parenté au sein des sociétés. A ce titre, *C. cursor* représente un modèle biologique intéressant pour étudier l'influence des stratégies de dispersion sur le sex-ratio, car elle associe fondation des nouvelles colonies par bourgeonnement et monogynie. Nos résultats montrent que le sex-ratio chez *C. cursor* n'est pas associé aux asymétries de parenté, ni à l'abondance des ressources. En revanche, ils suggèrent que la LRC est un des déterminants principaux du sex-ratio chez cette espèce.

Perspectives

Ce travail de thèse pose peut-être plus de questions qu'il n'apporte de réponses et ouvre de multiples perspectives de recherche. Quatre de ces thèmes, permettant d'affiner notre compréhension des stratégies reproductrices de *Cataglyphis cursor*, nous semblent prioritaires.

1. Contrôle de la reproduction sexuée et asexuée

Nos travaux ont mis en évidence chez *C. cursor* une stratégie de reproduction inédite par laquelle les nouvelles reines sont issues d'une reproduction parthénogénétique, alors que les ouvrières se développent à partir d'œufs fertilisés. Cependant, l'existence de jeunes reproductrices produites par reproduction sexuée (3.6%) et

celle d'ouvrières produites par parthénogenèse (2.5%) montre que le déterminisme de la caste n'est pas d'ordre génétique. Chez *C. cursor*, les sexués mâles et femelles sont issus d'œufs pondus immédiatement à la sortie d'hibernation; les œufs pondus plus tard dans la saison se développent exclusivement en ouvrières. Deux mécanismes proximaux peuvent expliquer l'utilisation conditionnelle des deux types de reproduction sexuée et asexuée:

a. Les reines contrôlent la production d'œufs thélytoques au cours du temps. Elles ne pondraient des œufs parthénogénétiques qu'au printemps, à la période de production des sexués, après quoi les œufs pondus seraient tous fertilisés pour donner naissance à des ouvrières. Il existerait donc une variation temporelle dans la proportion d'œufs thélytoques produits par les reines.

b. Les ouvrières orienteraient le couvain femelle dans la caste sexuée ou stérile en fonction du génotype des larves. Les reines produiraient alors des œufs thélytoques en proportion relativement constante pendant toute l'année, mais les ouvrières n'élèveraient que les œufs ou larves femelles issues de la reproduction thélytoque en sexués. Les œufs haploïdes, eux, se développent en mâles adultes.

L'élevage de ces sexués est limité au printemps. L'étude de la proportion d'œufs thélytoques pondus par les reines à différentes périodes après la sortie d'hibernation permettrait donc de déterminer qui des reines ou des ouvrières contrôle l'association entre la caste et la reproduction sexuée et asexuée. De manière intéressante, l'avantage évolutif des reines et des ouvrières converge. En effet, les reines sont largement plus apparentées à leurs filles parthénogénétiques ($r = 1$) qu'à leurs filles issues d'une reproduction sexuée ($r \approx 0.5$). De même, les ouvrières sont plus apparentées à leurs soeurs parthéno-

génétiques ($r = 0.62$) qu'à leurs soeurs issues d'oeufs fertilisés ($r = 0.42$). La théorie de la sélection de la parentèle ne permet donc aucune prédiction quant à l'origine du contrôle.

2. Comportement de "police" des ouvrières

Les ouvrières de *Cataglyphis cursor* ayant conservé leurs ovaires, elles peuvent accroître leur succès reproductif en participant à la production des sexués. Comme nous l'avons expliqué ci-dessus, la polyandrie devrait conduire à l'évolution d'un comportement de "police" des ouvrières ou d'auto-restreinte. Des expériences préliminaires ont montré qu'il était possible, en laboratoire, de colorer les oeufs issus de la reproduction ouvrière (Timmermans, unpub. results). L'étude de l'élimination sélective des oeufs produits par des ouvrières devrait permettre de mettre en évidence - ou pas - un tel comportement de police des ouvrières. Une analyse complémentaire des hydrocarbures cuticulaires permettrait de distinguer d'éventuelles modifications du profil des ouvrières associées au changement de statut reproducteur.

