



HELSINGIN YLIOPISTO  
HELSINGFORS UNIVERSITET  
UNIVERSITY OF HELSINKI

# Kemosensoristen geenien kastispesifinen ilmentyminen suomumuurahaisilla

Pro gradu -tutkielma

Helsingin yliopisto

Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta

Ekologia ja evoluutiobiologia

Kesäkuu 2020

Noora Huusari



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Biologian koulutusohjelma	
Tekijä – Författare – Author Noora Emilia Huusari (Os. Parkkonen)			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Kemosensoristen geenien kastispesifinen ilmentyminen suomumuurahaisilla			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Ekologia ja evoluutiobiologia, Biologian opettajan suuntautumisvaihtoehto			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year 6/2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 40
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Sosiaaliset hyönteiset, joihin muurahaiset kuuluvat elävät yhteiskunnissa, joissa esiintyy selvä työnjako lisääntyvien yksilöiden ja työläiskastin välillä. Yhteiskunta voi koostua suurimmillaan jopa miljoonista yksilöistä ja kuningatarten määrä voi vaihdella voimakkaasti. Populaatioita, joissa kussakin pesässä on vain yksi tai muutamia kuningattaria voidaan kutsua sukulaizrakenteisiksi, sillä niissä yksilöiden välinen sukulaisuus yhteiskunnan sisällä on korkeaa. Populaatioita, joissa on runsaasti kuningattaria, ja yhteiskunta muodostuu useista toisiinsa liitoksissa olevista pesistä, voidaan kutsua superkolonioiksi. Tällaisissa yhteiskunnissa yksilöiden välinen sukulaisuus on matalaa ja työläiset edustavat useita geneettisiä linjoja.</p> <p>Lajista ja elinympäristöstä riippuen yhteiskunnat käyttäytyvät tyypillisesti vieraiden pesien yksilöitä kohtaan aggressiivisesti suojellen omaa pesäänsä. Jotta yhteiskunnan puolustus olisi mahdollista, on muurahaisten kyettävä tunnistamaan oman yhteiskuntansa jäsenet tunkeutujista. Pesätovereiden tunnistus on tärkeä tekijä yhteiskuntien ja lajien välisessä vuorovaikutuksessa ja sen ansiosta työläiset voivat suosia omia pesätovereitaan hoivan, puolustuksen tai ravinnonhankinnan kautta ja näin lisätä myös omaa kokonaiskelpoisuuttaan. Pesätovereiden tunnistuskyvyn kannalta kemiallisen informaation aistiminen on merkityksellisessä roolissa. Tunnistukseen liittyviä kemiallisia aineita muurahaiset aistivat pääasiassa tuntosarvissaan ilmentyvien proteiinien avulla.</p> <p>Tässä työssä tutkin seitsemän suomumuurahaislajilla oletetusti kemosensoriseen aistimukseen liittyvien geenien ilmentymistä RT-qPCR -menetelmän avulla. Tutkimuslajini olivat sukulaizrakenteiset karvaloviniska, niittymuurahainen, ja mustamuurahainen sekä superkoloniaaliset kantomuurahainen, kaljuloviniska, samettimuurahainen ja tupsukekomuurahainen. Tarkastelen tuoksua sitovaa proteiinia (OBP), kemosensoriproteiinia (CSP) ja makuaistinreseptoria (GRT) tuottavien geenien ilmentymistä ja haluan selvittää, eroaako näiden geenien ilmentyminen lajien ja kastien välillä. Työssäni vertaan myös sukulaizrakenteisten ja superkoloniaalisten lajien kemosensoristen geenien kastispesifiä ilmentymistä.</p> <p>Koska työläisillä on muurahaisyhteiskunnassa paljon tehtäviä, joiden hoitaminen vaatii tehokasta aistinjärjestelmää, hypoteesini on, että tutkimusgeeniini ilmentyvät työläisillä voimakkaammin kuin kuningattarilla. Lisäksi uskon geenien ilmentyvän työläisissä voimakkaammin sukulaizrakenteisilla lajeilla, sillä niiden työläiset ovat superkoloniaalisia lajeja aggressiivisempia tunkeutujia kohtaan ja kohtaavat pesän ulkopuolisia yksilöitä useammin, kuin valtavissa superkolonioissa elävät yksilöt. Superkolonioissa tyypillisten matalasta sukulaisuudesta johtuvien konfliktien vuoksi uskon superkoloniaalisten kuningatarten kemosensorigeenien ilmentymisen olevan sukulaizrakenteisten yhteiskuntien kuningatarten geenin ilmentymistä voimakkaampaa.