

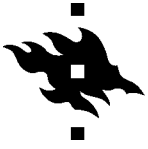
# Levittäytyminen ja aggressio kaljuloviniskan (*Formica pressilabris*) superkoloniassa



**Mats Ittonen**

Pro gradu -tutkielma  
Lokakuu 2017

Ekologia ja evoluutiobiologia  
Biotieteiden laitos  
Helsingin yliopisto



HELSINGIN YLIOPISTO  
HELSINGFORS UNIVERSITET  
UNIVERSITY OF HELSINKI

|   |  |                                   |   |
|---|--|-----------------------------------|---|
| Tiedekunta – Fakultet – Faculty                               |  | Laitos – Institution – Department |   |
| Tekijä – Författare – Author                                  |  |                                   |   |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title                            |  |                                   |   |
| Oppiaine – Läroämne – Subject                                 |  |                                   |   |
| Työn laji – Arbetets art – Level                              |  | Aika – Datum – Month and year     | Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract                              |  |                                   |   |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords                             |  |                                   |   |
| Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors |  |                                   |   |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited            |  |                                   |   |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information     |  |                                   |   |



|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
| Tiedekunta – Fakultet – Faculty<br>Faculty of Biological and Environmental Sciences  |  | Laitos – Institution – Department<br>Department of Biosciences |  |
| Tekijä – Författare – Author<br>Mats Ittonen   |  |  |  |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title<br>Dispersal and aggression in a supercolony of the ant <i>Formica pressilabris</i>   |  |  |  |
| Oppiaine – Läroämne – Subject<br>Ecology and evolutionary biology  |  |  |  |
| Työn laji – Arbetets art – Level<br>Master's thesis  |  | Aika – Datum – Month and year<br>October 2017                  | Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages<br>52 + appendix (8 pages) |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract<br><p>Because of their eusociality and diverse adaptations, ants are classic study objects in evolutionary biology. Supercolonies consisting of numerous nests have recently received much attention. Supercoloniality is an ecologically dominant and successful lifestyle, but it may be an evolutionary dead end. A supercolony has extremely many queens, and relatedness between colony members is thus very low. Inclusive fitness theory predicts selfish traits to spread in such low relatedness colonies, and if relatedness is zero, kin selection cannot act on worker traits. In such situations eusociality cannot persist.</p> <p>Dispersal is dangerous to daughter queens, and only a small fraction succeeds in establishing new nests. When relatedness between daughter queens and the rest of a colony is high, kin selection will, however, favor dispersal, because competition against relatives does not benefit daughter queens. But when relatedness is low, daughter queens may maximize their inclusive fitness by staying in their natal colony, although dispersal would be the collective interest of the colony. Non-dispersing by daughter queens is thus selfish behavior and is expected in low relatedness colonies.</p> <p>I studied dispersal between a large nest aggregation and other smaller colonies of the ant <i>Formica pressilabris</i> in Raseborg, Southern Finland. I found a supercolony-like dense aggregation of more than 1 300 nests on a 9 ha large abandoned field, as well as three other nest aggregations a few hundreds of meters away from the assumed supercolony. I studied dispersal between these subpopulations indirectly by estimating gene flow using microsatellite DNA markers. I extracted DNA from 285 nests and studied ten microsatellite loci. In addition to the population genetic study, I performed behavioral experiments, on one hand to determine whether supercolony workers identify intruders at all, and on the other hand to investigate whether the large nest aggregation actually is one supercolony.</p> <p>My results show limited gene flow between the four subpopulations. The two largest subpopulations are viscous, i.e. neighboring nests are genetically more similar to each other than to more distant nests in the same subpopulation. However, my results do not support my hypothesis that supercolony daughter queens disperse less than daughter queens from other colonies in the area. One explanation for this result is that non-dispersal of daughter queens does not show up in microsatellite studies. This might be the case if there is enough male dispersal to even out the gene flow between subpopulations. Another possible explanation is that dispersal is limited from all of the subpopulations, which all seem to be polydomous. Thirdly, it may be that even supercolony daughter queens disperse, which would be against my hypothesis. This possibility is supported by the weakness of the population structuring. These three alternatives are mutually nonexclusive and may all affect my results.</p> <p>In my behavioral experiments I found aggression between nests of the nest aggregation assumed to be a supercolony. Thus, it is not a uniform supercolony, as ants of a colony are by definition not aggressive towards each other. This result is surprising, and such a supercolony-like nest aggregation with aggression between its nests has not been reported earlier. If the nest aggregation actually consists of many smaller polydomous colonies, the result from my population genetic study, which is against my <i>a priori</i> hypothesis, would be expected. My results underline that sufficient attention should be paid to the interactions between individual nests when studying supercolonies.</p> |  |  |  |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords<br>Formicidae, kin selection, supercolony, dispersal, aggression, microsatellites, genotyping, population genetics   |  |  |  |
| Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors<br>Heikki Helanterä, Perttu Seppä and Sanja Hakala   |  |  |  |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited<br>Viikki Campus Library  |  |  |  |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information  |  |  |  |

# Sisältö

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Johdanto</b> .....   | <b>2</b>  |
| 1.1 Aitososiaalisuus ja kokonaiskelpoisuus.....                                     | 2         |
| 1.2 Muurahaisten elinkierto ja yhteiskunnan rakenne.....                            | 5         |
| 1.2.1 Superkoloniaalisuus.....  | 7         |
| 1.3 Muurahaisten levittäytyminen.....   | 9         |
| 1.4 Yhteiskunnan jäsenten tunnistaminen ja aggressiivisuus vieraita kohtaan.....    | 11        |
| 1.5 Tutkimuskysymykset.....   | 13        |
| <b>2 Aineisto ja menetelmät</b> .....   | <b>14</b> |
| 2.1 Tutkimuslaji.....   | 14        |
| 2.2 Populaation geneettisen rakenteen selvittäminen.....                            | 14        |
| 2.2.1 Superkolonian ja sen lähiympäristön kartoitus sekä näytteiden kerääminen..... | 14        |
| 2.2.2 Pesien genotyyppitys.....   | 16        |
| 2.2.3 Tulosten analysointi.....   | 17        |
| 2.3 Käyttäytymiskokeet.....   | 18        |
| 2.3.1 Kokeiden suoritus ja kuvaaminen.....  | 18        |
| 2.3.2 Käyttäytymisen arviointi.....   | 21        |
| 2.3.3 Tulosten tilastollinen analysointi.....                                       | 21        |
| <b>3 Tulokset</b> .....   | <b>23</b> |
| 3.1 Populaation kartoitus.....  | 23        |
| 3.2 Geneettinen aineisto.....   | 23        |
| 3.3 Käyttäytymiskokeet.....   | 28        |
| <b>4 Tulosten tarkastelu</b> .....  | <b>31</b> |
| 4.1 Populaation kartoitus.....  | 31        |
| 4.2 Geneettinen viskositeetti ja populaation rakenne.....                           | 32        |
| 4.3 Särkkilen ei ole suljettu populaatio.....                                       | 34        |
| 4.4 Mikrosatelliittiaineiston luotettavuus.....                                     | 38        |
| 4.5 Yllättävää aggressiota oletetussa superkoloniassa.....                          | 39        |
| 4.6 Monipesäisyys ekologisena ja evolutiivisena strategiana.....                    | 44        |
| <b>5 Johtopäätökset</b> .....   | <b>46</b> |
| <b>6 Kiitokset</b> .....  | <b>47</b> |
| <b>7 Kirjallisuus</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>Liite</b> .....  | <b>53</b> |

# 1 Johdanto

Yhteiskuntapistiäisten yhteistyökäyttäytyminen on kiehtonut ja hämmästyttänyt luonnontutkijoita aina Darwinista (1859) lähtien. Kaikki muurahaiset sekä osa ampiaisista ja mehiläisistä elävät yhteiskunnittain. Yhteiskunta koostuu yhdestä tai useasta kuningattaresta, parittelun jälkeen kuolevista koiraista (kuhnureista) sekä pääosin lisääntymiskyvyttömistä työläisistä, jotka huolehtivat mm. pesän rakentamisesta ja puolustamisesta sekä ravinnon hankkimisesta (Douwes ym. 2012: 33–36). Aitososiaalinen elämäntapa herättää useita evoluutiobiologisia kysymyksiä, ja nykyään varsinkin isoja ja monivuotisia yhteiskuntia muodostavat muurahaiset (Formicidae) ja kesymehiläiset (*Apis mellifera*) ovat paljon tutkittuja evoluutiobiologian mallieliöitä.

## 1.1 Aitososialisuus ja kokonaiskelpoisuus

Pitkään yleisesti käytetyn määritelmän mukaan aitososiaalisia ovat ryhmät, joissa jälkeläisiä hoidetaan yhteistyössä muiden saman lajin yksilöiden kanssa, osa yksilöistä erikoistuu lisääntymiseen ja osa lisääntyjien auttamiseen sekä on samanaikaisesti läsnä ainakin kaksi aikuista sukupolvea (Wilson 1971: 4). Perinteisesti aitososiaalisina on pidetty kaikkia muurahaisia (Hymenoptera: Formicidae) ja termiittejä (Blattodea: Isoptera) sekä osaa ampiaisista (Hymenoptera: Vespidae) ja mehiläisistä (Hymenoptera: Apidae) (Wilson 1971), mutta määritelmä täyttyy muissakin eläinryhmissä hyönteisistä pistoolirapuihin ja nisäkkäisiin (Jarvis 1981, Crespi 1992, Kent & Simpson 1992, Moran 1993, Duffy 1996). Koska määritelmä on laava, se on myöhemmin herättänyt runsaasti keskustelua (esim. Costa & Fitzgerald 2005, Lacey & Sherman 2005).

Crespi ja Yanega (1995) jakavat aitososiaalisuuden ehdottomaan ja ehdolliseen. Ensin mainitussa erikoistunut työläis- tai sotilaskasti ei pysty lisääntymään, eikä kuningatar kykene suorittamaan työläistehtäviä. Ehdollisessa aitososiaalisuudessa taas erikastit eivät ole erilaistuneet morfologisesti, ja auttajat saattavat jossakin elämänsä vaiheessa lisääntyä. Ehdotonta aitososiaalisuutta on yhteiskuntapistiäisten ja termiittien lisäksi ainakin kirvoissa (Aphididae) (Itô 1989) ja ripsiäisissä (Thysanoptera) (Crespi 1992). Boomsman ja Gawnen (2017) mukaan nimenomaan ehdoton aitososiaalisuus

on peruuttamaton evolutiivinen siirtymä kohti monimutkaisempaa yksilöyttä. Aitososiaalista yhteiskuntaa on verrattu monisoluisen eliön yksilöön, sillä yhteiskuntakin on lisääntyvä yksikkö, eivätkä muurahaisyksilöt lisäänty ilman yhteiskuntaa (Wheeler 1911, Boomsma & Gawne 2017).

Ehdottoman aitososiaalisille eläimille on ominaista altruismi eli käyttäytyminen, jossa yksilö edesauttaa jonkin muun yksilön lisääntymistä tavalla, joka vähentää auttajan omaa koko elinajan lisääntymistä (West ym. 2007). Esimerkiksi muurahaispesässä voi olla tuhansia lisääntymättömiä työläisyksilöitä hoitamassa vain yhden munivan kuningattaren jälkeläisiä (Hölldobler & Wilson 1990: 160–164, 210). Lisääntymiskyvyttömät työläiset on välillä nähty ongelmana luonnonvalinnan teorian kannalta, koska luonnonvalinta suosii mahdollisimman tehokkaita lisääntyjiä, joiden jälkeläiset perivät hyvän lisääntymiskyvyn. Näin työläisten lisääntymättömyyden ei pitäisi voida syntyä ja yleistyä. Darwin (1859: 235–242) piti lisäksi erityisenä ongelmana sitä, että lisääntymiskyvyttömät työläiset usein ovat erilaistuneet morfologisesti erilaisiksi kasteiksi, eikä työläisten ominaisuuksia ole ollenkaan lisääntyvillä yksilöillä, joihin luonnonvalinta vaikuttaa. Darwin (1859: 235–242) kuitenkin arveli, että lisääntymiskyvyttömänkin työläisen ominaisuudet voivat yleistyä emoon eli kuningattareen kohdistuvan luonnonvalinnan myötä, jos työläinen on riittävästi hyödyksi yhteiskunnalle.

Lopulta Hamilton (1963, 1964a) osoitti matemaattisesti, että luonnonvalinta todella voi suosia altruismia ja vaikuttaa lisääntymättömien työläisten ominaisuuksiin. Hamiltonin sääntönä tunnetun yhtälön mukaan luonnonvalinta voi suosia altruismia, jos altruistisen käyttäytymisen yksilölle itselleen aiheuttama haitta on pienempi kuin toisen yksilön saama hyöty kerrottuna yksilöiden välisellä sukulaisuudella. Sukulaisuus tarkoittaa todennäköisyyttä sille, että kaksi yksilöä on perinyt saman alleelin yhteisiltä esivanhemmiltaan (Bourke 2011: 28–73). Aitososiaalisten hyönteisten tapauksessa altruismin tuoma haitta on työläisen oman lisääntymispotentiaalin menettäminen ja hyöty on auttamisen tuoma lisä kuningattaren lisääntymiseen. Koska työläisellä ja kuningattarella on enemmän yhteisiä alleeleja kuin saman populaation satunnaisilla yksilöillä, siirtää työläinen omia alleelejaan seuraavaan sukupolveen kuningattarta auttamalla. Näin myös altruismia koodaavat alleelit yleistyvät populaatiossa (Hamilton 1964b). Näin sukulaisvalinta vaikuttaa yksilön kokonaiskelpoisuuteen epäsuorasti lähisukulais-ten kelpoisuuden kautta.

Boomsman (2009) mukaan ehdottoman aitososiaalisuuden kehittymisen on mahdollistanut koko elämän kestävä yksiavioisuus, jonka ansiosta auttajan sisarukset ovat diploideilla eliöillä yhtä paljon sukua auttajalle kuin auttajan jälkeläiset. Tällaisessa tilanteessa sukulaisuuden ei tarvitse olla erityisen korkea, vaan riittää, että auttamisen tuoma lisä lisääntyjän kelpoisuuteen on suurempi kuin altruistin itsenäinen lisääntymispotentiaali. Hughes ym. (2008) osoittavatkin, että aitososiaaliset ryhmät ovat kehittyneet elinikäisen yksiavioisuuden kautta, vaikka moniavioisuus on useilla jo ehdottomasti aitososiaalisilla lajeilla myöhemmin kehittynyt.

Kuitenkaan saman yhteiskunnan eri yksilöt eivät ole geneettisesti identtisiä, ja siksi niillä yleisesti erilaisia, usein keskenään ristiriitaisia etuja (Sundström ja Boomsma 2001). Paljon tutkittu jännite vallitsee yhteiskuntapistiäisten kuningatararten ja työläisten välillä. Luonnonvalinta ei aina suosi työläisten työskentelyä kuningattaren jälkeläisten eduksi, vaan joskus työläisen etu on itse lisääntyä ja näin toimia vastoin yhteiskunnan etua (Bourke 1988, Helanterä & Sundström 2007). Toinen yhteiskuntapistiäisillä paljon tutkittu esimerkki on jälkeläisten sukupuolijakaumaa koskevat eturistiriidat. Ne johtuvat siitä, että yhteiskuntapistiäiset ovat haplodiploideja eli niiden naaraat ovat diploideja saaden alleelit sekä isältään että äidiltään, kun taas koiraat ovat haploideja ja niillä on vain kuningattarelta saadut alleelit (Bourke 2011: 32–33). Tämän seurauksena työläiset ovat enemmän sukua sisarilleen kuin veljilleen, ja siksi niiden etu on paljon tytärkuningattaria tuottava yhteiskunta. Kuitenkin kuningatar on yhtä lailla sukua niin koiras- kuin naarasjälkeläisilleen, joten sen etu on tuottaa yhtä paljon koiraita kuin tytärkuningattaria (Crozier & Pamilo 1996: 147–157).

Yhteiskunnan jäsenten välinen sukulaisuus vaihtelee. Siihen vaikuttavat kuningatararten määrä, kuningatararten parittelukumppaneiden määrä sekä yksilöiden siirtyminen eri pesien välillä (Pamilo 1982). Kun sukulaisuus on alhainen, voidaan odottaa eturistiriitojen ja yhteiskunnan jäsenten itsekkään käyttäytymisen yleistyvän (Helanterä ym. 2009). Itsekästä käyttäytymistä voi työläisten lisääntymisen ohella olla kaukaisempaa sukua oleviin toukkiin kohdistuva kannibalismi (Schultner ym. 2014), toukkien pyrkimys vastoin yhteiskunnan etua kehittyä kuningattariksi eikä työläisiksi (Bourke 1988) ja usean kuningattaren yhteiskunnissa lähisukuisten kuningatararten suosiminen muiden kustannuksella (Bargum ja Sundström 2007).

## 1.2 Muurahaisten elinkierto ja yhteiskunnan rakenne

Muurahaiset ovat mm. aitososiaalisten elintapojensa monimuotoisuuden ja yhteiskuntiansa sisäisen sukulaisuuden vaihtelun vuoksi erinomainen mallijärjestelmä sukulaisvalinnan ja siihen liittyvien eturistiriitojen tutkimiseen. Tunnetuimmassa muodossaan muurahaisyhteiskunta koostuu yhdestä kuningattaresta ja lukuisista työläisistä (Douwes ym. 2012: 33–36). Kuningatar munii, ja työläiset hoitavat munista kehittyviä toukkia. Hedelmöittämättömistä munista kehittyvät koirastoukkia ja hedelmöitettyistä naarastoukkia. Sen, mistä naarastoukista kehittyvät tytärkuningattaria ja mistä työläisiä, määrää mm. toukkien ravinnon määrä ja laatu, lämpötila yksilönkehityksen aikana sekä kuningattaren erittämät feromonit ja hormonit (Hölldobler & Wilson 1990: 348–354). Myös naarasjälkeläisen genotyyppi voi vaikuttaa kastinmääräytymiseen (Anderson ym. 2008).

Kehittyttyään aikuisiksi tytärkuningattaret ja koiraat poistuvat synnyinpesistään hännellenolle ja parittelevat. Sitten koiraat kuolevat, kun taas tytärkuningattarista pieni osa onnistuu perustamaan uuden pesän. Kuningatar munii munat, joista pesän ensimmäiset työläiset kehittyvät. Energian ensimmäisten työläisten tuottamiseen kuningatar saa useilla lajeilla hajottamalla tarpeettomiksi jääneet lentolihasensa (Hölldobler & Wilson 1990: 157) sekä takaruumiiseen varastoidusta rasvasta ja proteiinista (Wheeler & Buck 1996). Saatuaan työläiset avukseen kuningatar voi keskittyä pelkkään munimiseen (Hölldobler & Wilson 1990: 143–163). Sperma säilyy kuningattaressa elinikäisesti, ja yleensä kuningattaret parittelevat vain kerran (Boomsma & Ratnieks 1996). Näin yhteiskunnan elinajan kaikki jälkeläiset voivat olla samojen kahden yksilön jälkeläisiä.

Usein muurahaisyhteiskunta eroaa merkittävästi yllä esittelemästäni perustyyppistä ja poikkeuksia on useimpiin muurahaisten elinkiertoa koskeviin yleistyksiin (Heinze 2007). Monella lajilla on monikuningattarisia yhteiskuntia eli yhteiskuntia, joissa on useita hedelmöittyneitä ja lisääntyviä kuningattaria. Monikuningattarisuus (polygynia) voi olla ensisijaista tai toissijaista. Ensisijaisesti monikuningattarinen pesä perustetaan usean kuningattaren yhteistyönä, kun taas toissijainen monikuningattarisuus seuraa siitä, että uusi kuningatar tulee olemassa olevaan pesään ja alkaa siellä lisääntyä vanhan kuningattaren rinnalla (Hölldobler & Wilson 1990: 143–144). Monilla lajeilla on myös yleistä, että tytärkuningattaret parittelevat jo synnyinpesässään, eivätkä koskaan



poistu siitä (Sundström 1995).

Muurahaisyhteiskunta voi koostua myös useammasta kuin yhdestä pesästä, jolloin puhutaan monipesäisyydestä (polydomia) (Crozier & Pamilo 1996: 142–144). Saman lajin yksipesäiset (monodomiset) yhteiskunnat kilpailevat keskenään, ja eri pesien työläiset käyttäytyvät vihamielisesti toisiaan kohtaan. Monipesäisissä yhteiskunnissa työläiset sen sijaan voivat liikkua vapaasti pesästä toiseen (Rosengren & Pamilo 1983, Helanterä ym. 2009). Monipesäinen yhteiskunta voi syntyä kahdella tavalla (Rosengren & Pamilo 1983, Rosengren ym. 1993). Ensinnäkin pesä voi jakautua niin, että työläiset perustavat satelliittipesiä, joihin ne voivat myös kuljettaa kuningattaria. Toiseksi kuningatar voi itsenäisesti perustaa pesän lähelle toista saman lajin pesää ja tämä pesä tulee hyväksytyksi osaksi monipesäistä yhteiskuntaa. Monipesäinen yhteiskunta voi koostua yhdestä pesästä, jossa on lisääntyvä kuningatar, ja kuningattarettomista satelliittipesistä, mutta usein yhteiskuntaan kuuluu useita kuningattarellisia pesiä ja monipesäiset yhteiskunnat ovat yleensä myös monikuningattarisia (Crozier & Pamilo 1996: 142–144).

Monikuningattarisuus ja -pesäisyys johtaa yleensä yksikuningattarisuutta vähäisempään lisääntymiseen kuningattarta kohden sekä vähäisempään keskimääräiseen sukulaisuuteen kuningattaren ja työläisten välillä. Siksi on odotettavissa, että varsinkin hyvin suurten monikuningattaristen yhteiskuntien kehittyminen vaatii erityisiä oloja (Hölldobler & Wilson 1990: 209–211). Luonnonvalinta voi suosia monikuningattarisuutta, kun pesäpaikkojen löytyminen on epätodennäköistä tai levittäytymisen riskit ovat hyvin suuria, jos yhden kuningattaren todennäköinen elinikä on huomattavasti lyhyempi kuin pesän todennäköinen elinikä, tai kun on todennäköistä, että pesä jakautuu useampaan osaan (Nonacs 1988, Crozier & Pamilo 1996: 123–135).

Hölldoblerin ja Wilsonin (1990: 209–220) mukaan suurin osa monikuningattarisista lajeista elääkin joko häirityissä tai muuten väliaikaisissa elinympäristöissä, joissa pesän jakautuminen on todennäköistä, tai pirstoutuneissa elinympäristöissä, joissa uusien pesäpaikkojen löytäminen on vaikeaa. Jakautuvan pesän tapauksessa monikuningattarisuudesta on hyötyä, kun jakautuneen pesän eri osissa on jäljellä kuningatar. Sopivien pesäpaikkojen pirstaleisuus taas suosii monikuningattarisuutta, koska sopivalle alueelle löytäminen levittäytymällä on epätodennäköistä ja koska eristyneillä habitaattilaikuilla todennäköisesti on vähemmän lajinsisäistä kilpailua kuin yhtenäisillä alueilla,

joille moni kilpaileva yhteiskunta on onnistunut levittäytymään (Hölldobler & Wilson 1990: 209–220). Lisäksi yhtäältä uusien kuningatarten yhteiskunnan lisääntymiseen mahdollisesti tuoma lisä ja toisaalta kuningatarten keskinäinen sekä kuningatarten ja työläisten välinen sukulaisuus vaikuttavat siihen, hyväksytäänkö pesään uusia kuningattaria (Crozier & Pamilo 1996: 123–135).

Rosengrenin ja Pamilon (1983) mukaan monipesäisyys on usein ainakin osaksi monikuningattarisuuden seuraus: kun pesässä on paljon kuningattaria, työläiset ehkä päätyvät siirtämään niitä uusiin pesiin. Näin monipesäisyyttä suosivat pitkälti samat tilanteet kuin monikuningattarisuutta (Crozier & Pamilo 1996).

### 1.2.1 Superkoloniaalisuus

Superkolonia on kymmenistä, sadoista tai jopa tuhansista pesistä koostuva monipesäinen yhteiskunta. Termin määrittelyminen tarkasti on vaikeaa, eikä ole selvää rajaa, jonka ylittäessään monipesäisestä yhteiskunnasta tulee superkolonia. Pedersen ym. (2006) määrittelevät superkolonian monipesäiseksi yhteiskunnaksi, joka on niin iso, että alueen eri päissä sijaitsevien pesien työläiset eivät voi suoraan olla yhteydessä toisiinsa. Moffett (2012) pitää määritelmää ongelmallisena mm. koska eri lajien työläiset liikkuvat eripituisia matkoja ja työläisten liikkumattomuutta tietyllä alueella on vaikeaa osoittaa toteen. Hän määrittelee superkolonian erityisen suureksi monipesäiseksi yhteiskunnaksi, jolla on potentiaali rajattomaan kasvuun sopivassa elinympäristössä. Erityisen suuren yhteiskunnan rajaksi hän ehdottaa selvästi yli miljoonaa yksilöä, sillä niin suuria yhteiskuntia ei tunneta lajeilla, jotka eivät muodosta isoja monipesäisiä yhteiskuntia.

Superkoloniaalisuutta on tutkittu eniten vieraslajeilla, jotka pystyvät superkolonian suuren yksilömäärän sekä lajinsisäisen aggression ja luontaisten vihollisten puuttumisen siivittäminä tehokkaasti valtaamaan uusia alueita (Krushelnycky ym. 2010). Jotkin muurahaislajit on luokiteltu maailman haitallisimpien vieraslajien joukkoon (Lowe ym. 2004), ja ne vähentävät erityisesti kotoperäisten muurahaisten mutta myös muiden lajiryhmien monimuotoisuutta (Holway ym. 2002). Haitallisena vieraslajina luontaisen esiintymisalueensa ulkopuolella esiintyvä argentiinanmuurahainen (*Linepithema*

*humile*) on äärimmäinen esimerkki erittäin suuria superkolonioita muodostavasta lajistasta. Iberian niemimaan rannikolla on n. 6 000 km:n pituisella alueella kaksi argentiinanmuurahaisen superkoloniaa (Giraud ym. 2002).