3. Népotisme

Plusieurs travaux ont montré que le partage de la reproduction entre reines au sein des sociétés polygynes est souvent inégal (Keller & Chapuisat, 1999; Hannonen & Sundström, 2002; Seppä *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2004; Langer *et al.*, 2004). A ce jour, les travaux sur la distribution de la reproduction entre ouvrières dans les sociétés orphelines concernent essentiellement les fourmis dites "primitives" et sans reine de la sous-famille des *Ponerinae* (Heinze *et al.*, 1994; Peeters & Higashi, 1989; Monnin & Peeters, 1998, 1999; Gobin *et al.*, 2001; Peeters & Ito, 2001). La division de la reproduction ouvrière chez les fourmis dites "évoluées" reste à ce jour très peu étudiée. La raison est double: chez beaucoup d'espèces, les ouvrières sont stériles et, lorsqu'elles conservent des ovaires fonctionnels, elles ne produisent

que des mâles par parthénogenèse arrhénotoque. La polyandrie des reines et l'aptitude des ouvrières de *C. cursor* à produire des mâles (par parthénogenèse arrhénotoque) et des femelles (par parthénogenèse thélytoque) représentent une opportunité unique d'étudier la distribution de la reproduction entre ouvrières issues de lignées paternelles différentes. Une hypothèse est que la reine soit issue de la ponte d'une ouvrière appartenant à la lignée paternelle la plus largement représentée dans la société. Un tel népotisme serait à lui seul un argument exceptionnel en faveur de la théorie de la sélection de la parentèle.

4. Analyse comparative du genre *Cataglyphis*

Enfin, le genre *Cataglyphis* regroupe une centaine d'espèces distribuées dans le vieux monde, de la Mauritanie jusqu'au désert de Gobi (Agosti, 1990). On retrouve au sein de ce genre des espèces monogynes et polygynes, mais on ignore dans quelle mesure les stratégies de reproduction de *C. cursor* se retrouvent dans d'autres espèces du genre. En particulier, le nombre de reproductrices par société, leur corrélation génétique, la fréquence d'accouplement des reines et la possibilité d'un remplacement des reines (dans les systèmes monogynes) restent totalement inconnus. De plus, la parthénogenèse thélytoque et son exploitation par les reines pour la production de femelles sexuées n'ont été étudiées que chez *C. cursor*.

Les analyses préliminaires suggèrent que les marqueurs microsatellites développés pour cette espèce sont potentiellement utilisables pour déterminer la structure socio-génétique d'autres espèces appartenant au genre *Cataglyphis* (*C. fortis*, *C. velox*, *C. mauritanicus*, *C. bicolor* et *C. nodus*). Ces marqueurs permettraient ainsi de déterminer le taux de polygynie et de polyandrie chez différentes espèces, et leur influence sur la structure génétique des sociétés. Il serait également possible de déterminer si l'utilisation conditionnelle du

sexe, telle qu'elle est observée chez *C. cursor*, est un phénomène propre au genre. Ces résultats, mis en parallèle avec la phylogénie des espèces, permettraient de préciser quand la polygynie, la polyandrie et la thélytoquie sont apparues au sein du genre *Cataglyphis* et fourniraient des données solides à l'étude des pressions de sélection responsable de telles évolutions.