</p> <p>Tutkimusgeeneistä voimakkaammin ilmentyi OBP ja vähäisintä oli GRT-geenin ilmentyminen. CSP:n ilmentyminen oli näiden geenien ilmentymisen välillä. Hypoteesini mukaisesti geenien ilmentyminen oli työläisillä kuningattaria voimakkaampaa OBP:lla ja CSP:lla kaikilla lajeilla ja GRT:lla kuudella seitsemästä lajista. Sukulaizrakenteisten lajien kemosensoristen geenien kastispesifi ilmentyminen ei ollut superkoloniaalisia lajeja voimakkaampaa, vaan lajien välillä havaittiin vaihtelua, joka ei näyttänyt riippuvan populaatioiden polygynia-asteesta. Tutkimuksessani selvisi myös OBP- ja CSP-geenien ilmentymisen olevan korreloitunutta.</p> <p>Tulokseni olivat kastien osalta hypoteesini mukaisia ja voivat kertoa työläisten paremmasta haju- ja makuaistista sekä pesätoveruuden tunnistuskyvystä. Tutkimukseni tarjoaa arvokasta tietoa vielä melko vähän tutkitusta tunnistusjärjestelmään liittyvien kemosensoristen geenien ilmentymisestä ja herättää useita uusia mielenkiintoisia tutkimuskysymyksiä. Kemiallisen aistinjärjestelmän tutkimusta on tehty laajalla skaalalla, mutta geenien ilmentymisen tasolla työskäkaa vielä riittää.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Suomumuurahaiset, <i>Formica</i> , kemiallinen kommunikaatio, kemosensaatio, pesätovereiden tunnistus, tuoksua sitova proteiini, kemosensoriproteiini, makuaistinreseptori, OBP, CSP, GRT, geenien ilmentyminen, RT-qPCR, superkolonia, sukulaizrakenteisuus			
Ohjaajat – Handledare – Supervisors Heikki Helanterä, FT, dosentti ja Claire Morandin, FT			
Säilytyspaikka – Förvaringsställe – Where deposited Helsingin yliopisto, Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of biological and Environmental Sciences		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Department of Biosciences	
Tekijä – Författare – Author Noora Emilia Huusari (Os. Parkkonen)			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Caste-specific expression of chemosensory genes in <i>Formica</i> -ants			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Ecology and Evolution Biology			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's thesis		Aika – Datum – Month and year 6/2020	
Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 40			
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Social insects such as ants live in societies and have a strict division of labor between reproductive and worker castes. A colony can consist of even millions of individuals and the number of queens can vary a lot. Populations where each colony comprises just one or few queens are often called kin structured because the relatedness between nestmates is high. Colonies that have lots of queens and the society lives in many connected nests (polydomy) in are referred to as supercolonies. In these colonies relatedness between individuals is low and the workers represent many genetic lineages.</p> <p>Depending on species and the environment where the colony lives societies can behave aggressively towards individuals from other nests to protect their own nest. Ants must be able to recognize members of their own colony from the intruders to be able to protect the nest. Nestmate recognition is a key element in the interaction between nests and species and makes it possible for the workers in the colony to favour their own nestmates in form of care, defence or food acquisition to gain inclusive fitness benefits. To recognise nestmates ants must be able to sense chemical cues. Ants detect these chemical signals through the proteins expressed mainly in their antennae.</p> <p>In this thesis I studied gene expression of genes related to chemosensation in seven <i>Formica</i> species using the RT-qPCR method. My study species were kin structured <i>Formica exsecta</i>, <i>F. pratensis</i> and <i>F. fusca</i> and supercolonial <i>F. truncorum</i>, <i>F. pressilabris</i>, <i>F. cinerea</i> and <i>F. aquilonia</i>. My study genes belong to gene families that code for odorant binding proteins (OBP), chemosensory proteins (CSP) and gustatory receptors (GRT). I want to find out whether the expression of these genes differs between castes, and whether the caste difference varies between kin structured and supercolonial species.