Argentiinanmuurahaisen tapaan useimmat haitallisimmista vieraslajimuurahaisista muodostavat superkolonioita ainakin niillä alueilla, joilla ne ovat vieraslajeja (Holway ym. 2002). Muita Holwayn ym. (2002) mainitsemissa haitallisissa vierasmuurahaisissa yleisiä piirteitä ovat kaikkiruokaisuus, generalistisuus pesäpaikkojen suhteen ja selviytyminen häirityissä ympäristöissä. Eniten tutkittujen vierasmuurahaisten, argentiinanmuurahaisen ja tulimuurahaisen (*Solenopsis invicta*), yhteiskunnat ovat lajien luontaisilla esiintymisalueilla usein huomattavasti pienempiä kuin vierasalueilla. Tähän on etsitty syitä mm. vähentyneestä geneettisestä monimuotoisuudesta (Tsutsui ym. 2000), mutta Vogelín ym. (2010) ja Moffettin (2012) mukaan vieraspopulaatioille uniikit ominaisuudet selittyvät lähinnä kilpailijoiden puutteella niin lajin sisällä kuin lajien välilläkin, ja kotoperäisillä argentiinanmuurahaisilla on sama potentiaali levittäytyä sopivissa oloissa kuin vieraspopulaatioillakin.

Kotoperäisiä superkoloniaalisia lajeja on tutkittu huomattavasti vähemmän kuin vieraslajeja. *Formica*-suvussa, johon tutkimuslajini kaljuloviniska (*F. pressilabris*) kuuluu, on useita superkoloniaalisia lajeja, joiden yhteiskunnat voivat olla isoja ja paikallisesti hyvin hallitsevia (Czechowski 1971, Helanterä ym. 2009, Markó ym. 2012). Kuitenkin *Formica*-muurahaisten superkoloniaalisuutta on tutkittu vain muutamilla lajeilla (Higashi & Yamauchi 1979, Chapuisat ym. 1997, Seppä ym. 2004, Gyllenstrand ym. 2005, Schultner ym. 2016). Kaljuloviniskaa on tutkittu vähän verrattuna moniin muihin *Formica*-lajeihin ja erityisesti sen lähisukulaiseen karvaloviniskaan (*F. exsecta*). Czechowski (1975) toteaa Puolassa olleen yli sadan pesän kaljulovinskayhteiskuntia, mikä on ainoa kirjallisuudesta löytämäni maininta niin suurista kaljuloviniskan superkolonioista. Markó ym. (2012) raportoi suurimpana tunnettuna loviniskamuurahaisten (alasuku *Coptoformica*) superkoloniana 3 347 pesän karvalovinskakeskittymän Romaniassa, ja useita muitakin satojen pesien yhteiskuntia on tällä lajilla raportoitu (Markó ym. 2012). Suurin tunnettu *Formica*-superkolonia on 45 000 pesää käsittäväksi arvioitu *F. yessensis* -yhteiskunta Hokkaidolla (Higashi & Yamauchi 1979).

Superkoloniaalisuus on ekologisesti hyvin menestyksenkäs elämänmuoto, ja

superkolonia on voimakkaasti hallitseva osa eliöyhteisöön. Sukulaisvalinnan kannalta superkoloniaalisuus kuitenkin nähdään paradoksaalisena ja sitä pidetään evolutiivisena umpikujana (Helanterä ym. 2009). Kuningattaria voi superkolonian yksittäisissä pesissä olla kymmeniä tai satoja (Rosengren ym. 1993), joten superkoloniassa kuningattaria on hyvin paljon. Lisäksi kuningattaret ovat yleisesti paritelleet eri koiraiden kanssa. Näin työläisten ja kuningatararten välinen sukulaisuus voi olla lähellä nollaa. Tällöin luonnonvalinta ei voi suosia altruismia, saati ylipäätään vaikuttaa lisääntymättömien työläisten ominaisuuksiin (Helanterä ym. 2009).

Sukulaisuutta tarkastellaan suhteessa koko populaation keskiarvoon eli yksilöiden välinen sukulaisuus voi olla alhainen, vaikka populaatio kokonaisuudessaan olisi geneettisesti melko yhtenäinen. Kun itsekäs käyttäytyminen alhaisen sukulaisuuden myötä lisääntyy, yhteiskunnan sosiaalinen rakenne heikkenee. Lisäksi haitalliset mutaatiot yleistyvät työläisissä geneettisen ajautumisen myötä, jos luonnonvalinta ei vaikuta työläisiin. Tähän kuvaan sopivat fylogeniitit, joissa yksittäiset superkolonioita muodostavat lajit sijoittuvat kaukana toisistaan oleviin ryhmiin. Superkoloniaalisuus näyttää siis historiassa kehittyneen useita kertoja, mutta hävinneen ennen lajien eriytymistä. *Formica*-suku on kuitenkin tässä mielessä kiinnostava poikkeus, sillä siinä tunnetaan useita superkolonioita muodostavia lajeja, joista jotkin voivat olla toistensa sisarlajeja (Helanterä ym. 2009).

### 1.3 Muurahaisten levittäytyminen

Eliöiden levittäytyminen on perustavanlaatuisen tärkeä ekologinen tekijä, koska se määrittää lajien levinneisyyden ja vaikuttaa sitä kautta koko eliöyhteisön rakenteeseen. Useimmat muurahaislajit levittäytyvät häälennolla, jonka jälkeen pariutuneet tytärkuningattaret perustavat uusia pesiä. Suurin osa tytärkuningattarista kuolee, ja vain pieni osa onnistuu paitsi ylipäänsä parittelemaan myös löytämään sopivan pesäpaikan ja välttämään saalistajat (Hölldobler & Wilson 1990: 143–157). Levittäytymistä vaikeuttaa, että tietyllä alueella jo elävät saman lajin yhteiskunnat (Rosengren & Pamilo 1983) ja kilpailevien tai muuten aggressiivisten lajien (Savolainen & Vepsäläinen 1988) yhteiskunnat harvoin hyväksyvät uusia tulijoita. Lisäksi sopivat habitaatit voivat esiintyä laikuittain. Pariutuneet kuningattaret eivät siis välttämättä pääse lähellekään sopivia

pesäpaikkoja.

Vaikka häälennon on ajateltu olevan tapa levittäytyä kauas, osoittaa tutkimus yllättävän lyhyitä levittäytymisetäisyyksiä. Vitikaisen ym. (2015) tutkimuksessa karvaloviniskan kuningatarten levittäytymismatkan mediaanipituus oli 63 m ja 90 % kuningattarisista löytyi alle 600 m:n päästä synnyinpesistään. Koiraat olivat levinneet karkeasti ottaen noin kaksi kertaa niin pitkälle kuin naaraat. Näin lyhyet levittäytymisetäisyydet eriyttävät osapopulaatioita toisistaan ja voivat johtaa sisäsiittoisuuteen ja sisäsiitostaantumiseen (Vitikainen ym. 2015).

Häälennon vaihtoehtoinen strategia on paritella synnyinpesän lähistöllä, tiputtaa siivet ja palata pesään. Uusi kuningatar voi sitten joko jäädä pesään vanhan kuningattaren rinnalle tai se voi levittäytyä työläisten mukana jalan. Tämä levittäytymisstrategia on yleinen monipesäisissä ja -kuningattarisissa yhteiskunnissa. Siinä kuningattaret säästävät häälennon vaaroilta, mutta levittäytymisetäisyydet jäävät erittäin lyhyiksi, eikä uusia alueita saada kolonisoitua (Rosengren & Pamilo 1983). Levittäytymistapa on ominainen superkolonioille, ja esimerkiksi argentiinanmuurahaisen maailmanlaajuiset superkoloniat ovat perua vain muutamasta yhteiskunnasta, joiden pesät ovat lisääntyneet jakautumalla sopivassa habitaatissa (Vogel ym. 2010). Uusien pesien syntymisen jakautumisten seurauksena voi odottaa näkyvän geneettisenä viskositeettina yhteiskunnan sisällä. Geneettinen viskositeetti tarkoittaa, että lähellä toisiaan sijaitsevien pesien yksilöt ovat läheisempää sukua toisilleen kuin kaukaisempien saman osapopulaation pesien yksilöille (Hamilton 1964a,b). Geneettistä viskositeettia onkin havaittu useissa superkolonioissa (Pamilo & Rosengren 1984, Chapuisat ym. 1997, Liautard & Keller 2001, Gyllenstrand & Seppä 2003, Seppä ym. 2012).

Levittäytyminen yksinomaan tai lähes yksinomaan pesien jakautumisen kautta tekee superkoloniaalisista lajeista yleensä heikkoja levittäytyjiä. Karvaloviniskalla on osoitettu, että yksipesäiset yhteiskunnat ovat geneettisesti lähempänä toisiaan kuin samalla alueella olevia monipesäisiä yhteiskuntia. Tämä on merkki siitä, että yksipesäisten ja yksikuningattaristen pesien jälkeläiset levittäytyvät pitemmälle kuin monipesäisten ja monikuningattaristen yhteiskuntien jälkeläiset (Seppä ym. 2004).

Tytärkuningatarten ja koiraiden vähäisen levittäytymisen voi nähdä itsekkäänä

käyttäytymisenä verrattuna häälentoon ja kuningattaren perimän levittämiseen laajalle alueelle. Vaikka levittäytyminen ja uuden pesän perustaminen on vaarallista, voi yksipesäisissä ja -kuningattarisissa yhteiskunnissa odottaa sukulaisvalinnan ylläpitävän levittäytymistä, sillä levittäytymättömyys johtaisi resurssikilpailuun läheisten sukulaisten kanssa (West ym. 2002). Luonnonvalinnan voikin odottaa suosivan vähäistä levittäytymistä vain, kun kasvavalle yhteiskunnalle on alueella runsaasti tilaa, tai kun yksilöiden välinen sukulaisuus on hyvin alhainen (Boomsma ym. 2014).

Koska sukulaisuus *Formica*-yhteiskunnissa vaihtelee mm. kuningatarten määrän mukaan, on suvun lajien levittäytyminen mielenkiintoisia sukulaisvalinnan näkökulmasta. Silloin kun tytärkuningatar ei ole sukua muille yhteiskunnan kuningattarille, sen konkanskelppoisuus ei vähene siitä, että se resurssikilpailun myötä vähentää muiden kuningatarten lisääntymistä. Siksi on sukulaisvalintateorian pohjalta odotettavissa, että hyvin alhaisen sukulaisuuden superkolonioiden tytärkuningattaret usein jäävät ikään kuin loisimaan synnyinpesiään, eivätkä yritä vaarallista pitkän matkan levittäytymistä ja pesän perustamista. Voidaankin ennustaa superkolonioiden olevan suljettuja populaatioita, joista ainakaan kuningattaret eivät merkittävässä määrin levittäydy ulospäin.

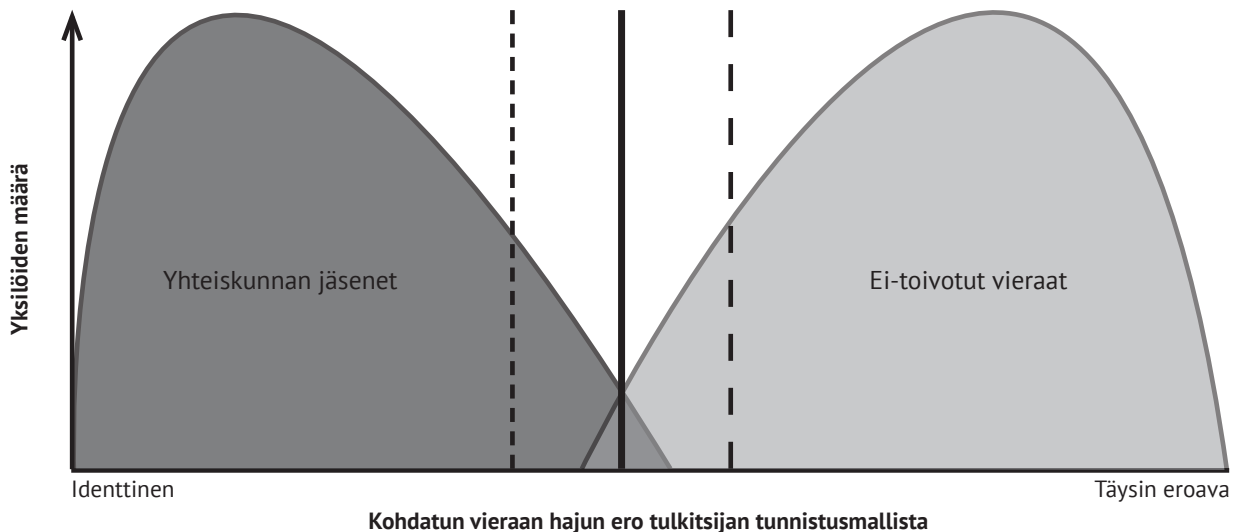
#### **1.4 Yhteiskunnan jäsenten tunnistaminen ja aggressiivisuus vieraita kohtaan**

Yhteiskunnan menestyksen kannalta on tärkeää tunnistaa oman yhteiskunnan jäsenet ja erottaa niistä tunkeilijat, kuten sosiaaliset loiset (d’Ettorre & Lenoir 2010). Muurahaisilla jokaisella yhteiskunnalla on oma hiilivedyistä koostuva hajunsa, jonka työläiset tuntevat toistensa pinnoilla ja jonka perusteella ne erottavat yhteiskuntansa jäsenet vieraista (Howard & Blomquist 2005, Martin ym. 2008, Sturgis & Gordon 2012). Hiilivetyprofiili määräytyy suurilta osin geneettisesti (Rosengren & Pamilo 1983, Howard ja Blomquist 2005), mutta myös ympäristöllä on merkittävä osa (Crosland 1989a,b; Heinze ym. 1996). Luultavasti aikainen oppiminen ja yhteys muihin yhteiskunnan jäseniin on merkittävässä osassa, kun työläinen muodostaa tunnistusmallinsa, jonka perusteella se päättää, mitä yksilöitä se pitää oman yhteiskuntansa jäseninä. Todennäköisesti työläiset kuitenkin myös päivittävät tunnistusmalliaan läpi elämänsä (Bos & d’Ettorre 2012). Yhteiskunnan haju voi levitä myös isoissa monipesäisissä yhteiskunnissa siten, että työläiset siirtyvät itse ja siirtävät toisiaan pesien välillä sekä

aktiivisesti hankaavat kehojaan pesämateriaalia ja muita yksilöitä vasten (Dahbi ym. 1997). Myös trofallaksiaa, jossa suun kautta siirretään nestettä yksilöltä toiselle, käytetään yhteiskunnan hajun levittämiseen (Dahbi ym. 1999, Chapuisat ym. 2005).

Muurahaistyöläiset tarkistavat jatkuvasti kohtaamiensa muurahaisten identiteetin koskettamalla niitä tuntosarvilla. Koska vieraat yksilöt voivat olla kilpailijoita tai loisia, niitä kohtaan ollaan usein aggressiivisia. Tunnistusmekanismit eivät kuitenkaan ole täydellisiä, vaan työläiset saattavat vahingossa tulkita vieraita yhteiskuntansa jäseniksi tai oman yhteiskuntansa jäseniä vieraiksi. Liian korkea kynnyks tulkita toinen yksilö saman yhteiskunnan jäseneksi eliminoisi sosiaaliset loiset ja muut tunkeilijat, mutta haittaisi merkittävästi yhteiskunnan toimintaa yleisten virhetunnistusten ja turhan, saman yhteiskunnan jäsenten välisen aggression myötä. Liian matala tunnistuskynnyks taas poistaisi aggression yhteiskunnan sisältä, mutta altistaisi yhteiskunnan tunkeilijoille. Yhteiskunnan etu on mahdollisimman hyvä kompromissi korkean ja matalan tunnistus- ja aggressiokynnyksen välillä (d’Ettorre & Lenoir 2010). Havainnollistan tunnistuskynnyksiä Kuvassa 1.

Superkolonioissa työläiset hyväksyvät tovereikseen hyvin laajan alueen muurahaisia,



Kuva 1. Kolme erilaista tunnistuskynnystä (pystyviivat). X-akseli kuvaa sitä, kuinka paljon kohdattu yksilö eroaa tulkitsijan tunnistusmallista, ja Y-akseli kuvaa tulkitsijan hyväksymien tai hylkäämien yksilöiden määrää. Tulkitsija hyväksyy kohtaamansa yksilöt tovereikseen kunkin kynnyksen vasemmalla puolella ja hylkää nämä kynnyksen oikealla puolella. Liian matala tunnistuskynnyks (tiheä katkoviiva) johtaa siihen, että paljon oman yhteiskunnan yksilöitä tulkitaan vieraiksi ja liian korkea tunnistuskynnyks (harva katkoviiva) siihen, että paljon vieraita tulkitaan tovereiksi. Tässä yhtenäinen viiva kuvaa kompromissia, jossa oman yhteiskunnan jäsenten tulkitseminen vieraiksi sekä vieraiden tulkitseminen tovereiksi minimoidaan. Kuva piirretty Reeveä (1989) mukailten.



joille ne eivät ole sukua. Jos geneettisesti monimuotoiset yhteiskunnat ovat myös hajuiltaan vaihtelevia, voidaan odottaa vaikeuksia tovereiden ja vieraiden erottelemisessä. Kuitenkin superkolonian haju voi olla hyvinkin yhtenäinen (Martin ym. 2009), ja Chapuisat'n ym. (2005) tutkimassa *Formica paralugubris* -superkoloniassa työläiset erottivat kaukaisten pesien työläiset läheisemmistä, mutta eivät silti käyttäytyneet aggressiivisesti näitä kohtaan. Vaikka pesätoverin tunnistamisen kemiallinen tausta tunnetaan hyvin, ei siis ole täysin selvää, millä perusteilla työläiset pitävät toisiaan tovereina.

## 1.5 Tutkimuskysymykset

Tutkin populaatiogeneettisin menetelmin levittäytymistä kaljuloviniskan superkoloniksi olettamani suuren pesäkeskittymän ja lähialueen pienempien yhteiskuntien välillä. Suuren pesäkeskittymän ja kahden pienemmän pesäkeskittymän sijainti tunnettiin entuudestaan, ja näiden lisäksi pyrin löytämään lähialueen muut yksi- ja monipesäiset kaljuloviniskayhteiskunnat.

Päähypoteesini on, että superkolonian tytärkuningattaret käyttäytyvät itsekkäästi, eivätkä siksi levittäydy. Tämän hypoteesini pohjalta odotan superkolonian olevan geneettisesti eriytynyt muusta populaatiosta. Odotan erityisesti, että geenivirta superkolonian ja muiden osapopulaatioiden välillä on vähäisempää kuin geenivirta muiden osapopulaatioiden kesken. Samalla selvitän superkolonian sisäistä geneettistä rakennetta. Tässä vaihtoehtoiset hypoteesini ovat a) että superkolonia on geneettisesti yhtenäinen ja b) että superkolonia on geneettisesti viskoosinen, eli että maantieteellisesti lähellä toisiaan sijaitsevat pesät ovat geneettisesti lähempänä toisiaan kuin kauempana sijaitsevia saman superkolonian pesiä.

Populaatiogeneettistä tutkimusta täydennän tekemällä käyttäytymiskokeita olettamani superkolonian eri pesien työläisillä. Yhtäältä selvitän, kykenevätkö superkolonian työläiset tunnistamaan muiden lähialueen yhteiskuntien työläisiä vieraita, ja ovatko superkolonian työläiset näitä vieraita kohtaan aggressiivisia. Toisaalta selvitän, onko superkoloniksi olettamani pesäkeskittymä ylipäänsä yhtenäinen superkolonia. Jos kaikki pellon pesät todella ovat samaa superkoloniaa, niiden välillä ei määritelmän mukaan ole aggressiota (Helanterä ym. 2009, Moffett 2012).



## 2 Aineisto ja menetelmät

### 2.1 Tutkimuslaji

Kaljuloviniska, *Formica (Coptoformica) pressilabris*, elää kuivilla ja kosteilla niityillä sekä pientareilla muodostaen sekä yksi- että erittäin yleisesti monipesäisiä yhteiskuntia (Czechowski 1975, Collingwood 1979: 132, Douwes 2012). Se on *Serviformica*-alasukunnon lajien tilapäisloinen. Tilapäisloisinnassa loislajin tytärkuningatar tunkeutuu isäntälajin pesään, tappaa alkuperäisen kuningattaren ja saa pesän työläiset auttamaan itseään ensimmäisten omien työläistensä kehittämisessä. Alkuperäisten työläisten kuollessa tulee pesästä vähitellen puhdas tilapäisloisen yhteiskunta (Hölldobler & Wilson 1990: 450–451).

Toissijainen monikuningattarisuus on kaljuloviniskalla hyvin yleistä, mutta myös yksikuningattarisia pesiä on raportoitu (Czechowski 1975, Collingwood 1979: 132, Pamilo & Rosengren 1984, Rosengren ym. 1993). Ensisijaista monikuningattarisuutta ei lajilla esiinny (Rosengren & Pamilo 1983). Pesä rakennetaan pääasiassa hienosta kasvimateriaalista, ja keko on korkeimmillaan noin puolen metrin korkuinen (omat havaintoni, Collingwood 1979: 132). Kaljuloviniska esiintyy pääosin Keski- ja Pohjois-Euroopasta Lounais-Siperiaan. Suomessa laji esiintyy harvinaisehkona, mutta paikallisesti runsaana koko Etelä- ja Keski-Suomessa ja pohjoisessa Pohjois-Pohjanmaalle asti (Douwes 2012).

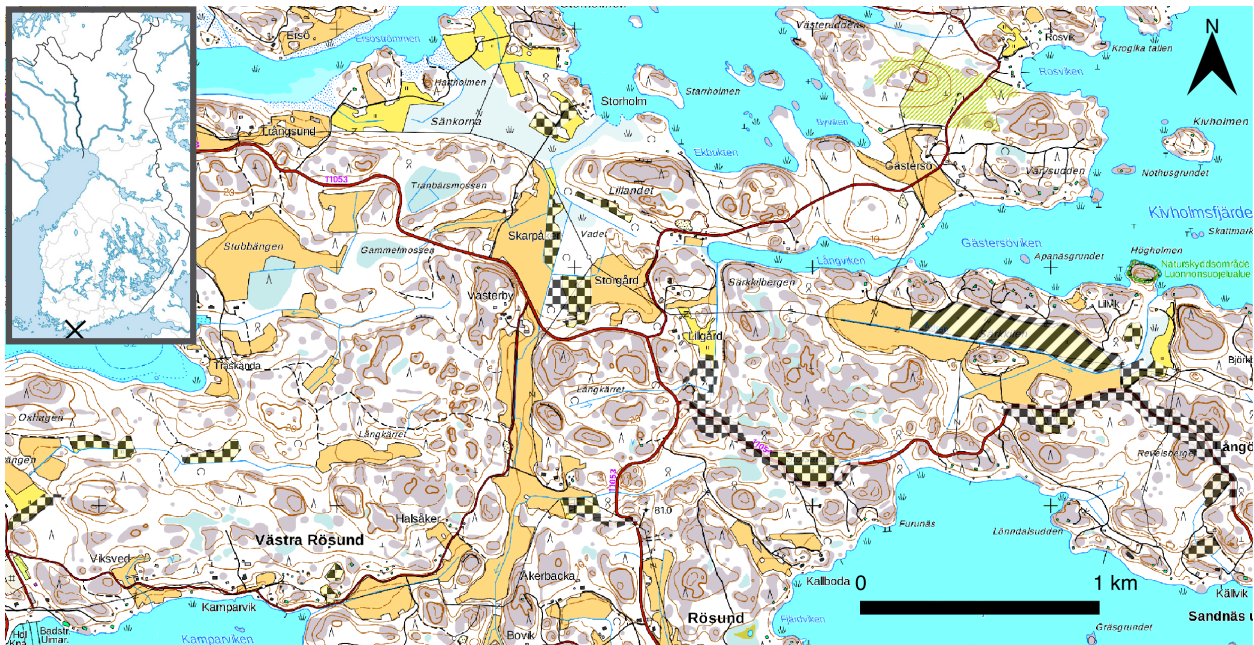
### 2.2 Populaation geneettisen rakenteen selvittäminen

#### 2.2.1 Superkolonian ja sen lähiympäristön kartoitus sekä näytteiden kerääminen

Tutkin kaljuloviniskan populaatiota Raaseporissa lähellä Snappertunan kylää. Oletettu superkolonia sijaitsee Särkkilen-nimisellä, n. 800 m:n pituisella, pääsääntöisesti n. 100 m:n levyisellä ja pinta-alaltaan n. 9 ha:n kokoisella kesantoheinäpellolla (Kuva 2). Etsin kaljuloviniskan pesiä kävelemällä peltoa poikittaissuunnassa edestakaisin. Merkitsin löytämäni pesät maastoon ja kirjasin pesien sijainnin GPS-laitteeseen. Erillisiksi

pesiksi tulkitsin maan pinnalta arvioituna yli 20 cm:n päässä toisistaan sijainneet keot. Saadakseni käsityksen siitä, kuinka suuren osan pesistä olin löytänyt, kävin koko alueen kartoitettuani vielä tarkastuslaskemassa kolme suunnilleen samansuuruista osaa pellostosta, jotka olin kartoittanut eri aikoihin keväällä ja kesällä. Koko kartoitustyö ajoittui huhti-heinäkuulle 2016.

Kartoitin viljelemättömiä pelto- ja niittyalueita sekä kallioita ja tienreunoja myös Särkkilenin ympäristössä (Kuva 2). Kilometrin säteellä superkoloniasta kävin katsomassa yhtä lukuun ottamatta kaikkia alueen peruskartassa niityiksi merkittyjä alueita ja niitä pelloksi merkittyjä alueita, jotka eivät olleet viljelykäytössä. Lisäksi kävin katsomassa joitakin kauempana (kauimmillaan 3,5 km Särkkilenistä) sijaitsevia niittyjä. Kartoitin Särkkilenin kartoitusta vastaavalla tavalla 12 niittyä, jotka vaikuttivat maastoltaan tutkimuslajille sopivilta. Lisäksi etsin samalla alueella pesiä tienreunojen sopivanoloisilta heinikkohabitaateilta n. kahden kilometrin matkalla. Muilla alueilla kuin Särkkilenillä en tehnyt edellisessä kappaleessa mainitsemaani tarkastuslaskentaa.



Kuva 2. Kartta tutkimusalueesta. Pääasiainen tutkimuspelto Särkkilen, jolla oletettu superkolonia elää, on merkitty raidoin. Lisäksi etsin pesiä ruutukuvioiduilta alueilta. Maastokarttapohja: Maanmittauslaitoksen avoimen aineiston Peruskarttarasteri (10/2016). Suomen kartan pohja: Natural Earth, <http://naturalearthdata.com> (5/2017).