Références

- Agosti D. (1990). Review and reclassification of *Cataglyphis* (Hymenoptera, Formicidae). *J. Nat. Hist.* **24**: 1457-1505.
- Alexander R.D. & Sherman P.W. (1977). Local mate competition and parental investment in social insects. *Science* **196**: 494-500.
- André J.B., Peeters C. & Doums C. (2001). Serial polygyny and colony genetic structure in the monogynous queenless ant *Diacamma cyaneiventre*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **50**: 72-80.
- Aron S. & Passera L. (2000). *Les Sociétés Animales. Evolution de la Coopération et Organisation Sociale*. Editions De Boeck Université, Bruxelles.
- Aron S., Campan E., Boomsma J.J. & Passera L. (1999). Social structure and split sex ratios in the ant *Pheidole pallidula*. *Ethol. Ecol. Evol.* **11**: 209-227.
- Aron S., Passera L. & Keller L. (1994). Queen-worker conflict over sex-ratio - a comparison of primary and secondary sex-ratios in the Argentine ant, *Iridomyrmex humilis*. *J. Evol. Biol.* **7**: 403-418.
- Aron S., Vargo E.L. & Passera L. (1995). Primary and secondary sex ratios in monogyne colonies of the fire ant. *Anim. Behav.* **49**: 749-757.
- Baer B. & Schmid-Hempel P. (1999). Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. *Nature* **397**: 151-154.
- Beekman M., Komdeur J. & Ratnieks, F.L.W. (2003). Reproductive conflicts in social animals: who has power? *Trends Ecol. Evol.* **18**: 277-282.
- Bell G (1982) *The Masterpiece of Nature: the Evolution and Genetics of Sexuality*. Croom-Helm, London.
- Bernstein C. & Bernstein H. (1991). *Aging, Sex and DNA Repair*. Academic Press, San Diego.
- Beye M., Hasselmann M., Fondrk M.K., Page R.E. & Omholt S.W. (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honey bee and encodes a new SR-type protein. *Cell* **114**: 419-429.
- Bono J.M. & Herbers J.M. (2003). Proximate and ultimate control of sex ratios in *Myrmica punctiventris*. *Proc. R. Soc. London* **270**: 811-817.
- Boomsma J.J. & Ratnieks F.L.W. (1996). Paternity in eusocial Hymenoptera. *Phil. Trans. R. Soc. London, Series B* **351**: 947-975.
- Boomsma J.J., Fjerdingstad E.J. & Frydenberg J. (1999). Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leafcutter ants. *Proc. R. Soc. London, Series B* **266**: 249-254.
- Bourke A.F.G. & Franks N.R. (1995). *Social Evolution in Ants*. Princeton University Press, Princeton.
- Bourke A.F.G. (1988). Worker reproduction in the higher eusocial Hymenoptera. *Q. Rev. Biol.* **63**: 291-311
- Bourke A.F.G., Green H.A.A. & Bruford, M.W. (1997). Parentage, reproductive skew and queen turnover in a multiple-queen ant analysed with microsatellites. *Proc. R. Soc. Lond. B* **264**: 277-283.
- Bruckner D. (1978). Why are there inbreeding effects in haplodiploid systems? *Evolution* **32**: 456-458.

- Buyss B. (1990). Features of basic reproduction in drones and queens of the Cape honeybee *Apis mellifera capensis*. In: Anderson R.H. & Buyss B. (eds) *Proceedings of the International Beekeepers' Symposium: Bees and beekeeping in Southern Africa*, Posa & WPBA, Cape Town, pp 106-109
- Cagniant H. (1973). Apparition d'ouvrières a partir d'œufs pondus par des ouvrières chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonscolombe (Hymenopteres : Formicidae). *C. R. Acad. Sci. D* **277**: 2197-2198.
- Cagniant H. (1979). La parthénogénèse thélytoque et arrhénotoque chez la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonsc. (Hym. Form.). Cycle biologique en élevage des colonies avec reine et des colonies sans reine. *Insect. Soc.* **26**: 51-60.
- Cagniant H. (1980). La parthénogénèse thélytoque et arrhénotoque des ouvrières de la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonscolombe. Etude en élevage de la productivité de sociétés avec reine et de sociétés sans reine. *Insect. Soc.*, **27**: 157-174.
- Chapuisat M. & Keller L. (1999). Extended family structure in the ant *Formica paralugubris*: the role of the breeding system. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **46**: 405-412.
- Charlesworth B. & Charlesworth D. (1999). The genetic basis of inbreeding depression. *Genet. Res. Camb.* **74**: 329-340.
- Clark A.B. (1978). Sex ratio and local resource competition in a prosimian primate. *Science* **201**: 163-165.
- Cole B.J. & Wiernasz D.C. (2000) Colony size and reproduction in the western harvester ant, *Pogonomyrmex occidentalis*. *Insect. Soc.* **47**: 249-255.
- Cole B.J. (1983). Multiple mating and the evolution of social behavior in the Hymenoptera. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **12**: 191-201.
- Cook J.M. & Crozier R.H. (1995). Sex determination and population biology in the Hymenoptera. *Trends Ecol. Evol.* **10**: 281-286.
- Cremer S. & Heinze J. (2002). Adaptive production of fighter males: queens of the ant *Cardiocondyla* adjust the sex ratio under local mate competition. *Proc. R. Soc. Lond. B* **269**: 417-422.
- Crozier R.H. & Fjerdingstad E.J. (2001). Polyandry in social Hymenoptera: Disunity in diversity? *Ann. Zool. Fenn.* **38**: 267-285.
- Crozier R.H. & Page R.E. (1985). On being the right size, male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **18**: 105-115.
- Crozier R.H. & Pamilo P. (1993). Sex allocation in social insects: problems in prediction and estimation. In: Wrensch D.L. & Ebbert M.A. (eds) *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites*. Chapman and Hall, New York pp. 369-383.
- Crozier R.H. & Pamilo P. (1996). *Evolution of social insect colonies*. Oxford University Press, Oxford.
- Crozier R.H. (1985). Adaptive consequences of male haploidy. In: Helle W. & Sabelis M.W. (eds) *Spider mites: Their biology, natural enemies, and control*. Elsevier, Amsterdam pp. 201-222.
- Darwin C. (1859). *On the origin of the species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London.
- Dawkins R. (1976). *The Selfish Gene*. Oxford University Press, Oxford.