</p> <p>Workers have many tasks in the ant colony and to take care of them, they need to have a sophisticated sensory system. For that reason, I expect to find out that the study genes are expressed more in the worker than the queen caste. In addition, I expect the caste difference in gene expression to be higher in the kin structured species than in the supercolonial species. That is because kin structured species behave more aggressively towards intruders and possibly confront intruders more often than the individuals living in supercolonies. Furthermore, in the supercolonies low relatedness between individuals sometimes lead to conflicts inside the nest. For that reason, I suppose queens of the supercolonies express chemosensory genes more than the queens from the kin structured colonies.</p> <p>Overall expression level was the highest for the OBP and the lowest for GRT. The expression level of CSP was in between these extremes. In accordance with my hypothesis gene expression of OBP and CSP was higher in workers in all the study species. GRT expression was worker biased in six of the seven species. Caste difference in expression of chemosensory genes was similar in kin structured and supercolonial species. The expression level varied between species but did not show a pattern depending on the degree of the polygyny. The study revealed that the expression of OBP and CSP is correlated.</p> <p>My results revealed expected worker biased pattern in the expression. The result might be a consequence of better olfactory or taste abilities in the worker caste compared to queens or it may even be consequence of more sophisticated nestmate recognition skills of the workers. This study reveals valuable information about the gene expression of chemosensory genes related to the recognition system in the ants and awakes many new study questions. Chemical sensory system has been studied a lot in the ants, but in the field of expression studies there is still lot to reveal.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Formica</i> , ants, chemical communication, chemosensation, nestmate recognition, odour binding protein, chemosensory protein, gustatory receptor, OBP, CSP, GRT, gene expression, RT-qPCR, supercolony, kin structure			
Ohjaajat – Handledare – Supervisors Heikki Helanterä, Ph.D., Docent and Claire Morandin, Ph.D.			
Säilytyspaikka – Förvaringsställe – Where deposited University of Helsinki, Viikki campus library			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO.....	1
1.1.	Altruismin evoluutio ja sukulaivalinta.....	1
1.2.	Sosiaaliset hyönteiset .....	1
1.3.	Muurahaisyhteiskuntien rakenne .....	2
1.4.	Pesätovereiden ja sukulaisten tunnistus .....	4
1.5.	Tuoksujen merkitys muurahaisten viestinnässä.....	5
1.6.	Hajuaistimus ja sen genetiikka .....	5
1.7.	Geeniperheiden evoluutio hajuaistimukseen liittyvillä geeneillä .....	6
1.8.	Tutkimuksen kohdegeenit ja niiden ilmentyminen .....	8
1.9.	Geenien ilmentyminen ja kastien väliset erot ilmentymisessä .....	10
1.10.	Tutkimuksen tarkoitus ja tutkimushypoteesit.....	11
2.	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	12
2.1.	Tutkimuslajit .....	12
2.2.	Näytteiden keruu.....	14
2.3.	Tunnistusgeenien ilmentymisen tutkiminen kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla.....	15
2.3.1.	<i>RNA-eristys</i> .....	15
2.3.2.	<i>cDNA-synteesi</i> .....	16
2.3.3.	<i>Geenien ilmentymisen suhteellinen kvantifiointi</i> .....	16
2.3.4.	<i>Kontrolligeenit</i> .....	17
2.3.5.	<i>Kohdegeenien valinta ja etsintä geenipankista</i> .....	18
2.3.6.	<i>Alukkeiden suunnittelu</i> .....	18
2.3.7.	<i>qPCR ajo-olosuhteet</i> .....	19
2.4.	Tilastolliset analyysit.....	20
2.4.1.	<i>Kuningatarten ja työläisten geenien ilmentymisen vertaaminen</i> .....	21
2.4.2.	<i>Kohdegeenien ilmentymisen välinen korrelaatio</i> .....	21
3.	TULOKSET .....	22
3.1.	Tuoksuja sitova proteiini, OBP.....	23
3.2.	Kemosensoriproteiini, CSP .....	24
3.3.	Makuaistinreseptori, GRT .....	25
3.4.	Tutkimusgeenien korrelaatio.....	27
4.	TULOSTEN TARKASTELU .....	28
4.1.	Kastierot geenien ilmentymisessä.....	28
4.2.	Geenien ilmentyminen kastien sisällä .....	30