## 2.2.2 Pesien genotyypitys

Genotyypitys on vakiomenetelmä, joka perustuu DNA-mikrosatelliittien eri pituisten alleelien tunnistamiseen. Koska mikrosatelliittien mutaatiotiheys on suuri, voi lievänkin osapopulaatioiden eriytymisen havaita alleelifrekvenssien välisiä eroja tarkastelemalla. Geneettinen eriytyminen taas kertoo vähäisestä geenivirrasta ja täten vähäisestä levittäytymisestä (Rowe ym. 2017: 231-242).

Ojitus jakaa Särkkilenin itä-länsisuunnassa 57:een melko samankokoiseen osaan. Valitsin genotyypitettävät pesät arpomalla viisi pesää kustakin tällaisesta osasta. Tästä poikkesin asumattomien osien ja korkeintaan viisi pesää käsittäneiden osien kohdalla. Niistä osista, joissa oli korkeintaan viisi pesää, valitsin mukaan kaikki pesät, ja alueilta, joiden pesää käytin käyttäytymiskokeissa (kohta 2.3 alla) valitsin käyttäytymiskokeissa käyttämäni pesän ja arvoin lisäksi neljä pesää. Näin sain genotyypitettäviksi 213 pesää. Lisäksi valitsin Särkkilenistä vielä 20 pesää käsin alueilta, jotka arvonnän jälkeen näyttivät kartalla heikoimmin edustetuilta. Genotyypitin kaikki muilta alueilta löytämäni kaljuloviniskapesät ja yhteensä genotyypitettäviä pesiä oli näin 285 (Tulokset, Kuva 4).

Kustakin pesästä genotyypitin yhden työläisen. Keräsin näytteet ottamalla pesän pinnalta työläisiä 99-prosenttisella etanolilla täytettyyn 1,5 ml:n sentrifugiputkeen. Ennen DNA:n eristämistä säilytin näytteitä + 5 °C:ssa. Murskasin työläisen Qiagenin TissueLyser II -laitteella ja eristin näytteestä DNA:n Macherey-Nagelin NucleoSpin Tissue -eristyspakkauksella valmistajan ohjeen mukaisesti. Säilytin eristetyn DNA:n -20 °C:ssa.

Monistin DNA-mikrosatelliitit polymeraasiketjureaktiolla (PCR, *polymerase chain reaction*). Käytin Oligomerin valmistamia, fluoresoivilla leimoilla FAM, HEX ja TAMRA leimattuja alukkeita Fe11, Fe13, Fe16, Fe17, Fe19, Fe21, Fe37, Fe38, Fe42, Fe51 (Gyllenstrand ym. 2002), Fl21 (Chapuisat 1996), Fy4, Fy7 (Hasegawa & Imai 2004) ja P22 (Trontti ym. 2003). P22:ta lukuun ottamatta alukkeet on kehitelty *Formica*-lajeille ja Fe11:tä, Fe17:ää ja P22:ta lukuun ottamatta Schultner ym. (2014) käyttivät kaikkia alukkeita onnistuneesti kaljuloviniskalla. Ajoin PCR:t alukepaneeleittain, joiden alukekoonpanot ja -pitoisuudet ovat Taulukossa 1. Käytin Qiagenin Type-it -entsyymiliuosta ja kussakin 10 µl:n reaktioliuoksessa oli 1 µl eristettyä DNA:ta. PCR:n

Taulukko 1. Käyttämäni alukepaneelit (S1, S2, E3 ja E5), niihin kuuluvat alukkeet ja suluissa yhden-suuntaisen alukkeen pitoisuus reaktioliuoksessa.

| S1                 | S2                 | E3                 | E5                 |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Fe11 (0,167 ng/μl) | Fe37 (0,444 ng/μl) | Fe16 (0,333 ng/μl) | Fe51 (0,167 ng/μl) |
| Fl21 (0,444 ng/μl) | P22 (0,056 ng/μl)  | Fe21 (0,222 ng/μl) | Fe13 (0,333 ng/μl) |
| Fe38 (0,167 ng/μl) | Fe17 (0,444 ng/μl) | Fy7 (0,222 ng/μl)  | Fe19 (0,222 ng/μl) |
|                    |                    |                    | Fe42 (0,278 ng/μl) |
|                    |                    |                    | Fy4 (0,389 ng/μl)  |

lämpötilavaiheet olivat 1) 5 min 95 °C:ssa, 2) 30 s 95 °C:ssa, 3) 90 s 57 °C:ssa, 4) 30 s 72 °C:ssa, 5) 30 min 60 °C:ssa ja 6) 5 min 15 °C:ssa. Vaiheet 2–4 toistin 28 kertaa. Säilytin PCR-tuotteet +5 °C:ssa genotyypitykseen asti.

PCR-tuotteiden sisältämät DNA-kappaleet selvitin laboratoriohenkilökunnan ABI 3730 -laitteella ajaman kapillaarielektroforeesin avulla. Ajoa varten laimensin 1 μl:n PCR-tuotetta 200 μl:aan vettä. Käytin kokostandardina Thermo Fischer Scientificin GeneScan 500 Roxia ja puskurina formamidia. Jokaisessa PCR- ja genotyypitysajossa oli mukana vesi negatiivisena kontrollina.

### 2.2.3 Tulosten analysointi

Tulkitsin genotyypityksen tulokset GeneMapper 5 -ohjelmalla. Annoin ohjelman automatiikan etsiä mikrosatelliittiipiikit käyttäen näytteitäni referenssinä, mutta tarkistin käsin ohjelman antamat tulokset ja poistin tai lisäsin tarvittaessa piikkejä. Vertailtuani eri näytteiden tuloksia keskenään arvioin, mitkä ohjelman näyttämät piikit merkitsevät aitoja mikrosatelliitteja. Epäselvissä tapauksissa jätin alleelit kokonaan merkitsemättä.

Selvitin kytKentäepätasapainoa, Hardyn–Weinbergin tasapainoa (HWT) ja heterotsygoottivajausta GenePop on the web -ohjelmalla (Raymond & Rousset 1995, Rousset 2008). Alleelirikkausarvot laskin PopGenReport (versio 3.0.0) -paketilla (Adamack & Gruber 2014) R 3.3.3 -ohjelmassa (R Core Team 2017). Microsoft Excel-liitännäisellä GenAlEx 6.502 (Peakall & Smouse 2006, 2012) laskin alleelifrekvenssit ja genotyypitettyjen pesien väliset lineaariset geneettiset sekä maantieteelliset etäisyydet ja tein molekyyliarianssianalyysin (AMOVA, *Analysis of Molecular Variance*). Molekyyliarianssianalyysillä laskin osapopulaatioiden väliset Wrightin

fiksaatioindeksit (Wright 1951), joita käytin geneettisen etäisyyden mittana. GenALEx:lla laskin myös aineistoa kuvaavat heterotsygotia-arvot. Geneettistä viskositeettia testasin Mantelin testeillä, jotka tein R:ssä *ecodist* (versio 2.0.1) -paketilla (Goslee & Urban 2007).

Lisäksi populaation geneettistä rakennetta mallinnettiin bayesiläiseen tilastotieteeseen pohjautuvalla BAPS 6.0 -ohjelman *Spatial genetic mixture analysis* -mallilla (Corander ym. 2008a). Ohjelma laskee todennäköisimmän osapopulaatioiden määrän siihen syötetyn maksimimäärän perusteella ja sijoittaa yksittäiset pesät näihin osapopulaatioihin. Analyysi ajettiin ensin nostamalla maksimimäärää kahdesta kahteenkymmeneen. Sitten analyysi uusittiin nostamalla maksimimäärää kahdesta viiteen, mikä toistettiin viidesti. Näin tehtiin, jotta nähtäisiin, muuttuvatko tulokset eri maksimimäärillä. Laskettuaan todennäköisimmän ryhmien määrän BAPS laski kunkin pesän todennäköisyyden kuulua kuhunkin ryhmään ja tulosti todennäköisimmän jaon. BAPSiin syötettiin mikrosatelliittiaineiston lisäksi pesien koordinaatit, mikä auttaa ohjelmaa jaon tekemisessä, kun populaation rakenne on heikko. Tämän analyysin pohjalta analysoitiin vielä saatujen ryhmien geneettistä sekoittumista *admixture analysis* -mallilla (Corander & Marttinen 2006, Corander ym. 2008b), jonka pohjana oli ensimmäisen analyysin tulos. BAPS-analyysit ajoi Perttu Seppä.

## 2.3 Käyttäytymiskokeet

Käyttäytymiskokeilla voidaan selvittää, miten yhteiskunnan jäsenet tunnistavat vieraita muurahaisia. Aggressiivisuus sekä mm. lisääntynyt antennointi ja trofallaksia ovat epäsuoria merkkejä siitä, että yksilö on tunnistettu vieraaksi (d’Ettorre & Lenoir 2010).

### 2.3.1 Kokeiden suoritus ja kuvaaminen

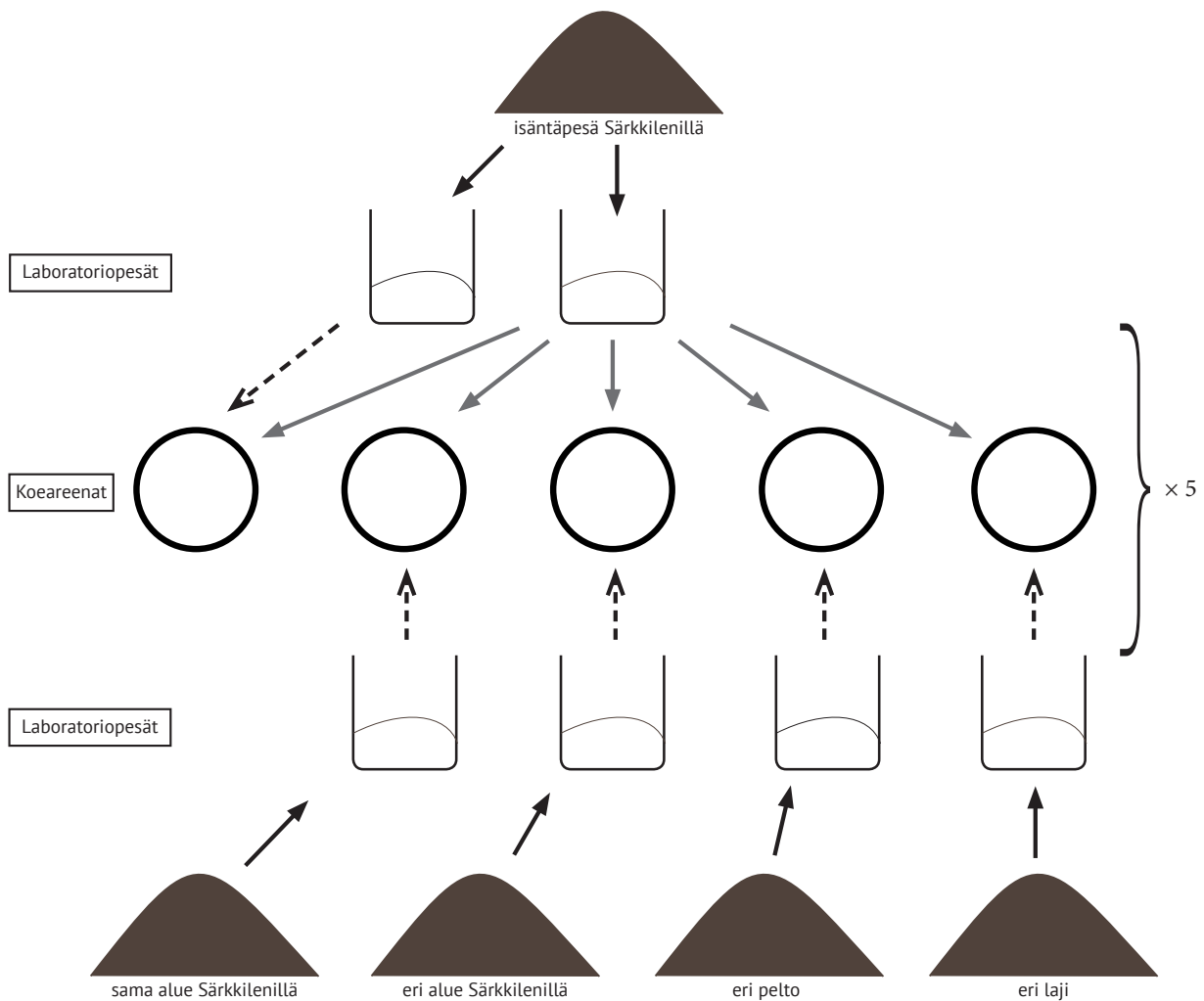
Selvittääkseni superkolonian mahdollisia rajoja testasin kerrallaan yhden pesän (isäntäpesä) työläisten aggressiivisuutta toisen pesän (vieraspesä) työläisiä kohtaan. Kokeita varten keräsin Särkkileniltä 16 kaljuloviniskapesän työläisiä ja kustakin pesästä 2–5 litraa pesämateriaalia. Jaoin jokaisen pesän kahteen muurahaisten karkaamisen

estämiseksi sisäsivuiltaan Fluonilla (polytetrafluorieteeni) päällystettyyn muovilaatikkoon. Pidin pesiä huoneenlämmössä ja kastelin niitä päivittäin. Ruokin pesiä päivittäin muurahaisia varten kehitellyllä kananmunaa, hunajaa, vettä ja agaria sisältävällä seokseksiällä (Bhatkar & Whitcomb 1970).

Valitsin kokeessa käyttämäni pesät niiden sijainnin perusteella niin, että otin pesiä neljältä eri Särkkilen-pellon alueelta, joita kutsun jatkossa nimillä I, II, III ja IV. Alueet I ja IV edustavat pellon länsi- ja itäpäättä ja II ja III sijoittuvat pellon keskiosiin (ks. Tulokset, Kuva 5). Alueiden välinen maantieteellinen raja on selvä II:n ja III:n sekä III:n ja IV:n välillä (yli 30 metriä seuraavan alueen alkuun), mutta ei niinkään I:n ja II:n välillä. I:n ja II:n jakaa kuitenkin alue, jolla on useita karvaloviniskan pesiä. Otin laboratorioon alueilta I ja IV kummaltakin kolme pesää ja II- ja III-alueilta kummaltakin viisi pesää. Valitsin pesät myös alueiden sisältä kohtalaisen tasaisin välein siten, että pesät sijaitsivat alueella I n. 25 m:n, alueella II 25–52 m:n ja alueella III 34–70 m:n etäisyydellä toisistaan. Kaikkiaan vain seitsemän pesää käsittävältä IV-alueelta valitsemani pesät ovat alle viiden metrin päässä toisistaan. Valitsin pesät niin, että ne muodostavat suurin piirtein koko pellon itä-länsisuunnassa leikkaavan linjan (ks. Tulokset, Kuva 5). Kokeita varten keräsin kaljuloviniskan pesämateriaalia ja työläisiä myös Storsandista (neljä pesää) ja Tvärminnestä (yksi pesä) sekä karvaloviniskapesiä yhden Särkkilenistä, yhden Storsandista ja yhden Tvärminnestä. Hoidin näitä pesiä samoin kuin Särkkilenin kaljuloviniskapesiä.

Esittelen koeasetelmani Kuvassa 3. Testasin kunkin Särkkileniltä keräämäni 16 isäntäpesän työläisten aggressiivisuutta viiden eri vieraspesän työläisiä vastaan. Selvittääkseni näkyykö koeasetelmassa ollenkaan aggressiivisuutta testasin kutakin pesää myös yhtä karvaloviniskan pesää vastaan, sillä kaljuloviniskan tiedetään tavallisesti käyttäytyvän aggressiivisesti karvaloviniskaa kohtaan (Czechowski 1971, omat alustavat kenttäkokeeni). Muut kolme vastaan asetettamaani pesää olivat saman Särkkilen-alueen (I, II, III tai IV) kaljuloviniskapesä, eri Särkkilen-alueen kaljuloviniskapesä ja Storsandin tai Tvärminnen kaljuloviniskapesä. Valitsin eri Särkkilen-alueen pesän siten, että tulin testanneeksi pesiä alueilta I–IV monipuolisesti vastakkain (ks. Tulokset, Kuva 7). Eri lajin ja eri peltojen (Storsand ja Tvärminne) vieraspesinä käytin eri pesiä vuorotellen. Näin häivytyin eri vieraspesien välisten erojen mahdollisia vaikutusta tuloksiin.





Kuva 3. Aggressiokokeen asetelma, jonka tein eri yksilöitä ja areenoita käyttäen viisi kertaa kullekin 16:lle kokeessa mukana olleelle isäntäpesälle. Ennen kokeita otin laboratoriopesiin työläisiä ja pesämateriaalia isäntäpesistä Särkkileniltä ja lisäksi saman lajin pesistä Storsandilta ja Tvärminnestä sekä eri lajin pesistä Storsandilta ja Särkkileniltä (mustat yhtenäiset nuolet). Kunkin isäntäpesän jaoin kahteen laboratoriopesään. Kullekin areenalle siirsin ensin 15 isäntäpesän työläistä (harmaat nuolet). Sitten lisäsin omille areenoilleen yhden vieraan työläisen yhdestä neljästä eri pesästä sekä kontrollityöläisen isäntäpesästä (katkonaiset nuolet). Kontrollityöläisen otin eri laatikosta kuin työläiset, joiden reaktioita testasin.

Muurahaisten aggressiivisuutta tutkitaan usein tarkkailemalla kahta työläistä neutraalilla areenalla, kuten muutoin tyhjässä lasipurkissa. Alustavissa kokeissa huomasin työläisten olevan hyvin passiivisia neutraaleilla areenoilla ja yksin ollessaan. Myös lähisukuisen karvaloviniskan on havaittu käyttäytyvän näin (Martin ym. 2008). Käytin siksi asetelmaa, jossa 15 isäntätyöläistä kohtaa oman pesämateriaalinsa päällä yhden vieraan.

Areenana käytin läpimitaltaan 6,5 cm:n muovipurkkia, jonka seinät olin muurahais-ten karkaamisen estämiseksi päällystännyt Fluonilla. Purkin pohjalle asetin tasaisen, n.

1 cm:n paksuisen kerroksen kulloinkin testatun isäntäpesän omaa pesämateriaalia ja poimin siihen 15 saman isäntäpesän työläistä. Annoin muurahaisten rauhoittua ennen kokeen suorittamista. Itse kokeessa lisäsin yhden saman tai eri pesän työläisen (jatkossa ”vieras”) areenalle tiputtamalla sen Fluonilla päällystetystä muovimukista, jossa työläinen ensin oli saanut hetken rauhoittua. Ennen tähän kaatomukiin siirtämistä olin poiminut kokeen toistoissa käytettävät viisi työläistä laboratoripesästään toiseen purkkiin. Videoin tapahtumia vieraan lisäämistä seuranneen minuutin ajan. Videointiin käytin Canon EOS 550D -kameraa ja Canon EF 100mm f/2.8 macro -objektivejä. Kameran etulinssi oli 48,5 cm:n päässä muurahaisista.

Toistin kunkin pesäparin kokeen viidesti käyttäen eri yksilöitä ja koeareenoita. Kontrolli- ja eri lajin vieras -asetelmat ovat poikkeus: käytin jälkimmäisessä asetelmasa samoja areenoita kuin kontrollikokeessa poistettuani ensin kontrollikokeen jälkeen yhden työläisen pesästä. Kontrollikokeen jälkeen areenoilla ei ollut havaittavissa aggressiota, joten voidaan olettaa, ettei kontrollikoe merkittävästi vaikuttanut isäntien aggressioon, kun testasin isäntien reaktioita eri lajiin.

### **2.3.2 Käyttäytymisen arviointi**

Katsoin videot VLC Media Player -ohjelmalla puolella luonnollisesta nopeudesta. Näin pystyin seuraamaan merkitsemättömien muurahaisten liikkeitä. Koeareenan läpimita näytöllä oli 15 cm, eli 2,3 kertaa areenan luonnollinen koko. Havainnoin videolla näkyvää aggressiota (pureminen ja raahaaminen) vierasta kohtaan ja merkitsin siihen käytetyn ajan JWatcher-ohjelman avulla. Siltä varalta, että aggressiota ei olisi, merkitsin myös antennointiin ja trofallaksiaan käytetyn ajan. Jotta ennako-odotukseni eivät vaikuttaisi tuloksiin, katsoin videot tietämättä, mitkä isäntä- ja vieraspesät milläkin videolla esiintyvät.

### **2.3.3 Tulosten tilastollinen analysointi**

JWatcherin työkaluilla sain tiedot siitä, kuinka pitkään mitäkin merkitsemääni käyttäytymistä esiintyi eri videoilla. Halusin selvittää, onko eri isäntä-vieraspariluokkien



(sama pesä, eri pesä samalla pellon osalla, saman pellon eri osa, eri pelto, eri laji) välillä eroja aggression määrässä. Lisäksi testasin, riippuuko aggression määrä Särkkilenillä pesien välisestä maantieteellisestä etäisyydestä. Muiden peltojen osalta en tehnyt tätä testiä, koska eri peltojen pesät lähtökohtaisesti kuuluvat eri yhteiskuntiin ja yhteiskuntien erillisyys itsessään on biologisesti järkevämpi selitys mahdolliselle aggressiolle kuin yhteiskuntien välinen etäisyys. Tein testit ensin koko aineistolla ja lisäksi erikseen poistettuani aineistosta Särkkilenin IV-alueen pesien väliset interaktiot. Nämä pesät ovat niin lähellä toisiaan, että ne hyvin todennäköisesti kuuluvat samaan yhteiskuntaan, eikä niiden välistä kanssakäymistä välttämättä ole mielekästä pitää samantasoisena kuin huomattavasti kauempana toisistaan sijaitsevien pesien.

Analysoin tuloksiani yleistetyillä lineaarisilla sekamalleilla (GLMM, *generalized linear mixed model*) olettaen binomiaalisen virhejakauman ja logit-linkkifunktion. Vaste-  
muuttujani oli kunkin toiston aggressiivisuus tai aggression puute. Aggressiivisuutta selittävänä tekijänä käytin ensimmäisessä mallissa vierastyöläisen alkuperää (sama pesä, eri pesä saman pellon samalla alueella, saman pellon eri alue, eri pelto, eri laji). Tein tällä mallilla neljä eri testiä: i) koko aineistolla; ii) koko aineistolla lukuun ottamatta IV-alueen pesien välisiä kokeita, iii) koko aineistolla siten, että olin jakanut Särkkilenin pesät vain kahteen alueeseen ja iv) edellisen ilman IV-alueen välisiä kokeita.

Toisessa mallissa selittävä muuttuja oli pesien välinen maantieteellinen etäisyys kilometreinä. Tein tämän analyysin kontrolleja lukuun ottamatta sekä kaikilla Särkkilenin pesäpareilla että poistettuani aineistosta IV-alueen sisäiset parit. Saman pesän kontrollin sisällyttäminen analyysiin olisi vääristänyt tuloksia, koska saman pesän yksilöiden välillä lähtökohtaisesti ei ole aggressiota.

Kumpaankin malliin sisällytin isäntäpesän satunnaisvaikutuksena, jolloin malli otti huomioon sen, että käytin samaa pesää kaikissa viidessä koekäsittelyssä. Lisäksi vältin näin samojen pesien välillä tekemistäni viidestä toistosta johtuvan pseudoreplikaation. Käytin analyysiini lme4 (versio 1.1-14) -pakettia (Bates ym. 2015) R:ssä (R Core Team 2017).

## 3 Tulokset

### 3.1 Populaation kartoitus

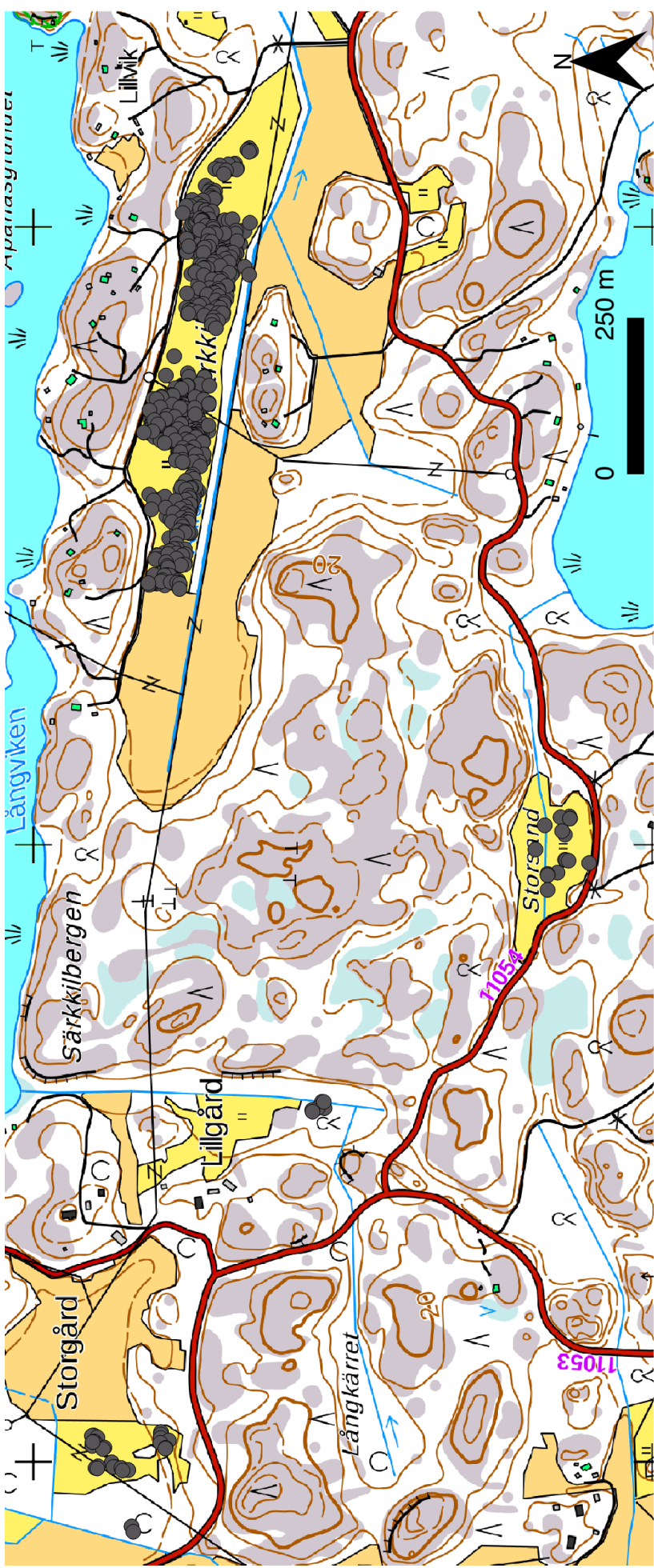
Kartoituksessa löysin pesiä paitsi superkolonian asuttamalta Särkkileniltä, myös peloilta Storsand, Lillgård ja Storgård (Taulukko 2 ja Kuva 4). Muilta kartoitetuilta alueilta, kuten tienvarsi- ja kalliohabitaateista, en löytänyt yhtäkään kaljuloviniskapesää. Löysin Särkkileniltä 1 386 loviniskamuurahaispesää, joista 344 olen määrittänyt kaljuloviniskaksi ja 23 karvaloviniskaksi. En ole määrittänyt lajia kaikista pesistä, mutta niiden pellon osien, joista olen määrittänyt lajin kaikista pesistä, perusteella on erittäin todennäköistä, että pesäkeskittymien keskellä olevat pesät ovat kaljuloviniskan. Arvioin täten löytäneeni yhteensä 1 355 kaljuloviniskapesää. Koska olen määrittänyt reuna-alueiden pesät, on arvioni todennäköisesti hyvin lähellä oikeaa. Niissä pellon osissa, joissa tein tarkastuslaskennan, olin varsinaisessa kartoituksessa havainnut 180 pesää, ja löysin tarkastuskierroksillani 33 uutta pesää. Tämän perusteella arvioituna löysin kartoituksessa 82 % pellon kaljuloviniskapesistä, ja pesiä on täten mahdollisesti 1 650. Pellolla elää myös monia muita, ekologiaaltaan erilaisia muurahaislajeja.