- de Menten L., Cremer S., Heinze J. & Aron S. (2005b). Primary sex ratio adjustment by ant queens in response to local mate competition. *Anim. Behav.* **69**: 1031-1035.
- de Menten L., Fournier D., Brent C., Passera L., Vargo E.L. & Aron S. (2005a). Dual mechanism of queen influence over sex ratio in the ant *Pheidole pallidula*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **58**: 527-533.
- Denny A.J., Franks N.R., Powell S. & Edwards K.J. (2004). Exceptionally high levels of multiple mating in an army ant. *Naturwissenschaften*, **91**: 396-399.
- Deslippe R.J. & Savolainen R. (1994). Role of food supply in structuring a population of *Formica* ants. *J. Anim. Ecol.* **63**: 756-764.
- Deslippe R.J. & Savolainen R. (1995). Sex investment in a social insect: the proximate role of food. *Ecology* **76**: 375-382.
- Dugatkin L.A. (1997). Winner effects, loser effects and the structure of dominance hierarchies. *Behav. Ecol.* **8**: 583-587.
- Evans J.D. (1996) Queen longevity, queen adoption, and posthumous indirect fitness in the facultatively polygynous ant *Myrmica tahoensis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **39**: 275-284.
- Fischer R.A. (1930). *The Genetical Theory Of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.
- Fjerdingstad E.J. & Boomsma J.J. (1997). Variation in size and sperm content of sexuals in the leafcutter ant *Atta colombica*. *Insect. Soc.* **44**: 209-218.
- Fjerdingstad E.J. & Boomsma J.J. (1998). Multiple mating increases the sperm stores of *Atta colombica* leafcutter ant queens. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **42**: 257-261.
- Foitzik S. & Heinze J. (1998). Nest site limitation and colony take-over in the ant *Leptothorax nylanderii*. *Behav. Ecol.* **9**: 367-375.
- Foster K.R. & Ratnieks F.L.W. (2000). Facultative worker policing in a wasp. *Nature* **407**: 692-693.
- Foster K.R. & Ratnieks F.L.W. (2001). Convergent evolution of worker policing by egg eating in the honeybee and common wasp. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **268**: 169-174.
- Fournier D., Aron S. & Keller L. (2004). Significant reproductive skew in the facultatively polygynous ant *Pheidole pallidula*. *Mol. Ecol.* **13**: 203-210.
- Fournier D., Estoup A., Orivel J., Foucaud J., Jourdan H., Le Breton J. & Keller L. (2005). Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. *Nature*, **435**: 1230-1234.
- Fournier D., Keller L., Passera L. & Aron S. (2003). Colony sex ratios vary with breeding system but not relatedness asymmetry in the facultatively polygynous ant *Pheidole pallidula*. *Evolution* **57**: 1336-1342.
- Franck P., Coussy H., Le C.Y., Solignac M., Garnery L. & Cornuet J.M. (1999). Microsatellite analysis of sperm admixture in honeybee. *Insect. Mol. Biol.* **8**: 419-421.
- Frank S.A. (1987). Individual and population sex allocation patterns. *Theor. Popul. Biol.* **31**: 47-74.
- Frank S.A. (1995). Mutual policing and the repression of competition in the evolution of cooperative groups. *Nature* **377**: 520-522.
- Gadagkar R. & Bonner J.T. (1994). Social insects and social amoebae. *J Biosciences (Bangalore)* **19**: 219-245.