4.3.	Kudosspesifisyys geenien ilmentymisessä.....	30
4.4.	Geenien nimeämisestä ja tehtävistä muurahaisilla.....	32
4.5.	Tutkimusgeenien evoluutio taipumus.....	32
4.6.	Lopuksi.....	33
	KIITOKSET.....	34
	VIITELUETTELO.....	35

## 1. JOHDANTO

### 1.1. Altruismin evoluutio ja sukulaisvalinta

Eusosiaalisia eli aitososiaalisia lajeja yhdistää kolme piirrettä: vanhempien ja jälkeläisten päällekkäiset sukupolvet, yhteistoiminnallinen jälkeläisten hoito ja lisääntymisen suhteen erilaistunut kastijako (Alexander ym. 1991, Michener 1969, Nowak ym. 2010, Wilson 1971). Eusosiaalisia lajeja tavataan niin hyönteisten (Insecta) luokassa, kuin kymmenjalkaisten (Decapoda) ja jyrsijöidenkin (Rodentia) lahkossa (Crozier & Pamilo 1996). Sosiaalisia hyönteisiä voidaan pitää altruistisen käyttäytymisen ääripäänä ja malliesimerkkinä. Esimerkiksi monet muurahais- tai mehiläistyöläiset eivät lisäännä lainkaan, vaan elävät pesässä auttaen muuta yhteiskuntaa läpi elämänsä (Hamilton 1964).

Luonnonvalinnan näkökulmasta altruismia voi olla hankala ymmärtää, sillä se, että valinta suosii alleelia, joka johtaa toista yksilöä hyödyttävään ja alleelia kantavalle yksilölle haitalliseen käyttäytymiseen, vaikuttaa ristiriitaiselta. Luonnossa valinta voi kuitenkin suosia ominaisuuksia, jotka johtavat yksilön oman kelpoisuuden vähenemiseen, jos kyseiset ominaisuudet samalla lisäävät läheistä sukua olevien yksilöiden selviytyvyyttä ja kelpoisuutta. Tämä ymmärrys johti kokonaiskelpoisuuden käsitteen syntyyn (Hamilton 1964).

Ottaen huomioon suoran kelpoisuuden (oman lisääntymismenestyksen kautta saavutettu) ja epäsuoran kelpoisuuden (sukulaisten lisääntymismenestyksen kautta saavutettu) Hamilton (Hamilton 1964) kehitti geneettisen mallin, jonka mukaan altruistista käyttäytymistä suosiva alleeli voi lisääntyä populaatiossa tietyissä olosuhteissa. Sukulaisvalinnan teorian mukaan epäitsekkäs avunanto kannattaa silloin, kun epäitsekkäästi toimiva yksilö tuottaa käyttäytymisellään riittävän suurta hyötyä omille sukulaisilleen toiminnasta aiheutuviin kustannuksiin nähden, eli kun Hamiltonin sääntö:  $r * B > C$  pätee. Kaavassa  $r$  tarkoittaa avunantajan ja saajan välistä sukulaisuutta,  $B$  hyötyjä, jotka mitataan lisääntymismenestyksenä ja  $C$  kustannuksia, joita avunannosta koituu lisääntymismenestykselle.