Taulukko 2. Löytämieni kaljuloviniskaesiintymien pinta-alat ja pesien määrät. Etäisyys on kunkin pellon lähimpänä Särkkileniä sijaitsevan pesän etäisyys lähimpään Särkkilenin pesään. \* Arvio, joka perustuu oletukseen, että kaikki superkolonia-alueiden keskiosien pesät ovat kaljuloviniskan.

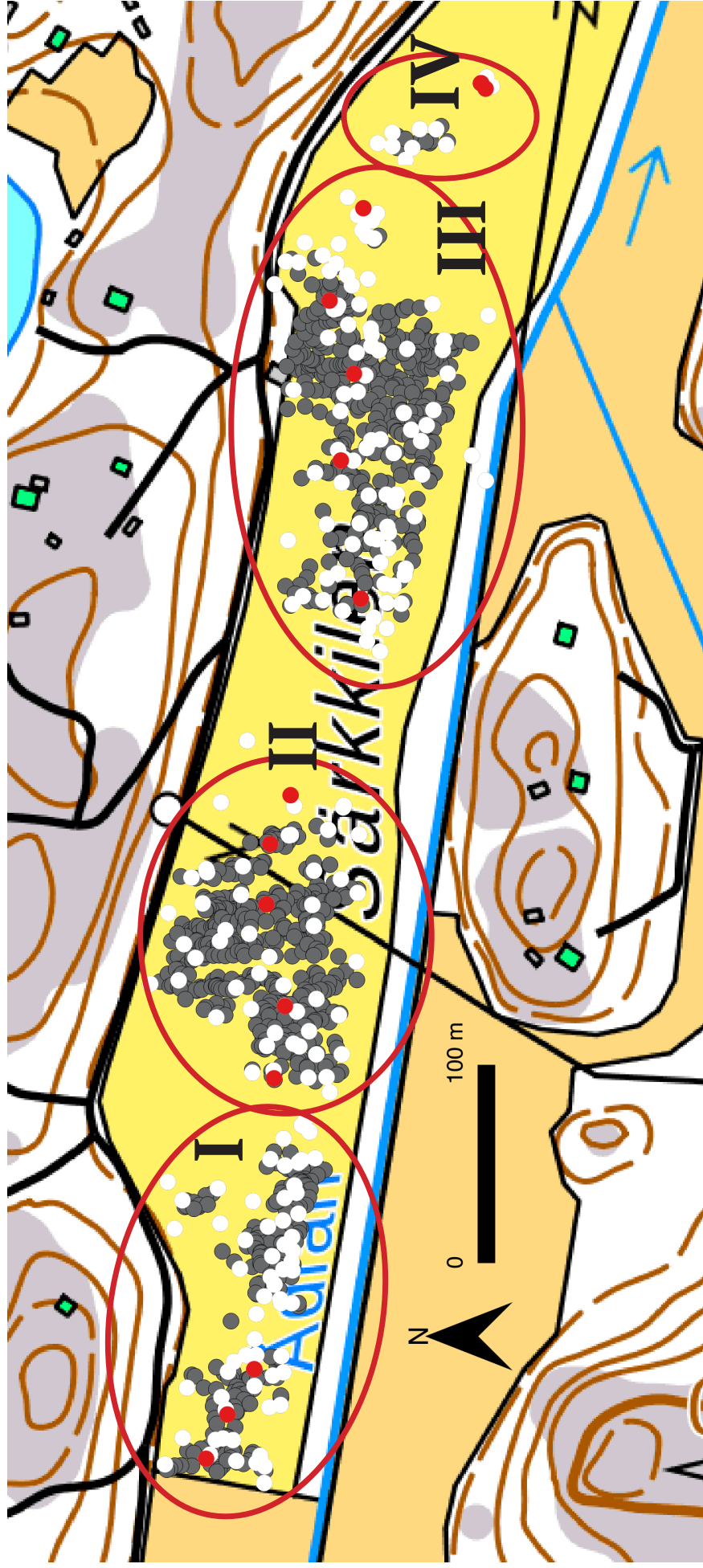
| Pelto     | Pinta-ala (m <sup>2</sup> ) | Etäisyys (m) | Kaljuloviniskapesiä | Genotyypitettyjä pesiä | Karvaloviniskan pesiä |
|-----------|-----------------------------|--------------|---------------------|------------------------|-----------------------|
| Särkkilen | 88 600                      | 0            | 1 355*              | 233                    | 23                    |
| Storsand  | 24 519                      | 700          | 16                  | 16                     | 6                     |
| Lillgård  | 2 282                       | 860          | 7                   | 7                      | 1                     |
| Storgård  | 19 112                      | 1 350        | 29                  | 29                     | 11                    |

### 3.2 Geneettinen aineisto

Lokuksista Fe11 (68 % puuttuvia tietoja) ja Fe21 (63 % puuttuvia tietoja) sain hyvin vähän aineistoa ja jätin nämä pois myöhemmistä analyyseistä. Lisäksi jätin P22:n pois



Kuva 4. Kaikki löytämäni kajaloviniskapesät. Monet pesistä ovat niin lähekkäin, että pisteet eivät kartalla erotu toisistaan. Karttapohja: Maanmittauslaitoksen avoimen aineiston Peruskarttasteri (10/2016).



Kuva 5. Kaikki Särkkilänlta löytämäni pesät (harmaat pisteet), genotyyppitettäviksi valitsemani pesät (valkoiset pisteet), käyttäytymiskokeessa käyttämäni jako neljään osaan (roomalaiset numerot ja punaiset soikiot) sekä käyttäytymiskokeessa mukana olleet pesät (punaiset pisteet). IV-alueen pesät ovat niin lähekkäin, että kolme punaista pistettä ovat kartalla päällekkäin. Kolmelta muulta pellolta genotyyppitin kaikki kuvassa 3 näkyvät pesät. Karttapohja: Maanmittauslaitoksen avoimen aineiston Peruskarttarasteri (10/2016).

myöhemmistä analyyseistä huomattavan heterotsygoottivajauksen takia. Täydet tiedot populaatioiden alleelifrekvensseistä sekä HWT- ja kytkentäepätasapainotestien tuloksista ovat Liitteen taulukoissa.

Muiden lokusten osalta puuttuvia tietoja oli enimmillään 34 % (Fe37) ja muuten puuttuvia tietoja oli 3–22 %. Lokus FY7 erosi HWT:sta Särkkilenillä ja Storgårdilla ja lokukset Fe19, Fe16 ja Fe11 erosivat HWT:sta Särkkilenillä (Liite, Taulukot L1 ja L2). Löysin tilastollisesti merkitsevää kytkentäepätasapainoa koko populaatiota tarkasteltaessa viiden, Särkkilenillä yhdeksän, Storsandilla viiden ja Storgårdilla kuuden lokusparin välillä (Liite, Taulukko L4). Koska mikään näistä lokuspareista ei ole kytkentäepätasapainossa kaikissa osapopulaatioissa, sisällytin lokukset myöhempisiin analyyseihin. Tilastollisesti merkitsevää heterotsygoottivajautta on lokuksissa Fe16 ja Fe19, mutta vain Särkkilenosapopulaatiossa (Liite, Taulukko L3).

Mantelin testillä löysin tilastollisesti merkitsevää geneettistä viskositeettia tarkastellessani koko populaatiota, koko populaatiota Särkkileniä lukuun ottamatta, Särkkileniä yksin ja Storgårdia yksin. Storgårdin tulos ei muuttunut, kun poistin aineistosta yhdeksän erillään pääasiallisesta pesäkeskittymästä sijaitsevaa pesää (ks. Kuva 4). Storsandin tai Lillgårdin sisällä ei ollut geneettistä viskositeettiä. Mantelin testien tulokset ovat Taulukossa 3.

Parittaisten  $F_{ST}$  arvojen keskiarvot (Taulukko 4) osoittavat, että Särkkilen, käsiteltiinpä sitä yhtenä tai kahtena osapopulaationa, ei ole eriytynyt muista osapopulaatioista enempää kuin muut osapopulaatiot eroavat toisistaan. Lisäksi Särkkilenin eri alueiden välillä on yhtä suuria eroja kuin Särkkilenin ja muiden osapopulaatioiden välillä. AMOVAn tuottamien parittaisten  $F_{ST}$ -arvojen mukaan tutkimuspopulaation eri osien välillä joka tapauksessa on tilastollisesti merkitseviä geneettisiä eroja (Taulukko 5).

BAPS-analyysin mukaan aineistoa selittää parhaiten jako kahteen ryhmään (Kuva 6). BAPSin laskema todennäköisyys kahdelle ryhmälle on 0,996 ja kolmelle ryhmälle 0,004. Kymmenen todennäköisintä jakoa koostuu kahdesta ryhmästä. Ensimmäinen ryhmä (kuvan punaiset ympyrät) käsittää pääosan Särkkilenin länsiosasta, mutta myös muutamia pesiä Särkkilenin itäosassa ja Storgårdilla. Toinen ryhmä (mustat kolmiot) käsittää pääosan Särkkilenin itäosasta ja kolmesta muusta pellostä sekä vähemmistön



Taulukko 3. Mantelin testin tulokset.  $N$  on genotyypitettyjen pesien lukumäärä,  $R_{xy}$  on Mantelin testin korrelaatiokerroin (suluissa 95 %:n luottamusväli),  $P$  on 1 000 permutaatioon perustuva kaksisuuntainen  $P$ -arvo ja  $R^2$  on aineistoon sovitetun regressiomallin selityskerroin.

| Osapopulaatio     | $N$ | $R_{xy}$           | $P$   | $R^2$ |
|-------------------|-----|--------------------|-------|-------|
| Kaikki            | 285 | 0,06 (0,04–0,08)   | 0,038 | 0,003 |
| Ilman Särkkileniä | 52  | 0,08 (0,03–0,14)   | 0,039 | 0,007 |
| Särkkilen         | 233 | 0,10 (0,09–0,12)   | 0,001 | 0,010 |
| Storsand          | 16  | -0,07 (-0,17–0,03) | 0,500 | 0,004 |
| Lillgård          | 7   | 0,15 (-0,01–0,47)  | 0,608 | 0,023 |
| Storgård          | 29  | 0,41 (0,35–0,47)   | 0,001 | 0,172 |

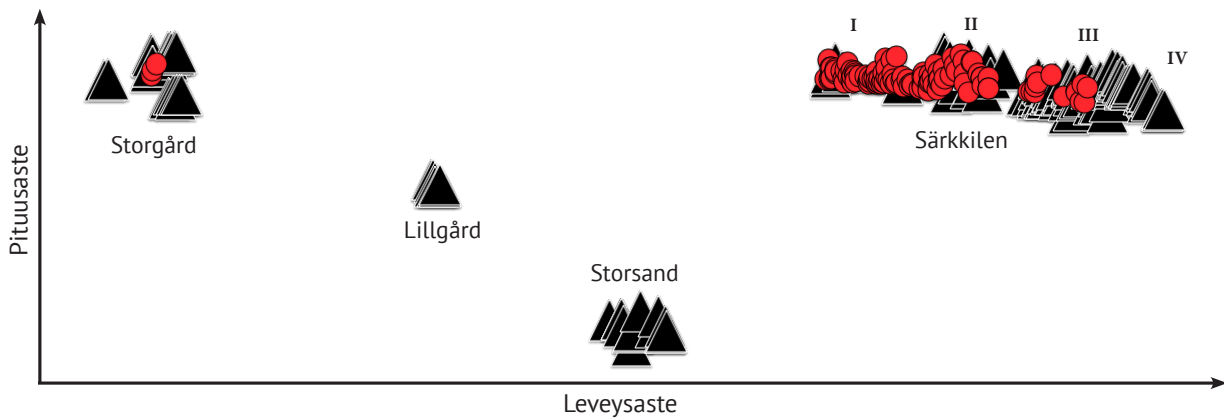
Taulukko 4. Mikrosatelliittiaineiston ominaisuuksia. A. Särkkilen yhtenä osapopulaationa. B. Särkkilen kahtena osapopulaationa.  $N$  = osapopulaation pesien lukumäärä,  $N_A$  = kunkin lokuksen alleelin lukumäärän keskiarvo,  $AR$  = kunkin lokuksen alleelirikkauden (*allelic richness*, otoskoolla korjattu alleelien määrä) keskiarvo,  $H_h$  = havaittu heterotsygotia,  $H_e$  = odotettu heterotsygotia,  $F_{IS}$  = sisäsiitoskerroin,  $F_{ST}$  = parittaisten  $F_{ST}$ -arvojen keskiarvo.

| Alue            | $N$ | $N_A$ | $AR$ | $H_h$ | $H_e$ | $F_{IS}$ | $F_{ST}$ |
|-----------------|-----|-------|------|-------|-------|----------|----------|
| A               |     |       |      |       |       |          |          |
| Koko Särkkilen  | 233 | 8,2   | 4,3  | 0,72  | 0,74  | 0,031    | 0,038    |
| Storsand        | 16  | 4,6   | 3,6  | 0,67  | 0,66  | -0,005   | 0,058    |
| Lillgård        | 7   | 4,1   | 3,5  | 0,60  | 0,59  | 0,002    | 0,066    |
| Storgård        | 29  | 6,1   | 4,0  | 0,70  | 0,71  | 0,021    | 0,042    |
| B               |     |       |      |       |       |          |          |
| Särkkilen itä   | 111 | 7,6   | 4,3  | 0,72  | 0,74  | 0,016    | 0,060    |
| Särkkilen länsi | 122 | 7,9   | 4,2  | 0,71  | 0,73  | 0,028    | 0,044    |
| Storsand        | 16  | 4,6   | 3,6  | 0,67  | 0,66  | -0,005   | 0,061    |
| Lillgård        | 7   | 4,1   | 3,5  | 0,60  | 0,59  | 0,002    | 0,068    |
| Storgård        | 29  | 6,1   | 4,0  | 0,70  | 0,71  | 0,021    | 0,046    |

Taulukko 5. Parittaiset  $F_{ST}$ -arvot, kun Särkkilen on jaettu käyttäytymiskokeen rajoja mukaillen (Kuva 3 B) mukaisesti neljään osaan. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ .  $P$ -arvot perustuvat 999 permutaatioon. Suluissa ovat genotyypitettyjen pesien lukumäärät kullakin alueella.

|                    |             |              |               |              |          |          |
|--------------------|-------------|--------------|---------------|--------------|----------|----------|
| Särkkilen I (66)   | Särkkilen I |              |               |              |          |          |
| Särkkilen II (56)  | 0,057***    | Särkkilen II |               |              |          |          |
| Särkkilen III (97) | 0,041***    | 0,014***     | Särkkilen III |              |          |          |
| Särkkilen IV (14)  | 0,067***    | 0,043***     | 0,032***      | Särkkilen IV |          |          |
| Storsand (16)      | 0,034***    | 0,078***     | 0,062***      | 0,094***     | Storsand |          |
| Lillgård (7)       | 0,041***    | 0,037**      | 0,011         | 0,044*       | 0,088*** | Lillgård |
| Storgård (29)      | 0,026***    | 0,087***     | 0,060***      | 0,101***     | 0,038*** | 0,055*** |

Särkkilenin länsiosan pesistä. Geneettistä sekoittumista BAPS ei löytänyt.



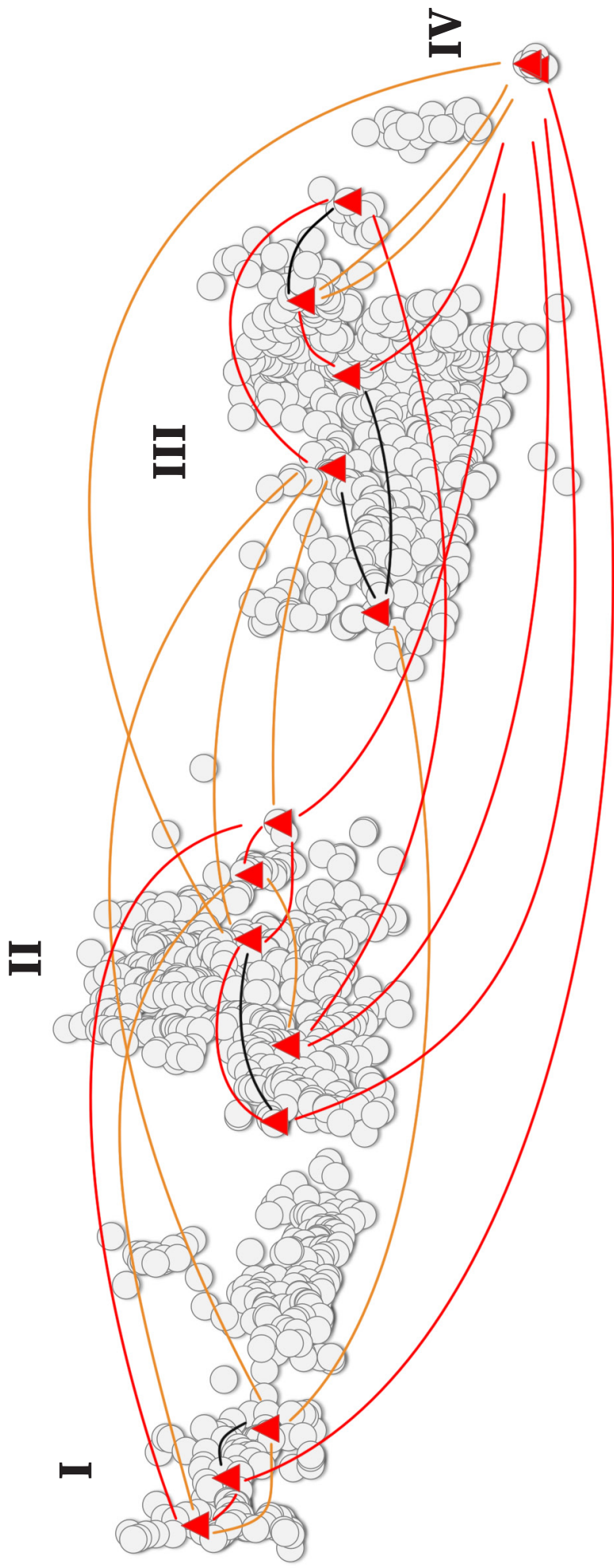
Kuva 6. BAPS-analyysin tuottama kaikista todennäköisin jako kahteen ryhmään (mustat kolmiot ja punaiset ympyrät). Kuvan mittasuhteet ovat suuntaa antavat. Musta ryhmään kuuluu 169 ja punaiseen 116 pesää.

### 3.3 Käyttäytymiskokeet

Yhteensä 400:stä videoimastani toistosta 393 osoittautui käyttökelpoisiksi ja seitsemän toiston osalta videon kuvaus epäonnistui tai tiedosto vaurioitui myöhemmin. Epäonnistuneista toistoista kuusi oli karvaloviniskakokeita ja yksi oli saman alueen koe.

Kontrollikokeista yhdessäkään yhteensä 80 toistosta ei esiintynyt aggressiota, kun taas eri lajin ollessa vieraana isännät olivat aggressiivisia 71:ssä yhteensä 74 toistosta. Kontrollia lukuun ottamatta havaitsin aggressiota kaikkia eri vierasluokkia kohtaan. Kaikissa muissa luokissa aggressiota oli merkitsevästi enemmän kuin kontrollissa (Taulukko 6). Kuvassa 7 näkyy eri pesäparien välinen aggressiivisuus Särkkilennpellolla, ja Kuvassa 8 on tietoja siitä, monessako kullakin isäntä-vierasparilla tekemistäni toistoista ainakin yksi työläinen käyttäytyy aggressiivisesti.

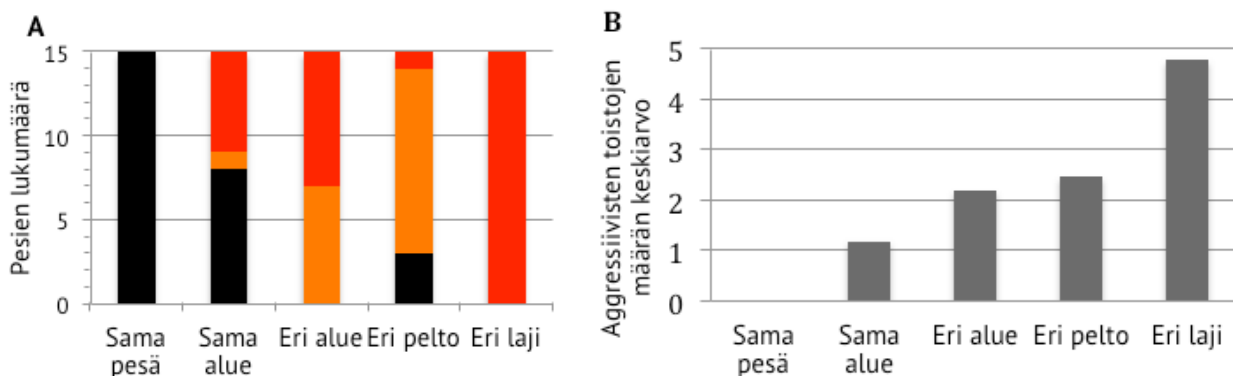
Taulukossa 6 ovat GLMM-testin tulokset. Kaikki muut vierasluokat kohtasivat enemmän aggressiota kuin kontrolliluokka. Eri alue kohtasi enemmän aggressiota kuin sama alue, mutta kun poistin aineistosta IV-alueen pesät, ei ero enää ollut tilastollisesti merkitsevä. Myöskään eri pellon ja eri alueen kohtaaman aggression määrän ero ei ole merkitsevä, mutta eri laji kohtasi merkitsevästi enemmän aggressiota kuin eri pellon kaljuloviniska.



Kuva 7. Käyttäytymiskokeen pesäparit Särkkilenillä. Kokeessa mukana olleet pesät on merkitty punaisilla kolmioilla ja muut pesät harmailla ympyröillä. Mustalla viivalla on merkitty pesäparit, joiden välillä ei ollut aggressiota, oranssilla ne, joiden välillä aggressiota oli vain yhdessä toistossa ja punaisella ne, joiden välillä aggressiota oli kahdessa tai useammassa toistossa. Yhdessä tapauksessa testasin samoja kahta pesää kumpaankin suuntaan. Kuvassa päällekkäin olevien IV-alueen pesien välisiä pareja ei ole merkitty. Näiden pesien välillä ei ollut lainkaan aggressiota.



Kun määrittelin Särkkilenin alueet uudelleen siten, että jaoin selvimmän maantieteellisen eron (Kuvan 3 B:n alueet I ja II vs. III ja IV) perusteella pellon vain kahteen alueeseen, saman alueen eri pesä kohtasi edelleen useammin aggressiota kuin kontrolli (estimaatti =  $3,65 \pm 1,06$ ;  $z = 3,50$ ;  $P = 0,0006$ ). Eri pellonpuolikkaiden välillä oli enemmän aggressiota kuin saman pellonpuolikkaan sisällä (estimaatti =  $0,90 \pm 0,41$ ;  $z = 2,19$ ;  $P = 0,03$ ) mutta ero ei ole tilastollisesti merkitsevää. Eri pellon ja eri Särkkilen-osan välinen ero ei tässäkään jaossa ole merkitsevää (estimaatti =  $0,21 \pm 0,40$ ;  $z = 0,53$ ;  $P = 0,59$ ).



Kuva 8. A. Aggressiivisesti käyttäytyneiden pesien lukumäärä eri pesien vieraita kohtaan. Palkit osoittavat yhdessä ja useammassa viidestä kokeen toistossa aggressiivisesti käyttäytyneiden pesien lukumäärän. Musta = ei aggressiota yhdessäkään toistossa, oranssi = aggressiota vain yhdessä toistossa ja punainen = aggressiota kahdessa tai useammassa toistossa. Kokeessa oli mukana 16 pesää, mutta yhdestä en saanut riittävää aineistoa, joten tässä vertailussa on mukana 15 pesää. B. Keskiarvo aggressiivisten toistojen määrälle kussakin luokassa.

Taulukko 6. GLMM:n tuloksia. Estimaatti on käyttämäni mallin kulmakertoimen estimaatti,  $S$  on keskiarvon keskivirhe,  $z$  on Waldin testisuureen arvo ja  $P$  on tuloksen todennäköisyys nolлахypoteesin (ei eroa kontrolliin) vallitessa. A. Eri vieraslukkien vertailu kontrolliin. B. Vieraslukkien välinen parittainen vertailu.

| Vieraan alkuperä                        | Estimaatti $\pm S$ | $z$  | $P$      |
|---|--------------------|------|----------|
| <b>A</b>                                |                    |      |          |
| Sama alue                               | $3,50 \pm 1,07$    | 3,21 | 0,001    |
| Sama alue ilman IV-alueetta             | $3,76 \pm 1,07$    | 3,50 | 0,0005   |
| Eri alue                                | $4,42 \pm 1,07$    | 4,13 | < 0,0001 |
| Eri pelto                               | $4,77 \pm 1,07$    | 4,46 | < 0,0001 |
| Eri laji                                | $8,37 \pm 1,23$    | 6,83 | < 0,0001 |
| <b>B</b>                                |                    |      |          |
| Eri alue – sama alue                    | $0,09 \pm 0,38$    | 2,39 | 0,017    |
| Eri pelto – sama alue                   | $1,27 \pm 0,38$    | 3,30 | 0,001    |
| Eri alue – sama alue ilman IV-alueetta  | $0,60 \pm 0,40$    | 1,53 | 0,126    |
| Eri pelto – sama alue ilman IV-alueetta | $0,96 \pm 0,40$    | 2,44 | 0,015    |
| Eri pelto vs. eri alue                  | $0,36 \pm 0,35$    | 1,01 | 0,314    |
| Eri laji vs. eri pelto                  | $3,60 \pm 0,67$    | 5,40 | < 0,0001 |

Kun poistin aineistosta IV-alueen pesien väliset parit, eri pellon ja saman alueen välillä ei enää löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa (estimaatti = 0,62;  $\pm$  0,42;  $z = 1,46$ ;  $P = 0,14$ ), mutta eri pellon pesä kohtasi edelleen merkitsevästi enemmän aggressiota kuin saman pellon saman alueen pesä. (estimaatti = 0,86  $\pm$  0,36;  $z = 2,38$ ;  $P = 0,017$ ).