- Gadagkar R., Chandrashekara K., Chandran S. & Bhagavan S. (1993). Queen success is correlated with worker-brood genetic relatedness in a primitively eusocial wasp (*Ropalidia marginata*). *Experientia* **49**: 714-717
- Ghiselin M.T. (1974). *The economy of nature and the evolution of sex*. University of California Press, Berkeley.
- Gobin B., Billen J. & Peeters C. (2001). Dominance interactions regulate worker mating in the polygynous ponerine ant *Gnamptogenys menadensis*. *Ethology* **107**: 495-508.
- Grasso D.A.T., Wenseleers T., Mori A., Le Moli F. & Billen J. (2000). Thelytokous worker reproduction and lack of *Wolbachia* infection in the harvesting ant *Messor capitatus*. *Ethol. Ecol. Evol.* **12**: 309-314.
- Greeff J.M. (1996). Effects of thelytokous worker reproduction on kin selection and conflict in the Cape honeybee, *Apis mellifera capensis*. *Phil. Trans. R. Soc. London B* **351**: 617-625.
- Haberl M. & Tautz D. (1998). Sperm usage in honey bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **423**: 247-255.
- Hamilton W.D. (1964a). The genetical evolution of social behavior I. *J. Theor. Biol.* **7**: 1-16.
- Hamilton W.D. (1964b). The genetical evolution of social behavior II. *J. Theor. Biol.* **7**: 17-52.
- Hamilton W.D. (1987) Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraints of social evolution. In: Ito Y., Brown J.L. & Kikkawa J. (eds) *Animal societies: theory and facts*. Japanese Scientific Society, Tokyo pp. 81-102.
- Hamilton W.D., Axelrod R. & Tanese, R. (1990). Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (A review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3566-3573.
- Hamilton, W.D. (1967). Extraordinary sex ratios. *Science* **156**: 477-488.
- Hammond R.L. & Keller L. (2004). Conflict over male parentage in social insects. *PLoS Biol.* **2**(9): e248.
- Hannonen M. & Sundström L. (2002). Proximate determinants of reproductive skew in polygyne colonies of the ant *Formica fusca*. *Ethology* **108**: 961-973.
- Harbo J.R. (1990). Artificial mixing of spermatozoa from honeybees and evidence for sperm competition. *J. Apic. Res.* **29**(3): 151-158.
- Hartmann A., Wantia J., Torres J.A. & Heinze J. (2003). Worker policing without genetic conflicts in a clonal ant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 12836-12840.
- Hasegawa E. & Yamaguchi T. (1995). Population structure, local mate competition, and sex allocation pattern in the ant *Messor aciculatus*. *Evolution* **49**: 260-265.
- Heinze J., Hölldobler B. & Peeters C. (1994). Conflict and cooperation in ant societies. *Naturwissenschaften*, **81**: 489-497.
- Heinze J.B. & Hölldobler B. (1995). Thelytokous parthenogenesis and dominance hierarchies in the ponerine ant *Plathytyrea punctata*. *Naturwissenschaften* **82**: 40-41.
- Herbers J.M. & Banschbach V.S. (1998). Variable food supply and reproductive allocation in forest ants: repeated experiments give different results. *Oikos* **83**: 145-151.
- Herbers J.M. (1986). Effects of ecological parameters on queen number in *Leptothorax longispinosus* (Hymenoptera:

- Formicidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* **59**: 675-686.
- Herbers J.M. (1989). Community structure in north temperate ants: temporal and spatial variation. *Oecologia* **81**: 201-211.
- Hölldobler B. & Wilson E.O. (1977). The number of queens: an important trait in ant evolution. *Naturwissenschaften* **64**: 8-15.
- Hölldobler B. & Wilson E.O. (1990). *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge.
- Hughes W.O.H. & Boomsma J.J. (2004). Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. *Evolution* **58**: 1251-1260.
- Hughes W.O.H. & Boomsma J.J. (2005). Does genetic diversity hinder parasite evolution in social insect colonies? *J. Evol. Biol.* in press.
- Hung A.C.F., Vinson S.B. & Summerlin J.W. (1974). Male sterility in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **67**: 909-912.
- Itow T., Kobayashi K., Kubota M., Ogata K., Imai H.T. & Crozier R.H. (1984). The reproductive cycle of the queenless ant *Pristomyrmex pungens*. *Insect. Soc.* **31**: 87-102.
- Janet C. (1907). Histolyse, sans phagocytose, des muscles vibrateurs du vol, chez les reines des fourmis. *C. R. Acad. Sci.* **144**: 393-396.
- Julian G. & Cahan S. (1999) Undertaking specialization in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor*. *Anim. Behav.* **58**: 437-442.
- Kannowski P.B. (1959). The flight activities and colony-founding behavior of bog ants in southeastern Michigan. *Insect. Soc.* **6**: 115-162.
- Keller L. & Chapuisat M. (1999). Cooperation among selfish individuals in insect societies. *BioSciences* **49**: 899-909.
- Keller L. & Reeve H.K. (1995). Why do females mate multiply? The sexually selected sperm hypothesis. *Adv. Study Behav.* **24**: 291-315.
- Keller L. (1991). Queen number, mode of colony founding, and queen reproductive success in ants (Hymenoptera: Formicidae). *Ethol. Ecol. Evol.* **3**: 307-316.
- Keller L.F. & Waller D.M. (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* **17**: 230-241.
- Kinomura K. & Yamauchi K. (1987). Fighting and mating behaviors of dimorphic males in the ant *Cardiocondyla wroughtoni*. *J. Ethol.* **5**: 75-81.
- Koeniger N., Hemmling C. & Yoshida T. (1989). Drones as sons of drones in *Apis mellifera*. *Apidologie* **20**: 391-394.
- Kraus F.B., Neumann P., van Praagh J. & Moritz R.F.A. (2004). Sperm limitation and the evolution of extreme polyandry in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **55**: 494-501.
- Krieger M.J.B., Ross K.G., Chang C.W. & Keller L. (1999). Frequency and origin of triploidy in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Heredity* **82**: 142-150.
- Kronauer D.J.C., Schöning C., Pedersen J.S., Boomsma J.J. & Gadau J. (2004). Extreme queen mating frequency and colony fission in African army ants. *Mol. Ecol.*, **13**: 2381-2388.
- Langer P., Hogendoorn K. & Keller L. (2004). Tug-of-war over reproduction in a social bee. *Nature* **428**: 844-847.
- Lenoir A., Quérard L., Pondicq N. & Berton F. (1988). Reproduction and dispersal of

- the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera Formicidae). *Psyche* **95**: 21-44.
- Maynard Smith J. (1978). *The Evolution of Sex*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Maynard Smith, J. (1989). *Evolutionary Genetics*. Oxford University Press, Oxford.
- Milio J., Lofgren C.S. & Williams D.F. (1988). Nuptial flight studies of field-collected colonies of *Solenopsis invicta* Buren. In: Trager J.C. (ed) *Advances in Myrmecology*. Brill, New York pp. 419-431.
- Monnin T. & Peeters C. (1998). Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadriceps*. *Anim. Behav.* **55**: 299-306.
- Monnin T. & Peeters C. (1999). Dominance hierarchy and reproductive conflicts among subordinates in a monogynous queenless ant. *Behav. Ecol.* **10**: 323-332.
- Morales M.A. & Heithaus E.R. (1998). Food from seed-dispersal mutualism shifts sex ratios in colonies of the ant, *Aphaenogaster rudis*. *Ecology* **79**: 734-739.
- Moritz R.F.A. (1985). The effects of multiple mating on the worker-queen conflict in *Apis mellifera*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **16**: 375-378.
- Moritz R.F.A., Kryger P., Koeniger G., Koeniger N., Estoup A. & Tingek S. (1995). High degree of polyandry in *Apis dorsata* queens detected by DNA microsatellite variability. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **37**: 357-363.
- Morrill W.L. (1974). Production and flight of alate red imported fire ants. *Environ. Entomol.* **3**: 265-271.
- Müller H.J. (1932). Some genetic aspects of sex. *Am. Nat.* **66**: 118-138.
- Müller H.J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* **1**: 2-9.
- Murakami T., Higashi S. & Windsor D. (2000). Mating frequency colony size polyethism and sex ratio in fungus-growing ants (*Attini*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **48**: 276-284.
- Niklasson M., Parker E.D.J. (1994). Fitness variation in an invading parthenogenetic cockroach. *Oikos* **71**: 47-54.
- Nonacs P. (1986). Ant reproductive strategies and sex allocation theory. *Q. Rev. Biol.* **61**: 1-21.
- Normark B.B. (2003). The evolution of alternative genetic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **48**: 397-423.
- Page R.E. Jr. (1986). Sperm utilization in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* **31**: 297-320.
- Palmer K.A., Oldroyd B.P. (2003). Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. *Naturwissenschaften* **90**: 265-268.
- Pamilo P. (1991). Life span of queens in the ant *Formica exsecta*. *Insect. Soc.* **38**: 111-119
- Pamilo P., Sundström L., Fortelius W. & Rosengren R. (1994). Diploid males and colony level selection in *Formica* ants. *Ethol. Ecol. Evol.* **6**: 221-235.
- Passera L. & Aron S. (2005) *Les Fourmis – Comportement, Organisation Sociale, Evolution*. Presses Scientifiques du CNRC, Ottawa.
- Passera L. & Keller L. (1990). Loss of mating flight and shift in the pattern of carbohydrate storage in sexuals of ants