### 1.2. Sosiaaliset hyönteiset

Hyönteisten luokkaan kuuluu yli puolet tunnetuista eliölajeista ja luultavasti lähes sama määrä hyönteislajeja on vielä tunnistamatta. Suuri osa hyönteisistä on yksineläjiä, mutta esimerkiksi muurahaiset (Formicidae), jotkin ampiaiset (Vespidae) ja mehiläiset (Anthophila), sekä termitit (Isoptera), elävät hyvin järjestäytyneinä yhteiskuntina. Näitä edellä mainittuja hyönteisiä yhdistää sosiaalisuus ja termiittejä lukuun ottamatta ne kuuluvat pistiäisiin (Hymenoptera).

Sosiaaliset pistiäiset edustavat sosiaalisen evoluution huippua. Muurahaisyhteiskunnassa voi parhaimmillaan elää jopa miljoonia yksilöitä, jotka toimivat pikemminkin yhteiskuntansa osina kuin omaa etuaan ajavina yksilöinä. Työläisten (jälkeläisten hoivaajien ja sotilaiden) ja lisääntyvien yksilöiden (kuningatarnten ja koiraiden) kastit voidaan erottaa toisistaan ulkomuotonsa ja käyttäytymisensä perusteella (Steiner ym. 2010). Tämä sosiaalinen järjestäytyneisyys näyttää kehittyneen pistiäisten sukupuussa useampaan kertaan, eli esimerkiksi ampiaisisissa ja muurahaisissa eri aikaan (Wilson 1971).

Pistiäisten lisääntymisjärjestelmä on epätavallinen moniin muihin lajeihin verrattuna. Koiraat ovat haploideja ja naaraat diploideja. Koiraat kehittyvät hedelmöittymättömistä ja naaraat hedelmöittyneistä munista. Tällaisen haplodiploidisen lisääntymisjärjestelmän vuoksi naaraspuoliset yksilöt ovat keskimäärin lähempää sukua siskoilleen (sukulaisuuskerroin 0,75) kuin omille jälkeläisilleen (sukulaisuuskerroin 0,5). Tämä johtuu siitä, että siskot jakavat kaikki samat geenit, jotka ne perivät isältään (puolet tytärten perimästä). Toisen puolen geneistään tyttäret perivät luonnollisesti äidiltään (yhteiskunnan kuningattarelta). Veljilleen pistiäistyttäret ovat keskimäärin vain neljännessukulaisia (Hamilton 1972). Ero jälkeläisten välisessä sukulaisuudessa voi saada työläiset manipuloimaan yhteiskuntarakennetta ja suuntaamaan suurimman osan hoivastaan naarasjälkeläisille. Tämä voi evoluutiossa suosia altruistista käyttäytymistä (Rosset & Chapuisat 2006).

Pitkään uskottiin, että juuri tämä pistiäisten erityinen lisääntymisjärjestelmä olisi ajanut nämä lajit aitososiaalisuuteen. Nykyisin kuitenkin hypoteesi on pitkälti hylätty ja aitososiaalisuuden ajatellaan syntyneen sen sijaan erilaisten ekologisten tekijöiden ja monogamisen (yksiavioisuus) elämän seurauksena. Vaikuttaa siltä, että aitososiaalisuus on kehittynyt nimenomaan pysyvien ravinnonlähteiden läheisyydessä sijaitsevien pesäpaikkojen puolustamiseksi (Boomsma 2009). Sosiaalisuuden synty ei ole vaatinut uusia ominaisuuksia työläisiltä vaan ainoastaan toimintatavan muutoksia, jotka ovat johtaneet omien jälkeläisten hoivaamisesta sisarien hoivaamiseen. Kun pesässä on ollut vain yksi lisääntyvä kuningatar (monogamia), joka on paritellut vain yhden koiraan kanssa, on pesänsisäinen sukulaisuus ollut korkea, sillä kaikki uudet syntyvät työläiset ovat tällöin myös sisaruksia keskenään. Lopulta erilaistuminen ja uusien kastien (esim. sotilaat) muodostuminen on tapahtunut ympäristön paineesta luonnonvalinnan toimiessa yksilönkehityksen alkuvaiheessa (Boomsma 2009, Boomsma & Gawne 2018, Hamilton 1972, Nowak ym. 2010, Wilson 2008).