Särkkilenillä aggressio korreloi positiivisesti maantieteellisen etäisyyden kanssa Särkkilenillä (estimaatti = 3,41  $\pm$  1,18;  $z = 2,88$ ;  $P = 0,004$ ). Sama analyysi ilman IV- aluetta antaa heikomman, mutta edelleen tilastollisesti merkitsevän korrelaation (estimaatti = 2,60  $\pm$  1,21;  $z = 2,15$ ;  $P = 0,032$ ).

## 4 Tulosten tarkastelu

Löysin tutkimaltani pelloilta tähän mennessä suurimman tunnetun kaljuloviniskan pesäkeskittymän. Pelto on myös ylipäänsä suurimpia tunnettuja loviniskamuurahaiskeskittyviä. Tulosteni perusteella populaatiossa on viskositeettia ja geenivirta peltojen välillä on rajoittunutta. Superkolonia ei kuitenkaan ole geneettisesti eristynyt koko muusta populaatiosta. Tulokseni eivät näin ollen tue hypoteesia nimenomaan superkolonian tytärkuningatarten levittäytymättömyydestä. Käyttäytymiskokeissa havaitsin huomattavaa aggressiota muiden peltojen työläisiä kohtaan sekä yllättäen myös oletamani superkolonian pesien välillä. Tulos haastaa käsityksemme loviniskamuurahaisten superkoloniaalisen elämäntavan luonteesta.

### 4.1 Populaation kartoitus

Särkkilen on selvästi suurin tunnettu kaljuloviniskan pesäkeskittymä (Czechowski 1971, 1975, Markó ym. 2012). Varsinaisen kartoituksen jälkeen tekemäni tarkastuslaskennan perusteella löysin suurimman osan pellon pesistä, ja pesiä on ainakin 1 367. Tarkastuslaskennan tuloksen yleistäminen koko peltoa koskevaksi havaittujen pesien osuudeksi on kuitenkin vain suuntaa antava arvio, koska tarkastuslaskennan otos on pieni, pesien havaitseminen on paikoin vaikeaa ja osa pesistä on voinut kuolla kesän aikana. Pesät, joita en varsinaisessa kartoituksessa havainnut ovat voineet olla kesän

aikana syntyneitä, varsinaisen kartoituksen aikana vaikeasti havaittavan pieniä, tai alun perin hylätyiksi tulkitsemiani pesiä. Pesien hylkääminen ja uudelleen käyttöön ottaminen kaljuloviniskalle ominaista (Bönsel 2007). Särkkilenin pesäkeskittymän ikä ei ole tiedossa, mutta pelto on ollut viljelemättömänä 1970-luvulta lähtien ja on sen jälkeen tulvinut vain parina vuotena 1980-luvulla (keskustelu 22.3.2007, Patrick Forsbom). Muurahaisilla on siis ollut paljon aikaa kansoittaa Särkkilen.

Vaikka Särkkilenin populaatio jakautuu kahteen isoon keskittymään, on pesien sijoittuminen pellolla muuten melko yhtenäistä. Lisäksi varsinkin pellon itäpäässä ja eteläreunalla on suuria, maastoltaan loviniskamuurahaiselle sopivilta näyttäviä alueita täysin vailla pesiä (Kuva 5). Tämä viittaa siihen, että keskipitkän matkan levittäytyminen ja uusien alueiden kolonisoiminen Särkkilenin sisällä on todennäköisesti harvinaista. Särkkilenin ohella löysin pesiä vain kolmelta muulta hylätyltä pellolta, vaikka kartoitin alueen sopivia habitaatteja melko kattavasti. Myöskään kilpailevien lajien laajoja pesäkeskittymiä ei näiltä alueilta löytynyt. Tämäkin on merkki joko kaljuloviniskan rajallista levittäytymisestä tai sen heikosta kyvystä perustaa pesiä levittäytymisen jälkeen.

## 4.2 Geneettinen viskositeetti ja populaation rakenne

Tulokseni osoittavat populaation olevan viskoosinen, sillä pesien välinen geneettinen etäisyys kasvaa maantieteellisen etäisyyden mukana. Geneettinen viskositeetti viittaa vähäiseen levittäytymiseen tai levittäytymiseen lähinnä pesien jakautumisen myötä (Sundström ym. 2005). Pesien jakautuessa sukua toisilleen olevat tytärukuningattaret jäävät lähelle toisiaan. Pesien välisen yhteyden säilyessä työläiset voivat vapaasti liikkua näiden pesien välillä, mutta havaitsemani viskositeetti kertoo myös, että työläiset eivät liiku rajattomasti koko superkolonian alueella. Havaitsemani geneettinen viskositeetti tukee hypoteesia, että suuri osa tytärukuningattarista ei levittäydy siivin, vaan jää synnyinpesiinsä tai niiden lähelle.

Särkkilen ja Storgård ovat isoja ja tiheitä pesäkeskittymiä, joissa viskositeetti viittaa odottamaani vähäiseen pitkän matkan levittäytymiseen. Viskositeetin puuttuminen Storsandilla ja Lillgårdilla voi selittyä sillä, että pesien väliset etäisyydet näillä pelloilla ovat niin pieniä, että työläiset voivat liikkua runsaasti kaikkien pesien välillä. Toisaalta

Storsandin populaatio on väljempi kuin Storgårdin ja Särkkilenin, mikä voi kertoa osapopulaation nuoresta iästä ja siitä, että pesät eivät ole ehtineet jakautua kovin moneen kertaan. Tämäkin voi selittää viskositeetin puuttumista Storsandilla. Lillgårdilla on niin vähän pesiä, että populaatio voi olla nuori ja pesät voivat hyvin olla yhden kolonisointitulos. Tällöin tilastollisesti merkitsevän viskositeetin puuttuminen ei olisi yllättävää, varsinkaan populaatiokoon ollessa vain seitsemän pesää.

Aikaisemmissa tutkimuksissa *Formica*-muurahaisilla geneettistä viskositeettia on havaittu *F. paralugubriksen* (Chapuisat ym. 1997), karvakekomuurahaisen (*F. lugubris*) (Gyllenstrand & Seppä 2003) ja karvaloviniskan (Pamilo & Rosengren 1984, Liautard & Keller 2001, Seppä ym. 2012) isoissa monipesäisissä yhteiskunnissa. Tulokseni on siis hyvin linjassa aikaisemman tutkimuksen kanssa ja vahvistaa käsitystä, että superkolonion kasvaminen pesien jakautumisen myötä on hyvin yleistä ja johtaa geneettiseen viskositeettiin. Chapuisat ym. (1997) tutkivat myös superkolonion ympärillä olevia yhteiskuntia, ja näiden välillä ei ollut viskositeettia. Toisin kuin kaikki minun tutkimuspeltoni, nämä olivat yksipesäisiä yhteiskuntia, eivätkä siis olleet kasvaneet pesien jakautumisten myötä. Chapuisat'n ym. (1997) tutkimuksen perusteella geneettinen viskositeetti siis liittyy nimenomaan monipesäisyyteen.

$F_{ST}$ -arvojen perusteella peltojen välillä on etäisyysisolaatiota, eli geenivirta eri peltojen välillä on ollut rajallista. Tämä on merkki vähäisestä levittäytymisestä populaatiossa, mistä kertoo myös se, että pesiä ylipäänsä löytyi vain neljästä paikasta, vaikka sopivaa elinympäristöä on alueella runsaasti. Se, että kaikkea sopivaa elinympäristöä ei ole kolonisoitu, on odotettua, koska elinympäristö on laikuittainen ja eri peltojen välissä on metsää, koska tilapäisloinen on riippuvainen isäntälajiensa esiintymisestä ja koska uudet yhteiskunnat joutuvat kilpailemaan alueella jo olevien saman ja muiden lajien yhteiskuntien kanssa (Peeters & Molet 2010). Aikaisemman tutkimuksen mukaan karvaloviniska on heikko levittäytyjä (Vitikainen ym. 2015). Tämä voi antaa viitteitä monella tavalla elintavoiltaan karvaloviniskaa muistuttavan kaljuloviniskan levittäytymisestä, mutta kaljuloviniskan levittäytymistä ei ole tutkittu tarkemmin.

Fyysisten leviämisesteiden lisäksi vähäinen geenivirta voi johtua siitä, että jälkeläiset hypoteesini mukaisesti vapaaehtoisesti jäävät synnyinpesiinsä tai niiden lähelle. Tutkimassani populaatiossa tämäkin on todennäköistä, koska viskositeetti viittaa

pesien jakautumiseen, ja sekä Särkkilenillä (Heikki Helanterän julkaisemattomat havainnot) että muualla lähiseudulla tutkituissa kaljuloviniskan superkolonioiden pesissä (Helanterä & d’Ettorre 2015) on ollut kymmeniä lisääntyviä kuningattaria.

BAPS-analyysi jakaa populaation kahteen ryhmään niin, että muut osapopulaatiot ryhmittyvät pääosin samaan ryhmään kuin Särkkilenin itäpää. Särkkilenin länsipää, joka sijaitsee maantieteellisesti lähempänä muita osapopulaatioita, muodostaa pääasiallisesti oman ryhmänsä. Tämän perusteella näyttää siltä, että Särkkilenin itä- ja länsipää on kolonisoitu erikseen. BAPSin löytämä rakenne on kuitenkin heikko, ja se löytyy vain, kun ryhmien muodostamisessa hyödynnetään pesien sijaintitietoja.  $F_{ST}$ -arvot eivät myöskään tue vahvaa jakoa juuri BAPSin löytämien ryhmien välillä.

BAPS-tulosten ja  $F_{ST}$ -arvojen välinen lievä ristiriita voi kertoa siitä, että löytämäni geneettinen rakenne on heikko: jos populaatiossa olisi vahva tietynsuuntainen geneettinen rakenne, olisi epätodennäköistä, että se näyttäisi eri menetelmillä tutkittuna erilaiselta. Esimerkiksi Vogel ym. (2009) järjestivät BAPSilla argentiinanmuurahaisen populaation 11:een ryhmään, jotka olivat täysin linjassa heidän käyttäytymisen ja mitokondrio-DNA-haplotyyppien mukaan tekemänsä jaon kanssa. Vogel ym. (2009) tutkivat yhteiskunnat sijaitsevat osin hyvinkin lähellä toisiaan, ja pidän huomionarvoisena, ettei BAPS minun tutkimuksessani järjestänyt edes satojen metrien päässä toisistaan sijaitsevien eri peltojen pesiä eri ryhmiin.

### 4.3 Särkkilen ei ole suljettu populaatio

Särkkilen ei  $F_{ST}$ -arvojen perusteella ole sen eristyneempi osapopulaatio kuin muutkaan pellot, ja geneettisen rakenteen heikkous viittaa geenivirtaan peltojen välillä. Toisin kuin sukulaivalintateorian pohjalta odotin, näyttää siis siltä, että superkolonia ei ole suljettu populaatio vailla levittäytymistä ulospäin.

Seppä ym. (2004) saivat erilaisen tuloksen, kun he tutkivat karvaloviniskan superkolonioita ja lähialueiden yksipesäisiä yhteiskuntia. Monipesäiset yhteiskunnat erosivat selvästi muusta populaatiosta, joka oli melko yhtenäinen. Lisäksi monipesäiset yhteiskunnat olivat geneettisesti etäämpänä toisistaan kuin yksipesäisistä yhteiskunnista,

mikä viittaa vähäiseen levittäytymiseen nimenomaan monipesäisistä yhteiskunnista. Samansuuntaisia tuloksia saivat Gyllenstrand ym. (2005) kantomuurahaisella (*Formica truncorum*). Chapuisat ym. (2004) sen sijaan eivät löytäneet geneettistä rakennetta *Formica selysi* -populaatiossa, jossa on sekä yksi- että monikuningattarisia yhteiskuntia. Chapuisat ym. (2004) pitävät todennäköisenä, että yksikuningattaristen pesien levittäytyminen riittää tasoittamaan geenivirran, kun yksi- ja monikuningattariset pesät sijaitsevat lähekkäin. Lisäksi heidän tutkimansa *F. selysi* -populaatio koostuu kokonaan yksipesäisistä yhteiskunnista. Täten se eroaa merkittävästi Sepän (2004), Gyllenstrandin (2004) ja minun tutkimuspopulaatioista, joissa pesät ovat suurimmaksi osaksi paitsi monikuningattarisia myös monipesäisiä.

Näen kolme pääasiallista selitystä hypoteesini vastaiselle tulokselle. Ensimmäkin osapopulaatioiden välillä voi olla kohtalaisen merkittävää geenivirtaa. Toiseksi levittäytymistä ei ehkä juuri ole Särkkileniltä poispäin, muttei myöskään muilta alueen pelloilta. Kolmanneksi on mahdollista, että Särkkilen on naaraiden, muttei koiraiden, geenivirran osalta eristynyt muusta populaatiosta, ja että tämä Chapuisat'n ym. (2004) ehdottamalla tavalla ei näy mikrosatelliittitutkimuksessa.

Tarkastelen ensin vaihtoehtoa, että geenivirta peltojen välillä on kohtalaisen merkittävää. Ilmiön voi selittää sillä, ettei ole kulunut riittävän pitkää aikaa, jotta luonnonvalinta olisi ehtinyt johtaa tytärkuningatarten levittäytymättömyyskäyttäytymisen merkittävään yleistymiseen. Vaikka levittäytyjät olisivat vähemmistössä, voivat ne riittää tasoittamaan eroja eri osapopulaatioiden välillä huomattavasti (Slatkin 1987). Vaikka sukulaisuus olisi nolla, voi levittäytyminen kannattaa, jos tytärkuningattaren mahdollisuudet lisääntymiseen vanhassa pesässä ovat äärimmäisen pienet. Useilla lajeilla eri kuningatarten lisääntymispanokset eroavat toisistaan ja joidenkin kuningatarten lisääntymismenestys voi olla erittäin heikko (Ross 1988, Pamilo & Seppä 1994, Bargum & Sundström 2007, Kümmerli & Keller 2007). Tällaisessa tilanteessa tytärkuningattaren oma kelpoisuus ei välttämättä lisääny pesään jäämällä, ja Hamiltonin (1964a) yhtälössä pesään jäämisen tuoma hyöty ja haitta lähestyisivät kumpikin nollaa. Tällöin tytärkuningattaren kannattaisi levittäytyä, jos sillä on minimaalinenkin mahdollisuus pysyä hengissä ja perustaa oma pesä. On kuitenkin huomattava, että tällaisen tilanteen syntyminen on epätodennäköistä. Vaikka osa pesän kuningattarista ei lainkaan pääsisi lisääntymään, voi todennäköisyys päästä yhdeksi pesän lisääntyvistä kuningattarista olla

suurempi kuin todennäköisyys onnistua oman pesän perustamisessa. Lisäksi kuningatar, joka jonakin aikana ei pääse lisääntymään, voi myöhemmin päästä lisääntymään vanhan kuningattaren kuollessa tai pesän jakautuessa.

Toinen mahdollinen selitys tulokselleni on, että levittäytyminen on yhtä lailla rajoitunutta kaikkien peltojen välillä. Myös muiden peltojen kuin Särkkilenin yhteiskunnat näyttävät pesien lähekkäisyyden vuoksi monipesäisiltä ja lienevät monikuningattarisia, kuten useimmat muut Etelä-Suomessa tutkitut kaljuloviniskayhteiskunnat (Pamilo & Rosengren 1984, Helanterä & d’Ettorre 2015). Jos yhteiskuntien sisäinen sukulaisuus on hyvin alhaista myös Storgårdilla, Storsandilla ja Lillgårdilla, toimivat nämäkin osapopulaatiot sukulaisvalinnan näkökulmasta kuin superkoloniat, vaikkei pesiä ole läheskään niin paljon kuin Särkkilenillä.

Sepän ym. (2004) tutkimuksessa kymmenien pesien yhteiskunnista, jotka siis ovat Storgårdin kokoluokkaa, oli vähemmän levittäytymistä ulospäin kuin yksipesäisistä yhteiskunnista. Myös sukulaisuus oli monissa Sepän ym. (2004) tutkimista pesistä hyvin alhainen. Tämän perusteella *Formica*-superkolonian ei tarvitse olla kovin suuri, jotta luonnonvalinta suosisi levittäytymättömyyttä tai vähäistä levittäytymistä. Storgårdilla havaitsemani geneettinen viskositeetti tukee ajatusta vähäisestä levittäytymisestä siellä. Viskositeetin puuttuminen Storsandilla ja Lillgårdilla voi selittyä pienellä pesämäärällä ja työläisten sekoittumisella, vaikka tytärkuningattaret eivät sielläkään juuri levittäytyisi. Superkoloniaa ympäröivien yhteiskuntien ilmeinen monipesäisyys erottaakin tutkimuspopulaationi oleellisesti Sepän ym. (2004) tutkimasta ja voi selittää eron tuloksissa. Kuitenkin tulosteni  $F_{ST}$ -arvot ovat, joskin merkitsevästi nollassa suurempia, melko alhaisia, ja BAPS-tulos kertoo melko yhtenäisestä populaatiosta. Siksi pidän todennäköisenä, että levittäytymistä eri peltojen välillä on ainakin jonkin verran.

Kolmas selitykseni on, että Särkkilenin tytärkuningattaret hypoteesini mukaisesti eivät levittäydy, mutta että tämä ei näy mikrosatelliitteja tarkasteltaessa. Jos pesät tuottavat lähinnä koiraita tai jos koiraiden ja tytärkuningatarten kohtaamat valintapaineet ovat erilaiset, voi olla, että koiraat levittäytyvät mutta naaraat eivät. Tällöin tulokseni selittyy sillä, että koiraiden levittäytyminen riittää geenivirran tasoittamiseen. Aikaisempi tutkimus tukee tätä mahdollisuutta. Tutkimus maternaalisesti periytyvällä mitokondrio-DNA:lla paljasti mikrosatelliitteja vahvemman rakenteen karvaloviniskalla (Seppä



ym. 2004), karvakekomuurahaisella (Gyllenstrand & Seppä 2003) ja kantomuurahaisella (Gyllenstrand ym. 2005). Liautard ja Keller (2001) tutkivat pelkästään mitokondrio-DNA:ta ja löysivät karvaloviniskan monipesäisten yhteiskuntien välillä voimakkaan rakenteen. On siis vahvaa näyttöä sille, että nimenomaan naaraiden levittäytymättömyys selittää suuren osan geneettisestä rakenteesta tutkimani kaltaisissa populaatioissa. Tutkimusalueeni pesien jälkeläisten sukupuolijakauma vaikuttaa huomattavan koirasvoittoiselta (omat havaintoni laboratoriopesistä, Sanja Hakalan julkaisemattomat havainnot Särkkileniltä), ja myös Schultnerin ym. (2014) tutkimissa kaljuloviniskapesissä sukupuolijakauma oli vahvasti koirasvoittainen. Koirasvoittainen sukupuolijakauma voi häivyttää aineistostani tytärkuningatarten levittäytymättömyyden vaikutuksen.

Kolme yllä esittelemääni selitystä eivät sulje toisiaan pois, vaan voivat kaikki vaikuttaa hypoteesini vastaisen tuloksen taustalla. Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu muiden *Formica*-lajien superkolonioiden tytärkuningatarten levittäytyvän yksipesäisten yhteiskuntien tytärkuningattaria vähemmän (Seppä ym. 2004, Gyllenstrand ym. 2005). Siksi pienempien (mutta silti monipesäisten) peltojen tytärkuningatarten vähäiseen levittäytymiseen perustuva selitys on houkutteleva. Kuitenkin geneettisen rakenteen ilmeinen heikkous viittaa ainakin jonkinasteiseen geenivirtaan, ja aiemman tutkimuksen perusteella koirasjälkeläiset voivat hyvin vastata tästä geenivirrasta (Gyllenstrand & Seppä 2003, Seppä ym. 2004, Gyllenstrand ym. 2005). Helpoin tapa selvittää selitysteni tärkeysjärjestystä olisi tutkia populaation eriytymistä mitokondrio-DNA:n avulla. Tällöin voitaisiin joko sulkea pois koiraiden levittäytymiseen perustuva vaihtoehto tai todeta, että superkolonian tytärkuningattaret hypoteesini mukaan levittäytyvät vähemmän kuin muiden osapopulaatioiden tytärkuningattaret. Pro graduni puitteissa mitokondrio-DNA:n sekvensoiminen ei kuitenkaan ollut mahdollista. Kaikkien monipesäisten yhteiskuntien vähäiseen levittäytymiseen perustuvan selityksen testaaminen on vaikeampaa, sillä se vaatisi ilmeisen harvinaisten, tai ehkä tällä alueella olemattomien, yksipesäisten yhteiskuntien löytämistä.

Yllä tarkastelemieni vaihtojen lisäksi tulos voi liittyä myös siihen, että Särkkilenin pesäkeskittymä ei välttämättä ole yhtenäinen superkolonia (ks. osa 4.5). Jos Särkkilenillä todellisuudessa on useita keskikokoisia monipesäisiä yhteiskuntia, on odotettavissa, että ne levittäytymisen osalta käyttäytyvät kuten muiden tutkimieni peltojen (oletetut) monipesäiset yhteiskunnat. Tämä selittäisi myös Särkkilenin eri osien välillä löytämäni



etäisyysisolaation (Taulukko 5).

#### 4.4 Mikrosatelliittiaineiston luotettavuus

$F_{ST}$ -arvojen laskeminen mikrosatelliittigenotyyppeiden avulla on vakiomenetelmä populaatioiden erilaistumisen tutkimisessa, mutta ongelmakohtia on useissa työvaiheissa mikrosatelliittien löytämisestä tulosten analysointiin. Käyttämäni alukkeet on yhtä lukuun ottamatta alun perin suunniteltu *Formica*-muurahaisille ja niitä on onnistuneesti käytetty monilla eri lajeilla, kuten kaljuloviniskan lähisukulaisella karvaloviniskalla. Kuitenkaan yksikään aluke ei ole alun perin juuri kaljuloviniskalle kehitelty. Joidenkin alukkeiden heikko soveltuminen lajille on todennäköinen osasy siihen, että kaikki mikrosatelliitit eivät PCR:ssä monistuneet (ks. Liitteen Taulukko L1).

Toinen mikrosatelliittien analysointia mahdollisesti vaikeuttanut tekijä on, että käytin paneeleita, joilla monistin useita alueita samalla PCR-käsittelyllä. Joissakin tapauksissa eri mikrosatelliittialleelien pituudet olivat osittain päällekkäisiä, mikä vaikeutti tulosten lukemista. Kuitenkin DNA:n eristys, PCR ja tulosten analysointi sujuivat pääasiassa onnistuneesti, ja 14:stä mikrosatelliitista pystyin lopullisissa analyyseissä käyttämään kymmentä. Se riittää antamaan hyvän kuvan osapopulaatioiden erilaistumisesta. Mikrosatelliitteja käytettäessä tarpeellisia oletuksia ovat, että käytetyissä lokuksissa ei ole nolla-alleeleja (mutaation vuoksi PCR:ssä monistumattomia alleeleja), että mikrosatelliitit periytyvät mendelistisesti ja että kytkentäepätasapainoa ei esiinny (Selkoe & Toonen 2006). Joissakin tapauksissa (ks. liitteen taulukot L2–L4) aineistoni ei täytä kaikkia näitä oletuksia. Lopullisissa analyyseissä käyttämäni kymmenen lokusta eivät kuitenkaan poikkea oletuksista johdonmukaisesti kaikilla pelloilla, joten tuloksiani voi pitää melko luotettavina.

Eristin DNA:n pesän pinnalta keräämistäni työläisistä, koska se on koiraiden tai kuningatararten käyttämistä vaivattomampaa ja häiritsin näin muurahaisia mahdollisimman vähän. Työläisten käyttämisellä koiraiden tai kuningatararten sijaan voi olla joitakin vaikutuksia tuloksiini. Jos olisin genotyypittänyt koirasjälkeläisiä, olisi geneettinen rakenne voinut näyttää voimakkaammalta. Tämä johtuu siitä, että kuningattaren parittelukumppani, joka voi olla populaation ulkopuolelta, ei vaikuta koirasjälkeläisten

genotyyppiin. Isoksi kasvaneen pesäkeskittymän tapauksessa on kuitenkin todennäköisintä, että tytärkuningattaret parittelevat saman pellon koiraiden kanssa, joten epäilen, ettei koiraiden genotyypittäminen olisi suuremmin muuttanut tulosta. Koska työläiset monipesäisessä yhteiskunnassa liikkuvat pesien välillä, on toinen seuraus nimenomaan työläisten genotyypittämisestä se, että en voi olla varma, ovatko pesästä genotyypittämani työläiset juuri kyseisen pesän kuningattaren jälkeläisiä. Tämä voi vaikuttaa tuloksiini geneettisen viskositeetin osalta. Se ei kuitenkaan ole ongelma, kun viskositeetti tulkitaan merkiksi yhteiskunnan kasvamisesta pesien jakautumisen myötä, sillä juuri silloin työläisten siirtyminen pesien välillä on odotettavissa.

#### **4.5 Yllättävää aggressiota oletetussa superkoloniassa**

Särkkilenin työläiset pystyvät erottamaan yhteiskuntatoverinsa vieraista ja käyttäytyvät vieraiksi tulkitsemiaan yksilöitä kohtaan aggressiivisesti. Odotetusti aggressio on kaikkein vahvinta kilpailevan lajin, karvaloviniskan, työläisiä kohtaan. Seuraavaksi ensiten aggressiota kohtasivat muiden peltojen kaljuloviniskapesät. Nämä kuuluvat selvästi eri yhteiskuntiin kuin Särkkilenin pesät, koska peltojen välinen etäisyys on niin pitkä, että työläiset eivät tapaa toisiaan. Mielenkiintoisin tulokseni on, että Särkkilenin oletetun superkolonian pesien välillä oli aggressiota. Superkolonian sisällä ei määritelmän mukaan ole aggressiota (Helanterä ym. 2009, Moffett 2012), eivätkä Särkkilenin kaljuloviniskat siis tämän määritelmän mukaan näytä muodostavan superkoloniaa.