- (Hymenoptera, Formicidae). *J. Comp. Physiol. B.* **160**: 207-211.
- Passera L., Aron S., Vargo E.L. & Keller, L. (2001). Queen control of sex ratio in fire ants. *Science* **293**: 1308-1310.
- Peeters C. & Higashi S. (1989). Reproductive dominance controlled by mutilation in the queenless ant *Diacamma australe*. *Naturwissenschaften* **76**: 177-180.
- Peeters C. & Ito F. (2001). Colony dispersal and the evolution of queen morphology in social Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **46**: 601-630.
- Peeters C. & Ito F. (2001). Colony dispersal and the evolution of queen morphology in social Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **46**: 601-630.
- Queller D.C., Strassmann J.E. & Hughes C.R. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol.* **8**: 285-288.
- Ratnieks F.L.W. & Visscher P.K. (1989). Worker policing in honeybees. *Nature* **342**: 796-797.
- Ratnieks F.L.W. (1988). Reproductive harmony via mutual policing by workers in eusocial Hymenoptera. *Am. Nat.* **132**: 217-236.
- Ratnieks F.L.W. (1990). The evolution of polyandry by highly eusocial bee queens: The importance of progressive versus mass provisioning and the timing of removal of diploid males. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **26**: 342-348.
- Reeve H.K. & Sherman P.W. (1991). Intra-colonial aggression and nepotism by the breeding female naked mole-rat. In: Sherman P.W., Jarvis J.U.M. & Alexander R.D. (eds) *The Biology of the Naked Mole-Rat*. Princeton University Press, Princeton.
- Rinderer T., Collins M. & Pesante D. (1985). A comparison of Africanized and European drones: weight, mucus gland and seminal vesicle weights, and count of spermatozoa. *Apidologie* **16**: 407-412.
- Roff D.A. (2002). Inbreeding depression: Tests of the overdominance and partial dominance hypotheses. *Evolution* **56**: 768-775.
- Rosenheim J.A., Nonacs P. & Mangel M. (1996). Sex ratios and multifaceted parental investment. *Am. Nat.* **148**: 501-535.
- Ross K.G. & Fletcher D.J.C. (1986). Diploid male production - a significant colony mortality factor in the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **19**: 283-291.
- Ross K.G. & Keller L. (1998). Genetic control of social organization in an ant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14232-14237.
- Ross K.G. (1997). Multilocus evolution in fire ants: Effects of selection, gene flow and recombination. *Genetics* **145**: 961-974.
- Rössler Y. & DeBach P. (1973). The biosystematic relations between a thelytokous and arrhenotokous form of *Aphytis mytilaspidis*. I. The reproductive relations. *Entomophaga* **17**: 391-423.
- Sasaki K., Satoh T. & Obara Y. (1995). Sperm utilization by honey bee queens: DNA fingerprinting analysis. *Appl. Entomol. Zool.* **30**: 335-341.
- Schilder K., Heinze J., Gross R., Hölldobler B. (1999). Microsatellites reveal clonal structure of populations of the thelytokous ant *Platythyrea punctata* (F. Smith) (Hymenoptera; Formicidae). *Mol. Ecol.* **8**: 1497-1507.
- Seppa P. (1994). Sociogenetic organization of the ants *Myrmica ruginodis* and *Myrmica lobicornis* : number, relatedness and longevity of reproducing individuals. *J. Evol. Biol.* **7**: 71-95.