### 1.3. Muurahaisyhteiskuntien rakenne

Muurahaiset elävät yhteiskuntina, joista käytetään tavallisesti myös nimitystä pesä. Toisinaan yhteiskunta eläekin vain yhdessä pesässä, mutta on olemassa myös runsaasti muurahaislajeja, joiden yhteiskunta koostuu

useista toisiinsa yhteydessä olevista pesistä (Hölldobler & Wilson 1990, Steiner 2010). Tällaista pesimisstrategiaa, jossa yhteiskunta asuttaa useampaa kuin yhtä pesää kutsutaan polydomiaksi.

Lisääntyvien yksilöiden määrä yhteiskunnassa vaikuttaa voimakkaasti sen rakenteeseen. Kuningatarten rooli on tärkeä, sillä juuri ne parittelevat, lisääntyvät, levittäytyvät, perustavat uusia yhteiskuntia ja kasvattavat olemassa olevien yhteiskuntien kokoa (Crozier & Pamilo 1996). Yhteiskunnassa voi olla joko yksi tai useampia kuningattaria. Yhden kuningattaren yhteiskuntia kutsutaan monogynisiksi ja yhteiskuntia, joissa kuningattaria on useita, kutsutaan polygynisiksi. Yhteiskunnan rakennetta ja pesän sisäistä sukulaisuutta muokkaa kuningatarmäärän lisäksi se, kuinka monen koiraan kanssa kuningatar tai kuningattaret parittelevat. Tällöin yhteiskunnassa olevat työläiset ovat peräisin myös eri isälinjoista ja ovat näin entistä etäisempää sukua toisilleen (Tarpy ym. 2004).

Monogynisiä tai lievästi polygynisiä (muutamia kuningattaria) populaatioita voidaan kutsua myös sukulaisrakenteisiksi. Sukulaisrakenteisissa populaatioissa pesät ovat perheryhmiä, joissa sukulaisuus on melko korkea. Nämä yhteiskunnat ovat usein aggressiivisia pesään tukeutuvia vieraita yksilöitä kohtaan (olipa sitten kyse saman tai eri lajin yksilöistä), eivätkä hyväksy näiden läsnäoloa pesässään (Crozier & Pamilo 1996).

Superkoloniaalisuus on polydomian äärimuoto, sillä superkoloniaalinen yhteiskunta on tyypillisesti niin suuri, etteivät eri pesissä elävät työläiset välttämättä koskaan kohtaa toisiaan ja yhteiskunta on liian suuri yhden muurahaisen läpikäveltäväksi (Helanterä ym. 2009, Pedersen ym. 2006). Superkoloniaalisilla lajeilla on tavallisesti useita tai jopa satoja kuningattaria samassa pesässä ja potentiaalia kasvaa sopivassa elinympäristössä jopa rajattomasti (Moffett 2012). Superkoloniaalisissa yhteiskunnissa pesät ovat yhteydessä toisiinsa ja näiden yhteiskuntien yksilöt vaeltavat pesien välillä. Superkoloniaalisten lajien aggressiivisuus yhteiskunnan ulkopuolisia tunkeutujia kohtaan vaihtelee, mutta yhteiskunnan sisällä pesien välillä vaeltaviin yksilöihin suhtaudutaan suopeasti. Tämä viittaisi siihen, että niillä on kyky tunnistaa mitkä yksilöt ovat osa samaa superkoloniaa ja mitkä tulevat kokonaan toisesta yhteiskunnasta (Collingwood 1979, Czechowski ym. 2002, Seifert 2000, Sundström ym. 2003).