Särkkilenin pesäkeskittymän kaltaista hyvin tiheää ja ulkoisesti kaikin puolin superkoloniaaliselta näyttävää elintapaa ei ole aiemmin raportoitu, joskaan kaikkia raportoituja superkolonioita ei ole tutkittu aggression osalta. Kun aggressiota on tutkittu, on superkoloniaalisten lajien havaittu hyväksyvän hyvinkin kaukaisten pesien työläisiä. Argentiinanmuurahainen (*Linepithema humile*) muodostaa vieraslajina valtavia superkolonioita, joiden sisällä ei ole ollenkaan aggressiota. Giraud ym. (2002) tutkivat Välimeren rannikolla argentiinanmuurahaisen pesiä yli 6 000 km:n pituisella alueella. Alueella on kaksi superkoloniaa, joiden välillä työläiset ovat aggressiivisia. Superkolonian rajojen sisällä ei kuitenkaan löytynyt eroa edes antennoinnin määrässä, vaikka muurahaiset olisivat olleet 6 000 km:n päässä toisistaan sijaitsevista pesistä. Samaan tapaan argentiinanmuurahainen on myös kotoperäisellä esiintymisalueellaan

aggressiivinen toisten yhteiskuntien työläisiä kohtaan, mutta ei monipesäisten yhteiskuntien eri pesien välillä (Vogel ym. 2009).

Chapuisat ym. (2005) tutkivat enemmän minun tutkimusjärjestelmäni muistuttavan *Formica paralugubriksen* superkolonian aggressiivisuutta. Heidän tutkimuksessaan ei niin ikään ollut juuri lainkaan aggressiota ison superkolonian pesien välillä, vaikka pesien välinen etäisyys oli suurimmillaan viisi kilometriä. Sisarlajejaan karvakekomuurahaista kohtaan *F. paralugubris* oli hyvin aggressiivinen. Argentiinanmuurahaisten superkolonioista poiketen *F. paralugubriksessa* kuitenkin löytyi ero trofallaksian määrässä: toisilleen vieraiden työläisten välillä oli enemmän trofallaksiaa. Tulosten pohjalta Chapuisat ym. (2005) toteavat, että superkoloniaalinen *F. paralugubris* kyllä erottaa pesätoverinsa superkolonian muiden pesien työläisistä, mutta että se ei käyttäydy niitä kohtaan aggressiivisesti. Holzer ym. (2006) saivat niin ikään *F. paralugubriksella* tekemissään kokeissa samankaltaisia tuloksia. Työläiset tunnistivat eri pesien työläiset vieriksi, mutta eivät juurikaan olleet aggressiivisia edes eri populaation työläisiä kohtaan. Aggressiivinen, välttelevä ja uhkaileva käyttäytyminen kuitenkin lisääntyi etäisyyden mukana. Tutkimani kaljuloviniskan pesäkeskittymä tai superkolonia näyttää toimivan eri tavalla kuin kumpikaan yllä mainituista lajeista.

Työläisten välistä aggressiota voi kokeellisissa oloissa esiintyä enemmän tai vähemmän kuin luonnossa. Koska aggressiota ei ollut kontrollikäsittelyissä, suoraan koeasetelmas- ta johtuva virheaggressio on kokeissani epätodennäköistä. Joidenkin toistojen aggressiopotentiaali jäi todennäköisesti havaitsematta, koska jotkin isäntämuurahaiset olivat erittäin passiivisia. Kuitenkin viiden toiston myötä on todennäköistä, että löysin ne pesäparit, joiden välillä on aggressiopotentiaalia. Tästä on osoituksena se, että karvaloviniska tuli aggressiivisesti kohdelluksi useammassa kuin kahdessa toistossa jokaisen parinsa toimesta. Koska laskin yhdenkin työläisen aggressiivisuuden aggressiivisuudeksi, voi koeasetelmaa pitää varsin herkkänä.

Roulston ym. (2003) tutkivat eri koeasetelmien herkkyyttä argentiinanmuurahaisen aggressiivisuutta mitattaessa. Heidän tutkimuksessaan asetelmat, joissa oli mukana enemmän kuin kaksi työläistä tai joissa vieras työläinen lisätään toiseen pesään, paljas- tivat aggressiota herkemmin kuin asetelmat, joissa oli mukana vain kaksi muurahaista tai käytettiin neutraalia areenaa. Joissakin tapauksissa Roulston ym. (2003) onnistuivat

kokeellisesti yhdistämään myös sellaisia pesiä, joiden välillä jotkin aggressiokoeasetelmat tuottivat aggressiota. He huomauttavat, että työläiset saattavat suhtautua aggressiivisemmin vieraaseen työläiseen, jos se yhtäkkiä löytyy pesästä, kuin jos se tavaetaan pesän ulkopuolella. Myös tutkimassani kaljuloviniskapopulaatioissa jotkin pesät, joiden välillä löysin kokeessa aggressiota, voisivat ehkä todellisuudessa yhdistyä. Näin ollen ei ole varmaa, mikä havaitsemastani aggressiosta on ekologisesti merkittävää. Vaikka kokeessa löysin useiden Särkkilenin pesien välillä aggressiota, voi olla että aggressio näiden pesien välillä on luonnossa hyvin harvinaista ja että Särkkilen on aito superkolonia.

Jos tutkimusmenetelmäni on yliherkkä aggressiolle, voi Särkkilenin ajatella muistuttavan Chapuisat'n ym. (2005) ja Holzerin ym. (2006) tutkimia *F. paralogubris* -superkolonioita, joissa muiden pesien työläiset tunnistetaan vieraksi, mutta niitä kohtaan ei olla aggressiivisia. Jos taas löytämäni aggressio kertoo siitä, että tiheästi samalla pellolla sijaitsevista pesistä monet todella hylkivät toisiaan, on pesäkeskittymän käyttäytyminen mielenkiintoinen uusi löydös ja olisi syytä tutkia tarkemmin, missä eri yhteiskuntien rajat pellolla ovat sekä onko vastaavaa käyttäytymistä ja populaatorakennetta muilla lajeilla.

Kokeideni perusteella en pysty määrittelemään Särkkilenin mahdollisten useiden yhteiskuntien rajoja. Isäntäpesät kuitenkin olivat harvemmin aggressiivisia läheisiä kuin kaukaisempia vieraspesiä kohtaan, joten kyse näyttää joka tapauksessa olevan melko laajoista monipesäisistä yhteiskunnista. Jotkin pellon pesistä sijaitsevat myös niin tiiviissä ryhmissä, että on ilmeistä, että ainakin ne ovat yhteydessä toisiinsa ja muodostuneet pesien jakautumisten myötä. Geneettisen tutkimukseni paljastama viskositeetti tukee ajatusta, että koko pellon eri osien pesien välillä on melko vähän työläisten liikkuvuutta. Jos pellolla on useita pienehköjä monipesäisiä pesärykelmiä, joiden välillä työläiset eivät liiku ja levitä pesätovereiden tunnistamiseen käytettyjä hajujaan, voisivat työläiset tällaisten rykelmien välillä alkaa tulkita toisensa vieraksi. Nämä rykelmät olisivat voineet syntyä useiden Särkkilenin kolonisointitapahtumien seurauksena, joita BAPS-analyysini perusteella on ollut ainakin kaksi. Toinen tapa, jolla rakenne olisi voinut syntyä, on monipesäisen yhteiskunnan jakautuminen pesien välisen yhteyden katketessa (Pamilo & Rosengren 1984). Pienen mittakaavan maantieteelliset esteet, kuten ojat ja korkea kasvillisuus, sekä kaukana toisistaan sijaitsevien pesien välistä yhteyttä

ylläpitävien välipesien kuoleminen voisivat aiheuttaa yhteiskunnan jakautumisen. Muurahaisyhteiskunnan jakautumisesta näin pienellä alueella ja lyhyessä ajassa ei kuitenkaan ole näyttöä.

Särkkilenin keskellä on iso pesätön alue, jonka yli työläiset tuskin liikkuvat ja jonka eri puolet BAPS jakaa pääosin eri ryhmiin. Kaikissa pellonpuolikkaiden välillä tekemissäni kokeissa olikin aggressiota (Kuva 7). Lisäksi Särkkilenillä on muuallakin kymmenien metrien välimatkoja tai puita ja syviä ojia pesien välissä. Pienen IV-alueen sisällä ei ole aggressiota, joten se on yhtä yhteiskuntaa, mutta kaikissa IV-alueen ja muiden alueiden välillä tekemissäni kokeissa oli aggressiota (Kuva 7). IV-alue siis näyttää olevan eri yhteiskuntaa kuin pellon muut pesät. Aineistoni pohjalta ei voi tehdä tarkempia johtopäätöksiä eri yhteiskuntien välisistä rajoista, mutta pesien sijoittumisen perusteella on mahdollista, että pellolla olisi useita monipesäisiä alueita, jotka voivat olla osittain tai kokonaan eristyksissä toisistaan.

*Formica paralugubriksen* yksi superkolonia jakautuu huomattavasti suuremmalle alueelle kuin Särkkilenin populaatio (Chapuisat ym. 2005). Tämän perusteella aggressiota Särkkilenillä voivat yhteiskunnan jakautumista paremmin selittää useat kolonisaatio-tapahtumat. Nykyinen rakenne on voinut syntyä useiden yhteiskuntien kasvaessa ja lopulta eri yhteiskuntiin kuuluvat pesät voisivat olla hyvinkin lähellä toisiaan. Ajatusta useista kolonisaatiotapahtumista tukevat myös  $F_{ST}$ -arvot, jotka paljastavat etäisyysisolaatiota Särkkilenin eri alueiden välillä (Taulukko 5). Kuitenkin kaljuloviniskan ja *F. paralugubriksen* näin suora vertaileminen on kyseenalaista, koska lajit ovat ekologialtaan erilaisia. Muurahaislajien ravinnonhankintaetäisyydet vaihtelevat huomattavasti, ja karvaloviniskan työläiset liikkuvat enimmäkseen alle kymmenen metrin säteellä kotipesästään (Savolainen & Vepsäläinen 1988, Sorvari 2009). Karvaloviniskaa elintavoiltaan muistuttavan kaljuloviniskan voi niin ikään odottaa liikkuvan pienillä alueilla. Tämä voi osaltaan selittää Särkkilenin tiheän populaation eri osien eristyneisyyttä.

Särkkilenin tai vastaavan pesäkeskittymän eri yhteiskuntien tarkkoja rajoja voisi tutkia laajoin aggressiokokein eri pesien välillä. Aggressiokokeet tulisi suorittaa eri menetelmillä ja kokeissa toisiaan kohtaan aggressiivisesti käyttäytyvien pesien mahdollista yhdistymistä pitäisi testata, jotta saataisiin selville, onko aggressio aitoa ja ekologisesti merkittävää. Lisäksi yhteiskunnan rakennetta voisi tutkia työläisten liikkeitä

havainnoimalla. Särkkilenin kaltaisessa heinikkoisessa maastossa tämä on kuitenkin vaikeaa ja vaatii laajaa, suurten työläismäärien merkitsemiseen ja luonnossa tarkkailuun perustuvaa tutkimusta. Mitokondrio-DNA:n avulla voidaan tutkia, kuuluvatko eri alueet eri naaraslinjoihin. Näin myös kolonisaatiotapahtumien määrää voi arvioida.

Tutkin työläisten välistä aggressiota uudella menetelmällä, joka on kompromissi tiukasti kontrolloitujen 1 vs 1 -kokeiden ja luonnollisessa ympäristössä tehtävien kokeiden välillä. Kaljuloviniskan käyttäytymisen tutkimista mutkistaa, että sen työläiset käyttäytyvät yksin ollessaan ja neutraaleilla areenoilla passiivisesti ja toisiaan vältellen. Sama ongelma vaivaa myös karvaloviniskan tutkimista (Martin ym. 2008). Martin ym. (2008, 2009) ratkaisivat ongelman tarkkailemalla reaktioita n. 200 työläistä käsittäneen laboratoriopesän pinnalla. Verrattuna omiin kokeisiini tässä menetelmässä ongelmana on, että tapahtumia voi ilman lisätyn työläisen merkitsemistä seurata vain lyhyen ajan. Tällöin käyttäytymisen tarkempi tilastointi on vaikeaa ja vasta pitkän seurannan jälkeen ilmenevä lievä aggressiivisuus voi jäädä huomaamatta. Minun menetelmäni vahvuuksia ovat helpommin seurattavissa oleva määrä muurahaisia ja se, että videoita voi tarvittaessa katsoa hidastettuina useampaan kertaan. Näin voidaan tavanomaisimpien 1 vs 1 -kokeiden tapaan tarkkaan tilastoida eri käyttäytymisiin käytettyjä aikoja.

Kokeeni tuloksiin on voinut vaikuttaa muurahaisten kokema stressi: koe vaati alkupe-  
räisten laboratoriopesien tuhoamisen ja sen, että työläiset joutuivat odottamaan koetta  
pienissä purkeissa. Todennäköisesti osin tämän seurauksena joidenkin toistojen isäntä-  
muurahaisten olivat hyvin passiivisia ja kuolleitakin muurahaisia oli joukossa. Näissäkin  
tapauksissa karvaloviniska kuitenkin lähes aina kohtasi aggressiota. Joka tapauksessa  
satunnaisvaihtelu siinä, millä koeareenoilla on aktiivisia muurahaisia, nostaa vaatimus-  
ta suurista otosko'oista, kun tutkitaan hienovaraisia eroja esimerkiksi antennointiin  
käytetyssä ajassa. Minun kokeessani antennointi ei kuitenkaan lopulta ollut kiinnos-  
tuksen kohteena, koska kokeissa paljastui aggressiota eri koeluokissa. Kaiken kaikkiaan  
kokeeni oli onnistunut menetelmällinen kokeilu ja tuo hyödyllisen lisän muurahaisten  
käyttäytymistä tutkivan työkalupakkiin.

## 4.6 Monipesäisyys ekologisena ja evolutiivisena strategiana

Tulosteni ja Heikki Helanterän julkaisemattomien havaintojen (ks. myös Helanterä & d’Ettorre 2015) mukaan tutkimani alueen kaljuloviniskapopulaatioille on ominaista monikuningattarisuus, yhteiskunnan kasvaminen pesien jakautumisen myötä ja vähäinen pitkän matkan levittäytyminen. En löytänyt yhtäkään yksipesäiseltä vaikuttavaa kaljuloviniskan yhteiskuntaa, kun taas karvaloviniskalta löysin päällisin puolin sekä yksi- että monipesäisiltä vaikuttavia yhteiskuntia. Karvaloviniskalla pätee yleisemminkin, että populaatiot koostuvat sekä yksi- että monipesäisistä yhteiskunnista (Seppä ym. 2004), mutta kaljuloviniskan yksipesäisyydestä on vähemmän havaintoja. Czechowski (1975) löysi kuitenkin Puolasta paitsi isoja superkolonioita ja pieniä monipesäisiä yhteiskuntia myös yksipesäisiä kaljuloviniskayhteiskuntia. Lisäksi Pamilo ja Rosengren (1984) pitivät yksittäisenä superkolonian läheisyydessä ollutta pesää todennäköisenä yksipesäisenä yhteiskuntana. Czechowskin (1975) mukaan Dlussky (1967) raportoi kaljuloviniskan muodostaneen silloisen Neuvostoliiton alueella pelkästään yksipesäisiä ja yksikuningattarisia yhteiskuntia. Monikuningattarisuus, monipesäisyys ja heikko levittäytyminen ovat kuitenkin kaljuloviniskaan yleisesti liitettyjä piirteitä, ja mahdolliset yksikuningattariset ja yksipesäiset yhteiskunnat näyttävät olevan poikkeuksia (Czechowski 1975, Pamilo & Rosengren 1984, Rosengren ym. 1993, Bönsel 2007).

Monikuningattarisuus, monipesäisyys ja superkoloniaalisuus ovat paikallisesti ekologisesti erittäin menestyksekkäitä strategioita (Helanterä ym. 2009). Yhteiskunta ei kuole yhden kuningattaren tai pesän mukana, vaan kerran syntyneen superkolonian täydellinen tuhoutuminen vaatii merkittäviä muutoksia elinympäristössä tai vakavan tautiepidemian. Sen sijaan yksikuningattarinen ja yksipesäinen yhteiskunta lakkaa yleensä olemasta pian kuningattaren kuoltua (Peeters ja Molet 2010). Toisaalta mm. Chapuisat’n ym. (1997), Gyllenstrandin ym. (2005), Sepän ym. (2012) ja tämän tutkimuksen tulokset viittaavat monipesäisten yhteiskuntien heikkoon levittäytymiseen, mikä voi olla äärimmäisen monikuningattarisuuden ja sen tuottaman alhaisen sukulaisuuden tulos.

Monikuningattarisuuden ja monipesäisyyden on arveltu parantavan yhteiskunnan selviytymismahdollisuuksia muuttuvissa ja pirstaleisissa ympäristöissä (Nonacs 1988, Hölldobler & Wilson 1990: 209–220, Crozier & Pamilo 1996: 123–135). Kuitenkin vähäinen levittäytyminen voi mitätöidä tämän hyödyn, jolloin yksikuningattarinen ja



vahvasti levittäytyvä laji voi olla menestyksekkäämpi kuin heikosti levittäytyvä, monipesäisiä ja monikuningattarisia yhteiskuntia muodostava, laji. Aikana, jona ihminen voimakkaasti muuttaa elinympäristöjä, voivat heikosti levittäytyvät lajit olla uhattu- ja, vaikka ne esiintymisalueillaan olisivat kaljuloviniskan tapaan hyvinkin hallitsevia. Suomessa pitkäksi ajaksi kesannolle jätettyjä peltoja sekä soita ja niittyjä suosiva kaljuloviniska voikin olla pulassa maatalouden muutosten sekä muiden sen suosimien elinympäristöjen katoamisen ja pirstoutumisen myötä (Bönsel 2007, Lyytimäki & Hakala 2008: 183–186).

Helanterä ym. (2009) esittävät, että superkoloniaalisuus voi olla evolutiivinen umpikuja, koska alhainen sukulaisuus yhteiskunnan yksilöiden välillä ei mahdollista auttamiskäyttäytymistä suosivaa sukulaisvalintaa, eikä työläisten ominaisuuksiin ylipäänsä voi kohdistua luonnonvalintaa, jos työläisten käyttäytyminen ei vaikuta niiden kelpoisuuteen. Näin on, jos työläiset eivät ole sukua lisääntyville kuningattarille ja koiraille. Helanterän ym. (2009) mukaan geneettinen viskositeetti voi kuitenkin johtaa toisiaan auttavien yksilöiden keskimääräistä korkeampaan sukulaisuuteen ja näin mahdollistaa sukulaisvalinnan superkolonioissa. *Formica*-muurahaisilla geneettinen viskositeetti on kuin onkin yleistä monipesäisissä yhteiskunnissa (Pamilo & Rosengren 1984, Chapuisat ym. 1997, Liautard & Keller 2001, Gyllenstrand & Seppä 2003, Gyllenstrand ym. 2005, tämä tutkimus). Kuitenkin viskositeetti lisää paitsi lähellä toisiaan elävien yksilöiden välistä sukulaisuutta myös sukulaisten välistä kilpailua, mikä kumoaa sukulaisten auttamisen tuoman hyödyn (Taylor 1992). Viskositeetti voi silti teoriassa suosia altruismia joissakin tilanteissa. Jos altruistinen käyttäytyminen esimerkiksi tapahtuu ennen levittäytymistä, kilpailu kohdistuu eri yksilöihin kuin auttaminen (Queller 1992, 1994). Lisää tarvitaan tämän testaamiseksi käytännössä ja sen selvittämiseksi, voiko viskositeetti todella edesauttaa altruismin säilymistä evolutiivisella aikajänteellä.

Ainakin fylogenioiden perusteella näyttää siltä, että superkoloniaalisuus on kehittynyt ja kadonnut monissa eri haaroissa, mikä viittaa siihen, että strategia ei menesty evolutiivisesti. Kuitenkin juuri *Formica*-suku on poikkeus: siinä näyttää olevan superkolonioita muodostavia sisarlajeja, eli superkoloniaalinen elämäntapa ei näytä siinä olleen evolutiivinen umpikuja (Brady ym. 2006, Helanterä ym. 2009). Tutkimalla kotoperäisiä superkoloniaalisia lajeja lisää, voidaan ehkä selvittää, mikä tekee *Formica*-superkolonioista erityisiä.

## 5 Johtopäätökset

Päähypoteesini oli, että superkolonian tytärkuningattaret eivät levittäydy ja, että superkolonia siksi on geneettisesti eristynyt muusta populaatiosta. Tulokseni eivät tue tätä hypoteesia. Löysin kuitenkin heikkoa etäisyysisolaatiota eri peltojen väliltä, eli levittäytyminen on ainakin jossain määrin rajoittunutta, kuten sukulaivalintateorian pohjalta odotin. Jatkotutkimuksella voidaan selvittää, onko levittäytymättömyys todella hypoteesini mukaisesti itsekästä käyttäytymistä, joka yleistyy alhaisen sukulaisuuden yhteiskunnissa.

Isoimpien pesäkeskittymien sisällä on geneettistä viskositeettia, mikä viittaa monipesäisyyden syntymiseen pesien jakautumisen myötä. Tämä tulos on linjassa aikaisemman tutkimuksen kanssa. Tulos myös tukee hypoteesia isojen monipesäisten yhteiskuntien tytärkuningatarten vähäisestä levittäytymisestä: geneettistä viskositeettia oli nimenomaan kahdessa isoimmassa osapopulaatiossa.

Käyttäytymiskokeeni paljastivat yllättävää aggressiota olettamani superkolonian sisällä. Tällaista tiheää ja ulkoisesti selvästi superkolonialta vaikuttavaa pesäkeskittymää, jonka sisällä on aggressiota, ei ole aikaisemmin kuvattu. Tutkimukseni perusteella ei voi tehdä johtopäätöksiä pellon eri yhteiskuntien rajoista, eikä selvittää, onko rakenne syntynyt useiden kolonisaatiotapahtumien vai yhteiskuntien jakautumisen myötä. Se, että tunnistaminen keinotekoisissa kokeissa johtaa aggressioon, ei välttämättä tarkoita, että superkolonian sisällä normaalioloissa olisi aggressiivisuutta (Roulston ym. 2003). Voi myös olla tarpeen pohtia, onko yhteiskuntien välisten rajojen määrittäminen pelkästään aggression perusteella aina tarkoituksenmukaista.

Aggressio Särkkilenin sisällä ja se, ettei Särkkilen ole odotusteni mukaisesti eristynyt muusta populaatiosta, herättää mielenkiintoisia kysymyksiä monipesäisen ja superkoloniaalisen elämäntavan luonteesta kaljuloviniskalla. Jatkotutkimus sekä tällä että muilla lajeilla on tarpeen, sillä kotoperäisesti superkoloniaaliset lajit voivat vielä kertoa paljon muurahaiselämän monimuotoisuudesta. Tulokseni osoittavat tarpeen kiinnittää riittävästi huomiota tutkittujen superkolonioiden todelliseen luonteeseen ja niiden pesien väliseen kanssakäymiseen. Melko paljon tutkittu *Formica*-suku on edelleen hedelmällinen tutkimuskohde superkolonioista ja sukulaivalinnasta kiinnostuneelle.

## 6. Kiitokset

Kiitän ohjaajiani Heikki Helanterää, Perttu Seppää ja Sanja Hakalaa asiantuntevasta ja välittävästä ohjauksesta sekä korvaamattomasta avusta työn eri vaiheissa. Biologisten vuorovaikutusten huippututkimusyksikkö ja Team::Antzz, Tvärminnen eläintieteellinen asema sekä Molekyyliekologian ja systematiikan laboratorio Helsingin yliopiston biotieteiden laitoksella tarjosivat työtiloja ja -materiaaleja sekä apua käytännön töissä. Tvärminnen eläintieteellistä asemaa kiitän myös mukavasta majoituksesta ja hyvästä ruoasta. Biologisten vuorovaikutusten huippututkimusyksikkö, Societas Pro Fauna et Flora Fennica, Suomen Hyönteistieteellinen Seura ja Helsingin hyönteistieteellinen yhdistys rahoittivat työtäni. Eeva Vakkari ja Matti Leponiemi auttoivat maastokartoituksessa, ja Mikko Aulio luki käsikirjoitukseni ehdottaen siihen hyviä muutoksia ja korjauksia. Patrick Forsbom on ystävällisesti antanut ryhmämme työskennellä hänen mailiaan ja kertoi taustatietoja Särkkilenistä. Ilman Kaisa Torpan rakkautta ja tukea olisi ollut huomattavasti vaikeampaa päivästä toiseen innostua muurahaisista. Kiitos!

Valitettavasti tätä tutkimusta ei voinut tehdä tappamatta suuria määriä muurahaisia, noita ällistyttäviä eläimiä, jotka ansaitsevan kaiken kunnioituksemme. Anteeksi!

## 7 Kirjallisuus

- Adamack, A. T. & Gruber, B. 2014: PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. — *Methods in Ecology and Evolution* 5: 384–387.
- Anderson, K. E., Linksvayer, T. A. & Smith, C. R. 2008: The causes and consequences of genetic caste determination in ants (Hymenoptera: Formicidae). — *Myrmecological News* 11: 119–132.
- Bargum, K. & Sundström, L. 2007: Multiple breeders, breeder shifts and inclusive fitness returns in an ant. — *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 1547–1551.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. 2015: Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. — *Journal of Statistical Software* 67: 1–48.
- Bhatkar, A. & Whitcomb, W. H. 1970: Artificial Diet for Rearing Various Species of Ants. — *The Florida Entomologist* 53: 229–232.
- Boomsma, J. J. 2009: Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. 3191–3207.
- Boomsma, J. J. & Gawne, R. 2017: Superorganismality and caste differentiation as points of no return: how the major evolutionary transitions were lost in translation. — *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* doi:10.1111/brv.12330.