- Seppä P., Queller D.C. & Strassmann J.E. (2002). Reproduction in foundress associations of the social wasp, *Polistes carolina*: conventions, competition, and skew. *Behav. Ecol.* **13**: 531-542.
- Sherman P.W., Seeley T.D. & Reeve H.K. (1988). Parasites, pathogens, and polyandry in social Hymenoptera. *Am. Nat.* **131**: 602-610.
- Simon J.-C., Delmotte F., Rispe C. & Crease T. (2003). Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biol. J. Linn. Soc.* **79**: 151-163.
- Snyder L.E. (1992). The genetics of social behavior in a polygynous ant. *Naturwissenschaften* **79**: 525-527.
- Snyder L.E. (1993). Non-random behavioural interactions among genetic subgroups in a polygynous ant. *Anim. Behav.* **46**: 431-439.
- Starr C.K. (1984). Sperm competition, kinship and sociality in the aculeate Hymenoptera. In: Smith R.L. (ed) *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. Academic Press, Orlando.
- Stenseth N.C., Kirkendall L.R. & Moran N. (1985). On the evolution of pseudogamy. *Evolution* **39**: 294-307.
- Strassmann J.E. (2001). The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insect. Soc.*, **48**: 1-13.
- Stuart R.J., Francoeur A. & Loiselle R. (1987). Lethal fighting among dimorphic males of the ant, *Cardiocondyla wroughtonii*. *Naturwissenschaften* **74**: 548-549.
- Sundström L. & Ratnieks F.L.W. (1998). Sex ratio conflicts, mating frequency and queen fitness in *Formica* ants. *Behav. Ecol.* **9**(2): 116-122.
- Sundström L., (1994). Sex ratio bias, relatedness asymmetry and queen mating frequency in ants. *Nature* **367**:266-268.
- Sundstrom L., Chapuisat M. & Keller L. (1996). Conditional manipulation of sex ratios by ant workers: a test of kin selection theory. *Science* **274**: 993-995.
- Suomalainen E. (1950). Parthenogenesis in animals. *Adv. Genetics* **3**: 193-253.
- Suomalainen E., Saura A. & Lokki J. (1987). *Cytology and evolution in parthenogenesis*. CRC Press Inc., Boca Raton.
- Tarpy D.R. & Page R.E. Jr. (2001). The curious promiscuity of queen honey bees (*Apis mellifera*): evolutionary and behavioral mechanisms. *Ann. Zool. Fenn.* **38**: 255-265.
- Thomsen M. (1927). Studien über die Parthenogenese bei einigen Cocciden und Aleurodiden. *Zschr. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **5**: 1-116.
- Thornhill R. & Alcock J. (1983). *The Evolution of insect mating systems*. Harvard University, Cambridge.
- Trivers R.L. & Hare H. (1976). Haplodiploidy and the evolution of social insects. *Science* **191**: 249-263.
- Tsuji K. & Yamauchi K. (1995). Production of females by parthenogenesis in the ant *Cerapachys biroi*. *Insect. Soc.* **42**: 333-336.
- Ulloa-Chacon P. & Cherix D. (1988). Quelques aspects de la biologie de *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera, Formicidae). *Actes Colloq. Insect. Soc.* **4**: 177-184.
- Vahed K. (1998). The function of nuptial feeding in insects - review of empirical studies. *Biol. Rev.* **73**: 43-78.
- van Valen L.M. (1973). A new evolutionary law. *Evol. Theor.* **1**: 1-30.

- Verma S. & Ruttner F. (1983). Cytological analysis of the thelytokous parthenogenesis in the cape honeybee (*Apis mellifera capensis* Escholtz). *Apidologie* **14**: 41-57.
- Walsh L. & Seppä P. (2001). Resource allocation in the red ant *Myrmica ruginodis* - an interplay of genetics and ecology. *J. Evol. Biol.* **14**: 694-707.
- Weismann A. (1876-1879). Beitrage zur Naturgeschichte der Daphnoiden. *Z. Wiss. Zool. Vols.* 27-33.
- Werren, J. H. 1993. The evolution of inbreeding in haplodiploid organisms In: Thornhill N.W. (ed) *The natural history of inbreeding and outbreeding*. University of Chicago Press, Chicago pp. 42-49.
- White M.J.D. (1973). *Animal Cytology and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wiernasz D.C. & Cole B.J. (1995). Spatial distribution of *Pogonomyrmex occidentalis*: recruitment, mortality and overdispersion. *J. Anim. Ecol.* **64**: 519-527.
- Williams G.C. (1966). *Adaptation and natural selection*. Princeton University Press, Princeton.
- Wilson E.O. (1975). *Sociobiology: The New Synthesis*. Harvard University Press: Cambridge.
- Winkler H. (1920). *Verbreitung und Ursache der Parthenogenesis im Pflanzen- und Tierreiche*. Fischer, Jena.
- Woyciechowski M. & Lomnicki A. (1987). Multiple mating of queens and the sterility of workers among eusocial Hymenoptera. *J. Theor. Biol.* **128**: 317-327.
- Woyke J. (1962). Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World* **43**: 21-25.
- Zeyl C. & Bell G. (1997). The advantage of sex in evolving yeast populations. *Nature* **388**: 465-468.