- Boomsma, J. J. & Ratnieks, F. L. W. 1996: Paternity in eusocial Hymenoptera. — *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 351: 947–975.
- Boomsma, J. J., Huszár, D. B. & Pedersen, J. S. 2014: The evolution of multiqueen breeding in eusocial lineages with permanent physically differentiated castes. — *Animal Behaviour* 92: 241–252.
- Bos, N. & d’Etorre, P. 2012: Recognition of social identity in ants. — *Frontiers in Psychology* 3: 1–6.
- Bourke, A. F. G. 1988: Worker Reproduction in the Higher Eusocial Hymenoptera. — *The Quarterly Review of Biology* 63: 291–311.
- Bourke, A. F. G. 2011: *Principles of Social Evolution*, Oxford University Press, Oxford. 267 s.
- Brady, S. G., Schultz, T. R., Fisher, B. L. & Ward, P. S. 2006: Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 18172–18177.
- Bönsel, A. 2007: Nest Turnover in a Colony of *Formica pressilabris* Nylander, 1846 As Related To Habitat Quality (Hymenoptera: Formicidae). — *Opuscula Zoologica Fluminensia* 222: 1–12.
- Chapuisat, M. 1996: Characterization of microsatellite loci in *Formica lugubris* B and their variability in other ant species. — *Molecular Ecology* 5: 599–601.
- Chapuisat, M., Bernasconi, C., Hoehn, S. & Reuter, M. 2005: Nestmate recognition in the unicolonial ant *Formica paralugubris*. — *Behavioral Ecology* 16: 15–19.
- Chapuisat, M., Bocherens, S. & Rosset, H. 2004: Variable Queen Number in Ant Colonies: No Impact on Queen Turnover, Inbreeding, and Population Genetic Differentiation in the Ant *Formica selysi*. — *Evolution* 58: 1064–1072.
- Chapuisat, M., Goudet, J. & Keller, L. 1997: Microsatellites Reveal High Population Viscosity and Limited Dispersal in the Ant *Formica paralugubris*. — *Evolution* 51: 475–482.
- Collingwood, C. A. 1979: The Formicidae (Hymenoptera) of Fennoscandia and Denmark. — *Fauna Entomologica Scandinavica* 8: 1–174.
- Corander, J. & Marttinen, P. 2006: Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. — *Molecular Ecology* 15: 2833–2843.
- Corander, J., Sirén, J. & Arjas, E. 2008a: Bayesian Spatial Modelling of Genetic Population Structure. — *Computational Statistics* 23: 111–129.
- Corander, J., Marttinen P., Sirén, J. & Tang, J. 2008b: Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. — *BMC Bioinformatics* 9: 539.
- Costa, J. & Fitzgerald, T. 2005: Social terminology revisited: Where are we ten years later? — *Annales Zoologici Fennici* 42: 559–564.
- Crespi, B. J. 1992: Eusociality in Australian gall thrips. — *Nature* 355: 724–726.
- Crespi, B. J. & Yanega, D. 1995: The definition of eusociality. — *Behavioral Ecology* 6: 109–115.
- Crosland, M. W. J. 1989a: Kin recognition in the ant *Rhytidoponera confusa* I. Environmental odour. — *Animal Behaviour* 37: 912–919.
- Crosland, M. W. J. 1989b: Kin recognition in the ant *Rhytidoponera confusa* II. Gestalt odour. — *Animal Behaviour* 37: 920–926.
- Crozier, R. H. & Pamilo, P. 1996: *Evolution of Social Insect Colonies: Sex Allocation and Kin Selection*. — Oxford University Press, Oxford. 306 s.
- Czechowski, W. 1971: Competition between *Formica exsecta* Nyl. and *Formica pressilabris* Nyl. (Hymenoptera, Formicidae). — *Annales Zoologici* 17: 273–286.
- Czechowski, W. 1975: Bionomics of *Formica* (Coptoformica) *pressilabris* Nyl.

- (Hymenoptera, Formicidae). — *Annales Zoologici* 103–125.
- d’Ettorre, P. & Lenoir, A. 2010: Nestmate Recognition. Kirjassa: Lach, L., Parr, C. L. & Abbott, K. L. (toim.), *Ant Ecology*: 194–209. — Oxford University Press. Oxford. 202 s.
- Dahbi, A., Cerdá, X., Hefetz, A. & Lenoir, A. 1997: Adult transport in the ant *Cataglyphis iberica*: a means to maintain a uniform colonial odour in a species with multiple nests. — *Physiological Entomology* 22: 13–19.
- Dahbi, A., Hefetz, A., Cerda X. & Lenoir A. 1999: Trophallaxis mediates uniformity of colony odor in *Cataglyphis iberica* ants (Hymenoptera, Formicidae). — *Journal of Insect Behavior* 12: 559–567.
- Darwin, C. 1859: *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favored races in the struggle for life* 1. p. — John Murray, Lontoo. 490 s.
- Douwes, P. 2012: *Formica pressilabris* blank hedmyra. — Kirjassa: Douwes, P. (toim.), *Nationalnyckeln till sveriges flora och fauna. Steklar: Myror–getingar. Hymenoptera: Formicidae–Vespidae*: 189. — ArtDatabanken, SLU, Uppsala. 382 s.
- Douwes, P., Abenius, J., Cederberg, B., Wahlstedt, U., Hall, K., Starkenberg, M., Reisborg, C. & Östman T. 2012: *Nationalnyckeln till Sveriges flora och fauna. Steklar: Myror–getingar. Hymenoptera: Formicidae–Vespidae*. — Artdatabanken, SLU, Uppsala. 382 s.
- Duffy, J. E. 1996: Eusociality in coral-reef shrimp. — *Nature* 381: 512–514.
- Giraud, T., Pedersen, J. S. & Keller L. 2002: Evolution of supercolonies: The Argentine ants of southern Europe. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 6075–6079.
- Goslee, S. C. & Urban, D. L. 2007: The ecodist Package for Dissimilarity-based Analysis of Ecological Data. — *Journal of Statistical Software* 22: 1–19.
- Gyllenstrand N. & Seppä P. 2003: Conservation genetics of the wood ant, *Formica lugubris*, in a fragmented landscape. — *Molecular Ecology* 12: 2931–2940.
- Gyllenstrand, N., Gertsch, P. J. & Pamilo, P. 2002: Polymorphic microsatellite DNA markers in the ant *Formica exsecta*. — *Molecular Ecology Notes* 2: 67–69.
- Gyllenstrand, N., Seppä, P. & Pamilo, P. 2005: Restricted gene flow between two social forms in the ant *Formica truncorum*. — *Journal of Evolutionary Biology* 18: 978–984.
- Hamilton, W. D. 1963: The Evolution of Altruistic Behavior. — *The American Naturalist* 97: 354–356.
- Hamilton, W. D. 1964a: The genetical evolution of social behaviour. I. — *Journal of Theoretical Biology* 7: 1–16.
- Hamilton, W. D. 1964b: The genetical evolution of social behaviour. II. — *Journal of Theoretical Biology* 7: 17–52.
- Hasegawa, E. & Imai, S. 2004: Characterization of microsatellite loci in red wood ants *Formica* (s. str.) spp. and the related genus *Polyergus*. — *Molecular Ecology Notes* 4: 200–203.
- Heinze, J. 2007: The demise of the standard ant ( Hymenoptera : Formicidae ). — *Myrmecological News* 11: 9–20.
- Heinze, J., Foitzik, S., Hippert, A. & Hölldobler, B. 1996: Apparent dear-enemy phenomenon and environment-based recognition cues in the ant *Leptothorax nylanderii*. — *Ethology* 102: 510–522.
- Helanterä, H. & d’Ettorre, P. 2015: A comparative study of egg recognition signature mixtures in *Formica* ants. — *Evolution* 69: 520–529.
- Helanterä, H. & Sundström, L. 2007: Worker Reproduction in *Formica* Ants. — *The American Naturalist* 170: E14–E25.
- Helanterä, H., Strassmann, J. E., Carrillo, J. & Queller, D. C. 2009: Unicolonial ants: where do they come from, what are they and where are they going? — *Trends in*



- Ecology and Evolution* 24: 341–349.
- Higashi, S. & Yamauchi, K. 1979: Influence of a supercolonial ant *Formica (Formica) yessensis* Forel on the distribution of other ants in Ishikari coast. — *Japanese Journal of Ecology* 29: 257–264.
- Holway, D. A., Lach, L., Suarez, A. V., Tsutsui, N. D. & Case, T. J. 2002: The Causes and Consequences of Ant Invasions. — *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 181–233.
- Holzer, B., Chapuisat, M., Kremer, N., Finet, C. & Keller, L. 2006: Unicoloniality, recognition and genetic differentiation in a native *Formica* ant. — *Journal of Evolutionary Biology* 19: 2031–2039.
- Howard, R. W. & Blomquist, G. J. 2005: Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. — *Annual Review of Entomology* 50: 371–93.
- Hughes, W. O. H., Oldroyd, B. P., Beekman, M. & Ratnieks, F. L. W. 2008: Ancestral Monogamy Shows Kin Selection Is Key to the Evolution of Eusocia. — *Science* 320: 1213–1216.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O. 1990: *The Ants*. — Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 732 s.
- Itô, Y. 1989: The Evolutionary Biology of Sterile Soldiers in Aphids. — *Trends in Ecology and Evolution* 4: 69–73.
- Jarvis, J. U. M. 1981: Eusociality in a Mammal: Cooperative Breeding in Naked Mole-Rat Colonies. *Science* 212: 571–573.
- Kent, D. S. & Simpson, J. A. 1992: Eusociality in the beetle *Austroplatypus incompertus* (Coleoptera: Curculionidae). — *Naturwissenschaften* 79: 86–87.
- Krushelnycky, P. D., Holway, D. A. & LeBrun, E. G. 2010: Invasion Processes and Causes of Success. Kirjassa: Lach, L., Parr, C. L. & Abbott, K. L. (toim.), *Ant Ecology*: 245–260. — Oxford University Press, Oxford. 202 s.
- Kümmerli, R. & Keller, L. 2007: Reproductive specialization in multiple-queen colonies of the ant *Formica exsecta*. — *Behavioral Ecology* 18: 375–383.
- Lacey, E. A. & Sherman, P. W. 2005: Redefining eusociality: concepts, goals and levels of analysis. — *Annales Zoologici Fennici* 42: 573–577.
- Liautard, C. & Keller, L. 2001: Restricted effective queen dispersal at a microgeographic scale in polygynous populations of the ant *Formica exsecta*. — *Evolution* 55: 2484–2492.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S. & De Poorter, M. 2004: *100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database*. Päivitetty painos. —The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN). 12 s.
- Lyytimäki, J. & Hakala, H. 2008: *Ympäristön tila ja suojele Suomessa*. — Gaudeamus, Helsinki. 447 s.
- Markó, B., Czekes, Z., Erős, K., Csata E. & Szász-len, A.-M. 2012: The largest polydomous system of *Formica* ants (Hymenoptera : Formicidae) in Europe discovered thus far in Romania. — *North-Western Journal of Zoology* 8: 287–291.
- Martin, S. J., Vitikainen, E., Helanterä, H. & Drijfhout, F. P. 2008: Chemical basis of nest-mate discrimination in the ant *Formica exsecta*. — *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 1271–1278.
- Martin, S. J., Helanterä, H., Kiss, K., Lee, Y. R. & Drijfhout, F. P. 2009: Polygyny reduces rather than increases nestmate discrimination cue diversity in *Formica exsecta* ants. — *Insectes Sociaux* 56: 375–383.
- Moffett, M. W. 2012: Supercolonies of billions in an invasive ant: What is a society? —

- Behavioral Ecology* 23: 925–933.
- Moran, N. A. 1993: Defenders in the North American aphid *Pemphigus obesinymphae*. — *Insectes Sociaux* 40: 391–402.
- Nonacs, P. 1988: Queen number in colonies of social hymenoptera as a kin-selected adaptation. — *Evolution* 42: 566–580.
- Pamilo, P. 1982: Genetic population structure in polygynous *Formica* ants. — *Heredity* 48: 95–106.
- Pamilo, P. & Rosengren, R. 1984: Evolution of nesting strategies of ants: genetic evidence from different population types of *Formica* ants. — *Biological Journal of the Linnean Society* 21: 331–348.
- Pamilo, P. & Seppä, P. 1994: Reproductive competition and conflicts in colonies of the ant *Formica sanguinea*. — *Animal Behaviour* 48: 1201–1206.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. 2006: GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. — *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. 2012: GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. — *Bioinformatics* 28: 2537–2539.
- Pedersen, J. S., Krieger, M. J. B., Vogel, V., Giraud, T. & Keller, L. 2006: Native supercolonies of unrelated individuals in the invasive Argentine Ant. — *Evolution* 60: 782–791.
- Peeters, C. & Molet, M. 2010: Colonial Reproduction and Life Histories. Kirjassa: Lach, L., Parr, C. L. & Abbott, K. L. (toim.), *Ant Ecology*: 159–176. — Oxford University Press. Oxford. 202 s.
- Queller, D. C. 1992: Does Population Viscosity Promote Kin Selection? — *Trends in Ecology and Evolution* 7: 322–324.
- Queller, D. C. 1994: Genetic relatedness in viscous populations. — *Evolutionary Ecology* 8: 70–73.
- R Core Team 2017: *R: A language and environment for statistical computing*. — R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.r-project.org/>.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995: GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. — *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- Reeve, H. K. 1989: The Evolution of Conspecific Acceptance Thresholds. — *The American Naturalist* 133: 407–435.
- Rosengren, R. & Pamilo, P. 1983: The evolution of polygyny and polydomy in mound-building *Formica* ants. — *Acta Entomologica Fennica* 42: 65–77.
- Rosengren, R., Sundström, L. & Fortelius, W. 1993: Monogyny and polygyny in *Formica* ants: The result of alternative dispersal tactics. Kirjassa: Keller, L. (toim.), *Queen number and sociality in insects*: 308–333. — Oxford University Press. 456 s.
- Ross, K. G. 1988: Differential reproduction in multiple-queen colonies of the fire ant *Solenopsis invicta*. — *Behavioral Ecology and Sociobiology* 23: 341–355.
- Roulston, T. H., Buczkowski, G. & Silverman, J. 2003: Nestmate discrimination in ants: Effect of bioassay on aggressive behavior. — *Insectes Sociaux* 50: 151–159.
- Rousset, F. 2008: GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. — *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106.
- Rowe, G., Sweet, M. & Beebee, T. 2017: *An Introduction to Molecular Ecology* 3. painos. — Oxford University Press, Oxford. 535 s.
- Savolainen, R. & Vepsäläinen, K. 1988: A Competition Hierarchy among Boreal Ants : Impact on Resource Partitioning and Community Structure. — *Oikos* 51: 135–155.
- Schultner, E., Saramäki, J. & Helanterä, H. 2016: Genetic structure of native ant



- supercolonies varies in space and time. — *Molecular Ecology* 6196–6213.
- Schultner, E., Gardner, A., Karhunen, M. & Helanterä, H. 2014: Ant larvae as players in social conflict: relatedness and individual identity mediate cannibalism intensity. — *The American naturalist* 184: E161–E174.
- Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. 2006: Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. — *Ecology Letters* 9: 615–629.
- Seppä, P., Gyllenstrand, N., Corander, J. & Pamilo, P. 2004: Coexistence of the social types: genetic population structure in the ant *Formica exsecta*. — *Evolution* 58: 2462–71.
- Seppä, P., Johansson, H., Gyllenstrand, N., Pålsson, S. & Pamilo, P. 2012: Mosaic structure of native ant supercolonies. — *Molecular Ecology* 21: 5880–5891.
- Slatkin, M. 1987: The Geographic Structure of Natural Populations. — *Science* 236: 787–792.
- Sorvari, J. 2009: Foraging distances and potentiality in forest pest insect control: an example with two candidate ants (Hymenoptera: Formicidae). — *Myrmecological News* 12: 211–215.
- Sturgis, S. J. & Gordon D.M. 2012: Nestmate recognition in ants (Hymenoptera: Formicidae): a review. — *Myrmecological News* 16: 101–110.
- Sundström, L. 1995: Dispersal polymorphism and physiological condition of males and females in the ant, *Formica truncorum*. — *Behavioral Ecology* 6: 132–139.
- Sundström, L. & Boomsma, J. J. 2001: Conflicts and alliances in insect families. — *Heredity* 86: 515–521.
- Sundström, L., Seppä, P. & Pamilo, P. 2005: Genetic population structure and dispersal patterns in *Formica* ants - a review. — *Annales Zoologici Fennici* 42: 163–177.
- Taylor, P. D. 1992: Altruism in viscous populations — an inclusive fitness model. — *Evolutionary Ecology* 6: 352–356.
- Trontti, K., Tay, W. T. & Sundström L. 2003: Polymorphic microsatellite markers for the ant *Plagiolepis pygmaea*. — *Molecular Ecology Notes* 3: 575–577.
- Tsutsui, N. D., Suarez, A. V., Holway, D. A. & Case, T. J. 2000: Reduced genetic variation and the success of an invasive species. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 5948–5953.
- Vitikainen, E. I. K., Haag-Liautard, C. & Sundström, L. 2015: Natal Dispersal, Mating Patterns, and Inbreeding in the Ant *Formica exsecta*. — *The American Naturalist* 186: 716–727.
- Vogel, V., Pedersen J. S., d’Ettorre, P., Lehmann, L. & Keller, L. 2009: Dynamics and genetic structure of Argentine ant supercolonies in their native range. — *Evolution* 63: 1627–1639.
- Vogel, V., Pedersen, J. S., Giraud, T., Krieger, M. J. B. & Keller, L. 2010: The worldwide expansion of the Argentine ant. — *Diversity and Distributions* 16: 170–186.
- West, S. A., Pen, I. & Griffin, A. S. 2002: Cooperation and Competition Between Relatives. — *Science* 296: 72–75.
- West, S. A., Griffin, A. S. & Gardner, A. 2007: Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. 20: 415–432.
- Wheeler, D. E. & Buck, N. A. 1996: Depletion of reserves in ant queens during claustral colony founding. — *Insectes Sociaux* 302: 297–302.
- Wheeler, W. M. 1911: The ant-colony as an organism. — *Journal of Morphology* 22: 307–325.
- Wilson, E. O. 1971: *The Insect Societies*. – Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 562 s.
- Wright, S. 1951: The genetical structure of populations. — *Annals of Eugenics* 15: 323–354.

## Liite. Mikrosatelliittiaineiston alleelifrekvenssit, Hardyn–Weinbergin tasapainotestit ja kytKentäepätasapainotestit

Taulukko L1. Alleelifrekvenssit ja onnistuneiden genotyypitysnäytteiden lukumäärä kullekin pellolle.

| Lokus       |                      | Pelto (suluissa onnistuneiden näytteiden lukumäärä) |                          |                         |                            |
|-------------|----------------------|---|--------------------------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Fe13</b> | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 224)</b>                          | <b>Storsand (N = 16)</b> | <b>Lillgård (N = 7)</b> | <b>Storgård (N = 29)</b>   |
|             | N                    | 224   | 16                       | 7                       | 29                         |
|             | 149                  | 0,161   | 0,469                    | 0,000                   | 0,310                      |
|             | 164                  | 0,192   | 0,438                    | 0,357                   | 0,207                      |
|             | 211                  | 0,076   | 0,063                    | 0,143                   | 0,034                      |
|             | 226                  | 0,065   | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                      |
|             | 229                  | 0,004   | 0,000                    | 0,000                   | 0,017                      |
|             | 232                  | 0,022   | 0,031                    | 0,214                   | 0,155                      |
|             | 235                  | 0,022   | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                      |
|             | 240                  | 0,009   | 0,000                    | 0,000                   | 0,052                      |
|             | 243                  | 0,239   | 0,000                    | 0,000                   | 0,121                      |
|             | 246                  | 0,203   | 0,000                    | 0,214                   | 0,086                      |
|             | 249                  | 0,000   | 0,000                    | 0,071                   | 0,000                      |
|             | 252                  | 0,007   | 0,000                    | 0,000                   | 0,017                      |
| <b>Fe19</b> | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 221)</b>                          | <b>Storsand (N = 15)</b> | <b>Lillgård (N = 7)</b> | <b>Storgård (N = 29)</b>   |
|             | 186                  | 0,036   | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                      |
|             | 190                  | 0,276   | 0,200                    | 0,429                   | 0,483                      |
|             | 192                  | 0,346   | 0,400                    | 0,286                   | 0,345                      |
|             | 194                  | 0,179   | 0,067                    | 0,071                   | 0,086                      |
|             | 198                  | 0,158   | 0,333                    | 0,000                   | 0,086                      |
|             | 200                  | 0,005   | 0,000                    | 0,214                   | 0,000                      |
| <b>Fe42</b> | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 220)</b>                          | <b>Storsand (N = 15)</b> | <b>Lillgård (N = 5)</b> | <b>Storgård (N = 28)</b>   |
|             | 272                  | 0,589   | 0,800                    | 0,800                   | 0,500                      |
|             | 274                  | 0,327   | 0,200                    | 0,200                   | 0,446                      |
|             | 276                  | 0,025   | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                      |
|             | 278                  | 0,059   | 0,000                    | 0,000                   | 0,054                      |
| <b>Fe51</b> | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 220)</b>                          | <b>Storsand (N = 14)</b> | <b>Lillgård (N = 7)</b> | <b>2 Storgård (N = 29)</b> |
|             | 85                   | 0,002   | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                      |
|             | 89                   | 0,050   | 0,107                    | 0,000                   | 0,103                      |
|             | 92                   | 0,159   | 0,179                    | 0,143                   | 0,155                      |
|             | 94                   | 0,332   | 0,107                    | 0,571                   | 0,517                      |
|             | 96                   | 0,361   | 0,321                    | 0,071                   | 0,121                      |
|             | 98                   | 0,095   | 0,286                    | 0,214                   | 0,103                      |
| <b>Fy4</b>  | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 189)</b>                          | <b>Storsand (N = 12)</b> | <b>Lillgård (N = 6)</b> | <b>Storgård (N = 22)</b>   |
|             | 277                  | 0,344   | 0,583                    | 0,083                   | 0,500                      |
|             | 279                  | 0,286   | 0,333                    | 0,083                   | 0,295                      |
|             | 281                  | 0,370   | 0,083                    | 0,833                   | 0,205                      |
| <b>Fe16</b> | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 173)</b>                          | <b>Storsand (N = 16)</b> | <b>Lillgård (N = 6)</b> | <b>Storgård (N = 28)</b>   |
|             | 166                  | 0,055   | 0,000                    | 0,083                   | 0,125                      |
|             | 172                  | 0,009   | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                      |
|             | 177                  | 0,003   | 0,031                    | 0,000                   | 0,000                      |
|             | 178                  | 0,049   | 0,000                    | 0,000                   | 0,036                      |
|             | 179                  | 0,035   | 0,000                    | 0,000                   | 0,143                      |

|             |                      |                            |                          |                         |                          |
|-------------|----------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 180         | 0,026                | 0,000                      | 0,000                    | 0,018                   |                          |
| 181         | 0,006                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 183         | 0,061                | 0,000                      | 0,000                    | 0,036                   |                          |
| 184         | 0,052                | 0,125                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 185         | 0,124                | 0,156                      | 0,000                    | 0,125                   |                          |
| 186         | 0,046                | 0,188                      | 0,000                    | 0,161                   |                          |
| 187         | 0,231                | 0,219                      | 0,250                    | 0,179                   |                          |
| 188         | 0,038                | 0,000                      | 0,083                    | 0,000                   |                          |
| 189         | 0,049                | 0,094                      | 0,583                    | 0,054                   |                          |
| 190         | 0,049                | 0,063                      | 0,000                    | 0,018                   |                          |
| 191         | 0,147                | 0,125                      | 0,000                    | 0,089                   |                          |
| 192         | 0,017                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 193         | 0,003                | 0,000                      | 0,000                    | 0,018                   |                          |
| <b>Fy7</b>  | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 210)</b> | <b>Storsand (N = 16)</b> | <b>Lillgård (N = 6)</b> | <b>Storgård (N = 29)</b> |
| 239         | 0,076                | 0,000                      | 0,000                    | 0,034                   |                          |
| 241         | 0,221                | 0,344                      | 0,500                    | 0,345                   |                          |
| 243         | 0,052                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 245         | 0,043                | 0,156                      | 0,167                    | 0,000                   |                          |
| 247         | 0,126                | 0,125                      | 0,167                    | 0,034                   |                          |
| 249         | 0,021                | 0,000                      | 0,000                    | 0,017                   |                          |
| 251         | 0,017                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 252         | 0,005                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 254         | 0,326                | 0,344                      | 0,167                    | 0,431                   |                          |
| 258         | 0,043                | 0,031                      | 0,000                    | 0,034                   |                          |
| 260         | 0,036                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 310         | 0,002                | 0,000                      | 0,000                    | 0,086                   |                          |
| 312         | 0,017                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 314         | 0,014                | 0,000                      | 0,000                    | 0,017                   |                          |
| <b>Fe37</b> | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 144)</b> | <b>Storsand (N = 16)</b> | <b>Lillgård (N = 5)</b> | <b>Storgård (N = 23)</b> |
| 116         | 0,021                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 118         | 0,139                | 0,156                      | 0,100                    | 0,130                   |                          |
| 127         | 0,010                | 0,000                      | 0,000                    | 0,217                   |                          |
| 129         | 0,493                | 0,375                      | 0,700                    | 0,174                   |                          |
| 131         | 0,125                | 0,125                      | 0,100                    | 0,239                   |                          |
| 133         | 0,135                | 0,281                      | 0,100                    | 0,239                   |                          |
| 135         | 0,076                | 0,063                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| <b>P22</b>  | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 222)</b> | <b>Storsand (N = 16)</b> | <b>Lillgård (N = 6)</b> | <b>Storgård (N = 28)</b> |
| 131         | 0,009                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 141         | 0,005                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 146         | 0,034                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 148         | 0,489                | 0,438                      | 0,667                    | 0,536                   |                          |
| 150         | 0,412                | 0,281                      | 0,250                    | 0,464                   |                          |
| 152         | 0,052                | 0,281                      | 0,083                    | 0,000                   |                          |
| <b>Fe38</b> | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 218)</b> | <b>Storsand (N = 16)</b> | <b>Lillgård (N = 7)</b> | <b>Storgård (N = 27)</b> |
| 66          | 0,041                | 0,000                      | 0,143                    | 0,019                   |                          |
| 70          | 0,064                | 0,000                      | 0,000                    | 0,000                   |                          |
| 72          | 0,209                | 0,281                      | 0,214                    | 0,259                   |                          |
| 74          | 0,005                | 0,031                      | 0,000                    | 0,037                   |                          |
| 78          | 0,218                | 0,281                      | 0,286                    | 0,259                   |                          |
| 80          | 0,069                | 0,063                      | 0,071                    | 0,111                   |                          |

|             |                      |                            |                          |                         |                          |
|-------------|----------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|             | 82                   | 0,124                      | 0,156                    | 0,071                   | 0,167                    |
|             | 84                   | 0,241                      | 0,156                    | 0,071                   | 0,019                    |
|             | 87                   | 0,030                      | 0,031                    | 0,143                   | 0,130                    |
| <b>Fl21</b> | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 220)</b> | <b>Storsand (N = 14)</b> | <b>Lillgård (N = 7)</b> | <b>Storgård (N = 28)</b> |
|             | 211                  | 0,384                      | 0,536                    | 0,143                   | 0,339                    |
|             | 213                  | 0,086                      | 0,000                    | 0,357                   | 0,054                    |
|             | 221                  | 0,177                      | 0,143                    | 0,286                   | 0,232                    |
|             | 223                  | 0,352                      | 0,321                    | 0,214                   | 0,375                    |
| <b>Fe11</b> | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 95)</b>  | <b>Storsand (N = 1)</b>  | <b>Lillgård (N = 0)</b> | <b>Storgård (N = 9)</b>  |
|             | 135                  | 0,221                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,111                    |
|             | 136                  | 0,095                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,056                    |
|             | 139                  | 0,079                      | 1,000                    | 0,000                   | 0,444                    |
|             | 140                  | 0,458                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,333                    |
|             | 141                  | 0,142                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,056                    |
|             | 142                  | 0,005                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                    |
| <b>Fe21</b> | <b>N<sub>A</sub></b> | <b>Särkkilen (N = 92)</b>  | <b>Storsand (N = 0)</b>  | <b>Lillgård (N = 0)</b> | <b>Storgård (N = 20)</b> |
|             | 82                   | 0,011                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                    |
|             | 98                   | 0,293                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                    |
|             | 100                  | 0,185                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                    |
|             | 102                  | 0,429                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                    |
|             | 104                  | 0,065                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                    |
|             | 106                  | 0,005                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                    |
|             | 108                  | 0,011                      | 0,000                    | 0,000                   | 0,000                    |

---



Taulukko L4. Fisherin menetelmällä estimoitu kytkentäepätasapaino kullekin mikrosatelliittilokusparille. Puuttuvat tiedot johtuvat epäonnistuneesta genotyypityksestä. Alle 0,05:n p-arvot on lihavoitu.

| Koko populaatio |          |    | Särkkilien   |             |          | Storsand |              |             | Lillgård |    |              | Storgård    |          |    |              |
|-----------------|----------|----|--------------|-------------|----------|----------|--------------|-------------|----------|----|--------------|-------------|----------|----|--------------|
| Lokuspari       | $\chi^2$ | df | p            | Lokuspari   | $\chi^2$ | df       | p            | Lokuspari   | $\chi^2$ | df | p            | Lokuspari   | $\chi^2$ | df | p            |
| Fe13 & Fe19     | 4,925    | 8  | 0,766        | Fe13 & Fe19 | 2,481    | 2        | 0,289        | Fe13 & Fe19 | 0,066    | 2  | 0,968        | Fe13 & Fe19 | 0,000    | 2  | 1,000        |
| Fe13 & Fe42     | 12,874   | 8  | 0,116        | Fe13 & Fe42 | 1,053    | 2        | 0,591        | Fe13 & Fe42 | 3,714    | 2  | 0,156        | Fe13 & Fe42 | 0,000    | 2  | 1,000        |
| Fe19 & Fe42     | 18,642   | 8  | <b>0,017</b> | Fe19 & Fe42 | 11,204   | 2        | <b>0,004</b> | Fe19 & Fe42 | 3,198    | 2  | 0,202        | Fe19 & Fe42 | 1,736    | 2  | 0,420        |
| Fe13 & Fe51     | 8,817    | 8  | 0,358        | Fe13 & Fe51 | 1,385    | 2        | 0,500        | Fe13 & Fe51 | 2,573    | 2  | 0,276        | Fe13 & Fe51 | 3,754    | 2  | 0,153        |
| Fe19 & Fe51     | 14,025   | 8  | 0,081        | Fe19 & Fe51 | 2,415    | 2        | 0,299        | Fe19 & Fe51 | 3,414    | 2  | 0,181        | Fe19 & Fe51 | 5,597    | 2  | 0,061        |
| Fe42 & Fe51     | 8,624    | 8  | 0,375        | Fe42 & Fe51 | 2,550    | 2        | 0,279        | Fe42 & Fe51 | 2,972    | 2  | 0,226        | Fe42 & Fe51 | 2,302    | 2  | 0,316        |
| Fe13 & Fy4      | 6,463    | 8  | 0,596        | Fe13 & Fy4  | 0,306    | 2        | 0,858        | Fe13 & Fy4  | 0,036    | 2  | 0,982        | Fe13 & Fy4  | 4,839    | 2  | 0,089        |
| Fe19 & Fy4      | 11,197   | 8  | 0,191        | Fe19 & Fy4  | 3,995    | 2        | 0,136        | Fe19 & Fy4  | 1,316    | 2  | 0,518        | Fe19 & Fy4  | 4,282    | 2  | 0,118        |
| Fe42 & Fy4      | 3,498    | 8  | 0,899        | Fe42 & Fy4  | 1,466    | 2        | 0,481        | Fe42 & Fy4  | 0,000    | 2  | 1,000        | Fe42 & Fy4  | 0,111    | 2  | 0,946        |
| Fe51 & Fy4      | 10,514   | 8  | 0,231        | Fe51 & Fy4  | 1,496    | 2        | 0,473        | Fe51 & Fy4  | 0,511    | 2  | 0,774        | Fe51 & Fy4  | 6,678    | 2  | <b>0,035</b> |
| Fe13 & Fe16     | 3,518    | 6  | 0,742        | Fe13 & Fe16 | 6,546    | 2        | <b>0,038</b> | Fe13 & Fe16 | 2,219    | 2  | 0,330        | Fe13 & Fe16 | 0,000    | 2  | 1,000        |
| Fe19 & Fe16     | 9,242    | 8  | 0,322        | Fe19 & Fe16 | 5,171    | 2        | 0,075        | Fe19 & Fe16 | 0,000    | 2  | 1,000        | Fe19 & Fe16 | 1,800    | 2  | 0,407        |
| Fe42 & Fe16     | 3,533    | 6  | 0,740        | Fe42 & Fe16 | 0,038    | 2        | 0,981        | Fe42 & Fe16 | 2,826    | 2  | 0,243        | Fe42 & Fe16 | 0,350    | 2  | 0,839        |
| Fe51 & Fe16     | 7,673    | 8  | 0,466        | Fe51 & Fe16 | 0,987    | 2        | 0,610        | Fe51 & Fe16 | 0,000    | 2  | 1,000        | Fe51 & Fe16 | 5,766    | 2  | 0,056        |
| Fy4 & Fe16      | 4,187    | 8  | 0,840        | Fy4 & Fe16  | 0,681    | 2        | 0,711        | Fy4 & Fe16  | 0,000    | 2  | 1,000        | Fy4 & Fe16  | 2,421    | 2  | 0,298        |
| Fe13 & Fy7      | 8,667    | 6  | 0,193        | Fe13 & Fy7  | 2,484    | 2        | 0,289        | Fe13 & Fy7  | 6,247    | 2  | <b>0,044</b> | Fe13 & Fy7  | 0,019    | 2  | 0,991        |
| Fe19 & Fy7      | 7,942    | 8  | 0,439        | Fe19 & Fy7  | 2,890    | 2        | 0,236        | Fe19 & Fy7  | 0,814    | 2  | 0,666        | Fe19 & Fy7  | 3,038    | 2  | 0,219        |
| Fe42 & Fy7      | 7,100    | 6  | 0,312        | Fe42 & Fy7  | 3,250    | 2        | 0,197        | Fe42 & Fy7  | 0,755    | 2  | 0,686        | Fe42 & Fy7  | 1,198    | 2  | 0,549        |
| Fe51 & Fy7      | 10,137   | 8  | 0,256        | Fe51 & Fy7  | 7,119    | 2        | <b>0,028</b> | Fe51 & Fy7  | 0,625    | 2  | 0,732        | Fe51 & Fy7  | 7,321    | 2  | <b>0,026</b> |

|             |         |   |                    |             |         |   |                    |             |       |   |              |             |       |   |       |             |       |   |              |
|-------------|---------|---|--------------------|-------------|---------|---|--------------------|-------------|-------|---|--------------|-------------|-------|---|-------|-------------|-------|---|--------------|
| Fy4 & Fy7   | 0,628   | 8 | 1,000              | Fy4 & Fy7   | 0,088   | 2 | 0,957              | Fy4 & Fy7   | 0,102 | 2 | 0,950        | Fy4 & Fy7   | 0,000 | 2 | 1,000 | Fy4 & Fy7   | 0,442 | 2 | 0,802        |
| Fe16 & Fy7  | 15,029  | 8 | 0,059              | Fe16 & Fy7  | 0,068   | 2 | 0,966              | Fe16 & Fy7  | 1,969 | 2 | 0,374        | Fe16 & Fy7  | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe16 & Fy7  | 9,826 | 2 | <b>0,007</b> |
| Fe13 & Fe37 | 4,137   | 8 | 0,845              | Fe13 & Fe37 | 1,741   | 2 | 0,419              | Fe13 & Fe37 | 0,444 | 2 | 0,801        | Fe13 & Fe37 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe13 & Fe37 | 1,870 | 2 | 0,393        |
| Fe19 & Fe37 | 7,235   | 8 | 0,512              | Fe19 & Fe37 | 2,952   | 2 | 0,229              | Fe19 & Fe37 | 0,853 | 2 | 0,653        | Fe19 & Fe37 | 2,363 | 2 | 0,307 | Fe19 & Fe37 | 1,198 | 2 | 0,549        |
| Fe42 & Fe37 | 5,153   | 8 | 0,741              | Fe42 & Fe37 | 2,647   | 2 | 0,266              | Fe42 & Fe37 | 0,000 | 2 | 1,000        | Fe42 & Fe37 | 2,188 | 2 | 0,355 | Fe42 & Fe37 | 0,619 | 2 | 0,734        |
| Fe51 & Fe37 | 4,900   | 8 | 0,768              | Fe51 & Fe37 | 2,083   | 2 | 0,353              | Fe51 & Fe37 | 0,000 | 2 | 1,000        | Fe51 & Fe37 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe51 & Fe37 | 1,125 | 2 | 0,570        |
| Fy4 & Fe37  | 14,580  | 8 | 0,068              | Fy4 & Fe37  | 0,649   | 2 | 0,723              | Fy4 & Fe37  | 5,853 | 2 | 0,054        | Fy4 & Fe37  | 1,842 | 2 | 0,398 | Fy4 & Fe37  | 7,511 | 2 | <b>0,023</b> |
| Fe16 & Fe37 | 17,784  | 8 | <b>0,023</b>       | Fe16 & Fe37 | 9,751   | 2 | <b>0,008</b>       | Fe16 & Fe37 | 9,183 | 2 | 0,010        | Fe16 & Fe37 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe16 & Fe37 | 0,000 | 2 | 1,000        |
| Fy7 & Fe37  | 2,327   | 8 | 0,969              | Fy7 & Fe37  | 2,727   | 2 | 0,256              | Fy7 & Fe37  | 0,319 | 2 | 0,853        | Fy7 & Fe37  | 0,000 | 2 | 1,000 | Fy7 & Fe37  | 0,065 | 2 | 0,968        |
| Fe13 & P22  | 9,538   | 8 | 0,299              | Fe13 & P22  | 7,602   | 2 | <b>0,022</b>       | Fe13 & P22  | 6,946 | 2 | <b>0,051</b> | Fe13 & P22  | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe13 & P22  | 0,152 | 2 | 0,927        |
| Fe19 & P22  | 5,513   | 8 | 0,702              | Fe19 & P22  | 4,697   | 2 | 0,096              | Fe19 & P22  | 0,019 | 2 | 0,990        | Fe19 & P22  | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe19 & P22  | 0,443 | 2 | 0,801        |
| Fe42 & P22  | 10,990  | 8 | 0,202              | Fe42 & P22  | 7,032   | 2 | <b>0,030</b>       | Fe42 & P22  | 0,342 | 2 | 0,843        | Fe42 & P22  | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe42 & P22  | 3,148 | 2 | 0,207        |
| Fe51 & P22  | 9,197   | 8 | 0,326              | Fe51 & P22  | 7,878   | 2 | <b>0,019</b>       | Fe51 & P22  | 0,333 | 2 | 0,847        | Fe51 & P22  | 4,556 | 2 | 0,102 | Fe51 & P22  | 1,338 | 2 | 0,512        |
| Fy4 & P22   | 5,017   | 8 | 0,756              | Fy4 & P22   | 3,595   | 2 | 0,166              | Fy4 & P22   | 0,444 | 2 | 0,801        | Fy4 & P22   | 0,000 | 2 | 1,000 | Fy4 & P22   | 1,601 | 2 | 0,449        |
| Fe16 & P22  | 11,661  | 8 | 0,167              | Fe16 & P22  | 2,232   | 2 | 0,328              | Fe16 & P22  | 0,000 | 2 | 1,000        | Fe16 & P22  | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe16 & P22  | 7,877 | 2 | <b>0,019</b> |
| Fy7 & P22   | Ääretön | 8 | <b>&lt; 0,0001</b> | Fy7 & P22   | Ääretön | 2 | <b>&lt; 0,0001</b> | Fy7 & P22   | 1,474 | 2 | 0,479        | Fy7 & P22   | 0,000 | 2 | 1,000 | Fy7 & P22   | 7,805 | 2 | <b>0,020</b> |
| Fe37 & P22  | 6,740   | 8 | 0,565              | Fe37 & P22  | 6,016   | 2 | 0,049              | Fe37 & P22  | 0,294 | 2 | 0,863        | Fe37 & P22  | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe37 & P22  | 0,648 | 2 | 0,723        |
| Fe13 & Fe38 | Ääretön | 8 | <b>&lt; 0,0001</b> | Fe13 & Fe38 | 11,483  | 2 | <b>0,003</b>       | Fe13 & Fe38 | 9,288 | 2 | <b>0,010</b> | Fe13 & Fe38 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe13 & Fe38 | 0,563 | 2 | 0,755        |
| Fe19 & Fe38 | 2,916   | 8 | 0,940              | Fe19 & Fe38 | 0,695   | 2 | 0,706              | Fe19 & Fe38 | 1,150 | 2 | 0,568        | Fe19 & Fe38 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe19 & Fe38 | 1,407 | 2 | 0,495        |
| Fe42 & Fe38 | 4,796   | 6 | 0,570              | Fe42 & Fe38 | 2,441   | 2 | 0,295              | Fe42 & Fe38 | 2,028 | 2 | 0,363        | Fe42 & Fe38 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe42 & Fe38 | 2,095 | 2 | 0,351        |
| Fe51 & Fe38 | 6,487   | 8 | 0,593              | Fe51 & Fe38 | 2,597   | 2 | 0,273              | Fe51 & Fe38 | 1,982 | 2 | 0,371        | Fe51 & Fe38 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe51 & Fe38 | 0,192 | 2 | 0,908        |
| Fy4 & Fe38  | 8,840   | 8 | 0,356              | Fy4 & Fe38  | 5,413   | 2 | 0,067              | Fy4 & Fe38  | 0,000 | 2 | 1,000        | Fy4 & Fe38  | 1,001 | 2 | 0,606 | Fy4 & Fe38  | 2,879 | 2 | 0,237        |



|             |        |   |              |             |       |   |              |             |       |   |              |             |       |   |       |             |        |   |              |
|-------------|--------|---|--------------|-------------|-------|---|--------------|-------------|-------|---|--------------|-------------|-------|---|-------|-------------|--------|---|--------------|
| Fe16 & Fe38 | 24,456 | 8 | <b>0.002</b> | Fe16 & Fe38 | 8,950 | 2 | <b>0.011</b> | Fe16 & Fe38 | 4,180 | 2 | 0.124        | Fe16 & Fe38 | 4,772 | 2 | 0.092 | Fe16 & Fe38 | 10,725 | 2 | <b>0.005</b> |
| Fy7 & Fe38  | 17,293 | 8 | <b>0.027</b> | Fy7 & Fe38  | 5,185 | 2 | 0.075        | Fy7 & Fe38  | 8,547 | 2 | <b>0.014</b> | Fy7 & Fe38  | 0,000 | 2 | 1,000 | Fy7 & Fe38  | 1,420  | 2 | 0.492        |
| Fe37 & Fe38 | 2,835  | 8 | 0.944        | Fe37 & Fe38 | 1,713 | 2 | 0.425        | Fe37 & Fe38 | 1,669 | 2 | 0.434        | Fe37 & Fe38 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe37 & Fe38 | 0,000  | 2 | 1,000        |
| P22 & Fe38  | 1,064  | 8 | 0.998        | P22 & Fe38  | 0,000 | 2 | 1,000        | P22 & Fe38  | 0,194 | 2 | 0.908        | P22 & Fe38  | 0,000 | 2 | 1,000 | P22 & Fe38  | 0,797  | 2 | 0.671        |
| Fe13 & FI21 | 3,995  | 8 | 0.858        | Fe13 & FI21 | 1,585 | 2 | 0.500        | Fe13 & FI21 | 3,342 | 2 | 0.188        | Fe13 & FI21 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe13 & FI21 | 0,941  | 2 | 0.625        |
| Fe19 & FI21 | 12,968 | 8 | 0.113        | Fe19 & FI21 | 7,666 | 2 | <b>0.022</b> | Fe19 & FI21 | 0,000 | 2 | 1,000        | Fe19 & FI21 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe19 & FI21 | 2,790  | 2 | 0.248        |
| Fe42 & FI21 | 7,102  | 8 | 0.526        | Fe42 & FI21 | 0,522 | 2 | 0.770        | Fe42 & FI21 | 1,251 | 2 | 0.535        | Fe42 & FI21 | 2,177 | 2 | 0.357 | Fe42 & FI21 | 5,223  | 2 | 0.073        |
| Fe51 & FI21 | 12,096 | 8 | 0.147        | Fe51 & FI21 | 7,326 | 2 | <b>0.026</b> | Fe51 & FI21 | 0,000 | 2 | 1,000        | Fe51 & FI21 | 2,910 | 2 | 0.233 | Fe51 & FI21 | 2,286  | 2 | 0.319        |
| Fy4 & FI21  | 7,403  | 8 | 0.494        | Fy4 & FI21  | 3,146 | 2 | 0.207        | Fy4 & FI21  | 1,392 | 2 | 0.498        | Fy4 & FI21  | 1,010 | 2 | 0.604 | Fy4 & FI21  | 1,499  | 2 | 0.473        |
| Fe16 & FI21 | 7,995  | 8 | 0.434        | Fe16 & FI21 | 1,037 | 2 | 0.596        | Fe16 & FI21 | 6,536 | 2 | <b>0.038</b> | Fe16 & FI21 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe16 & FI21 | 0,536  | 2 | 0.765        |
| Fy7 & FI21  | 6,117  | 8 | 0.634        | Fy7 & FI21  | 1,805 | 2 | 0.405        | Fy7 & FI21  | 0,795 | 2 | 0.672        | Fy7 & FI21  | 0,000 | 2 | 1,000 | Fy7 & FI21  | 3,574  | 2 | 0.167        |
| Fe37 & FI21 | 16,617 | 8 | <b>0.034</b> | Fe37 & FI21 | 7,408 | 2 | <b>0.025</b> | Fe37 & FI21 | 9,423 | 2 | <b>0.009</b> | Fe37 & FI21 | 2,406 | 2 | 0.300 | Fe37 & FI21 | 1,594  | 2 | 0.451        |
| P22 & FI21  | 7,197  | 8 | 0.515        | P22 & FI21  | 1,202 | 2 | 0.548        | P22 & FI21  | 1,365 | 2 | 0.505        | P22 & FI21  | 0,000 | 2 | 1,000 | P22 & FI21  | 2,442  | 2 | 0.295        |
| Fe38 & FI21 | 10,632 | 8 | 0.223        | Fe38 & FI21 | 4,103 | 2 | 0.129        | Fe38 & FI21 | 6,524 | 2 | <b>0.038</b> | Fe38 & FI21 | 0,000 | 2 | 1,000 | Fe38 & FI21 | 1,118  | 2 | 0.572        |
| Fe13 & Fe11 | 0,810  | 4 | 0.937        | Fe13 & Fe11 | 0,841 | 2 | 0.657        | Fe13 & Fe11 |       |   |              | Fe13 & Fe11 |       |   |       | Fe13 & Fe11 | 0,000  | 2 | 1,000        |
| Fe19 & Fe11 | 5,443  | 4 | 0.245        | Fe19 & Fe11 | 4,419 | 2 | 0.110        | Fe19 & Fe11 |       |   |              | Fe19 & Fe11 |       |   |       | Fe19 & Fe11 | 0,526  | 2 | 0.769        |
| Fe42 & Fe11 | 0,714  | 4 | 0.950        | Fe42 & Fe11 | 0,058 | 2 | 0.971        | Fe42 & Fe11 |       |   |              | Fe42 & Fe11 |       |   |       | Fe42 & Fe11 | 0,624  | 2 | 0.732        |
| Fe51 & Fe11 | 6,816  | 4 | 0.146        | Fe51 & Fe11 | 1,136 | 2 | 0.567        | Fe51 & Fe11 |       |   |              | Fe51 & Fe11 |       |   |       | Fe51 & Fe11 | 5,178  | 2 | 0.075        |
| Fy4 & Fe11  | 2,362  | 4 | 0.670        | Fy4 & Fe11  | 1,788 | 2 | 0.409        | Fy4 & Fe11  |       |   |              | Fy4 & Fe11  |       |   |       | Fy4 & Fe11  | 0,000  | 2 | 1,000        |
| Fe16 & Fe11 | 2,945  | 2 | 0.229        | Fe16 & Fe11 | 2,651 | 2 | 0.266        | Fe16 & Fe11 |       |   |              | Fe16 & Fe11 |       |   |       | Fe16 & Fe11 |        |   |              |
| Fy7 & Fe11  | 14,785 | 4 | <b>0.005</b> | Fy7 & Fe11  | 3,941 | 2 | 0.139        | Fy7 & Fe11  |       |   |              | Fy7 & Fe11  |       |   |       | Fy7 & Fe11  | 9,286  | 2 | <b>0.010</b> |
| Fe37 & Fe11 | 3,881  | 4 | 0.422        | Fe37 & Fe11 | 4,697 | 2 | 0.096        | Fe37 & Fe11 |       |   |              | Fe37 & Fe11 |       |   |       | Fe37 & Fe11 | 0,000  | 2 | 1,000        |

|             |       |   |       |             |       |   |              |             |             |             |       |   |       |
|-------------|-------|---|-------|-------------|-------|---|--------------|-------------|-------------|-------------|-------|---|-------|
| P22 & Fe11  | 7,291 | 4 | 0,121 | P22 & Fe11  | 1,974 | 2 | 0,373        | P22 & Fe11  | P22 & Fe11  | P22 & Fe11  | 5,597 | 2 | 0,061 |
| Fe38 & Fe11 | 1,621 | 4 | 0,805 | Fe38 & Fe11 | 1,360 | 2 | 0,507        | Fe38 & Fe11 | Fe38 & Fe11 | Fe38 & Fe11 | 0,000 | 2 | 1,000 |
| Fl21 & Fe11 | 7,215 | 4 | 0,125 | Fl21 & Fe11 | 8,556 | 2 | <b>0,014</b> | Fl21 & Fe11 | Fl21 & Fe11 | Fl21 & Fe11 | 0,000 | 2 | 1,000 |
| Fe13 & Fe21 | 1,608 | 2 | 0,448 | Fe13 & Fe21 | 2,637 | 2 | 0,268        | Fe13 & Fe21 | Fe13 & Fe21 | Fe13 & Fe21 |       |   |       |
| Fe19 & Fe21 | 5,665 | 2 | 0,059 | Fe19 & Fe21 | 6,712 | 2 | <b>0,035</b> | Fe19 & Fe21 | Fe19 & Fe21 | Fe19 & Fe21 |       |   |       |
| Fe42 & Fe21 | 3,244 | 2 | 0,198 | Fe42 & Fe21 | 3,243 | 2 | 0,198        | Fe42 & Fe21 | Fe42 & Fe21 | Fe42 & Fe21 |       |   |       |
| Fe51 & Fe21 | 0,367 | 2 | 0,832 | Fe51 & Fe21 | 0,354 | 2 | 0,838        | Fe51 & Fe21 | Fe51 & Fe21 | Fe51 & Fe21 |       |   |       |
| Fy4 & Fe21  | 1,948 | 2 | 0,377 | Fy4 & Fe21  | 1,958 | 2 | 0,376        | Fy4 & Fe21  | Fy4 & Fe21  | Fy4 & Fe21  |       |   |       |
| Fe16 & Fe21 | 3,667 | 2 | 0,160 | Fe16 & Fe21 | 3,176 | 2 | 0,204        | Fe16 & Fe21 | Fe16 & Fe21 | Fe16 & Fe21 |       |   |       |
| Fy7 & Fe21  | 0,021 | 2 | 0,990 | Fy7 & Fe21  | 0,096 | 2 | 0,953        | Fy7 & Fe21  | Fy7 & Fe21  | Fy7 & Fe21  |       |   |       |
| Fe37 & Fe21 | 2,237 | 2 | 0,327 | Fe37 & Fe21 | 2,769 | 2 | 0,251        | Fe37 & Fe21 | Fe37 & Fe21 | Fe37 & Fe21 |       |   |       |
| P22 & Fe21  | 1,747 | 2 | 0,417 | P22 & Fe21  | 1,902 | 2 | 0,386        | P22 & Fe21  | P22 & Fe21  | P22 & Fe21  |       |   |       |
| Fe38 & Fe21 | 0,003 | 2 | 0,998 | Fe38 & Fe21 | 0,002 | 2 | 0,999        | Fe38 & Fe21 | Fe38 & Fe21 | Fe38 & Fe21 |       |   |       |
| Fl21 & Fe21 | 0,477 | 2 | 0,788 | Fl21 & Fe21 | 0,407 | 2 | 0,816        | Fl21 & Fe21 | Fl21 & Fe21 | Fl21 & Fe21 |       |   |       |
| Fe11 & Fe21 | 2,097 | 2 | 0,350 | Fe11 & Fe21 | 2,085 | 2 | 0,353        | Fe11 & Fe21 | Fe11 & Fe21 | Fe11 & Fe21 |       |   |       |