Superkolonioissa, joissa kuningattaria on runsaasti ja työläiset edustavat useita geneettisiä sukulinjoja, sukulaisuus on sukulaisrakenteisiin yhteiskuntiin verrattuna todella matalaa. Superkolonioissa matala sukulaisuus voi johtaa yhteistyön hälvenemiseen, jolloin työläiset keskittyvät auttamaan pesässä itselleen läheisempää sukua olevia pesätovereita, eikä ketä tahansa yhteiskunnan jäsentä, kasvattaen näin oman sukulinjansa kelpoisuutta. Tämä on mahdollista, jos työläiset kykenevät tunnistamaan sukulaisensa muista yhteiskunnan yksilöistä. Superkoloniaalisilla lajeilla konfliktien synty on todennäköistä ja tekee superkoloniaalisista lajeista yhä mielenkiintoisempia evolutiivisesti näkökulmasta. Mahdollisia konflikteja näennäisesti rauhallisessa muurahaisyhteiskunnassa voi nousta esimerkiksi siitä, minkä kuningattaren jälkeläistöä hoivataan, mitkä munat joutuvat toukkien kannibalismien kohteeksi, sukupuolijakauman manipuloinnista ja siitä kuka tuottaa yhteiskunnassa koiraita: työläiset sekä kuningattaret voivat molemmat



pyrkii parantamaan omaa kelpoisuuttaan koiraita tuottamalla (Helanterä ym. 2016, Ratnieks ym. 2006, Schultner ym. 2014).

#### 1.4. Pesätovereiden ja sukulaisten tunnistus

Sukulaisten tai pesätovereiden tunnistus on tärkeä osa sosiaalista käyttäytymistä ja sen evoluutiota. Koska altruistinen käyttäytyminen tuo tullessaan myös kustannuksia, on työläisten kyettävä tunnistamaan oman yhteiskuntansa jäsenet pesän ulkopuolisista yksilöistä. Oman pesän yksilöiden tunnistuksen vuoksi työläiset voivat suosia omia pesätovereitaan hoivan, puolustuksen tai ravinnonhankinnan kautta (van Zweden & d’Ettorre 2010).

Sosiaalisten hyönteisten kuten muurahaisten kohdalla on kuitenkin hyvä tehdä ero sukulaisten ja pesätovereiden tunnistuksen välille. Nämä kaksi ilmiötä ovat pohjimmiltaan eri asioita. Tehokas yhteiskunnan jäsenten tunnistus pesän ulkopuolisista yksilöistä (pesätovereiden tunnistus) on tärkeää hyönteisyhteiskuntien järjestäytymisen kannalta. Pesätovereiden tunnistuksen turvin yhteiskunta voi välttää muun muassa varastelua ja parasitismia (Breed 2014, Holmes 2004, Sturgis & Gordon 2012). Pesätovereiden tunnistamisen ansiosta yhteiskunta kykenee erottamaan oman yhteisönsä jäsenet ulkopuolisista tunkeutujista ja puolustamaan pesäänsä näiden hyökkäyksiltä. Pesätovereiden tunnistus on siis tärkeä tekijä yhteiskuntien ja lajien välisessä vuorovaikutuksessa.

Sukulaisten tunnistus liittyy puolestaan pesän sisällä tapahtuvaan yksilöiden tunnistamiseen. Kuten jo aiemmin mainitsin, muurahaisyhteiskunnat koostuvat toisilleen sukua olevista yksilöistä mutta sukulaisuus saman pesän yksilöiden kesken voi vaihdella. Yhteiskunnissa, joissa esiintyy sekä polygyniaa että polyandriaa (useita parittelevia koiraita) jälkeläiset ovat useista isä- ja äitilinjista, johtuen tilanteeseen, jossa sukulaisten tunnistus voi vaikuttaa kunkin työläisen kelpoisuuteen. Jos työläinen kykenee erottamaan pesän sisällä yksilöt, jotka ovat sille muita läheisempää sukua, työläinen voi kasvattaa omaa kelpoisuuttaan nepotistisen käyttäytymisen kautta (esim. antaen lähisukuisen yksilön jälkeläisille muita enemmän hoivaa ja ravintoa) (Breed 2014, Holmes 2004, Sturgis & Gordon 2012). Sukulaisten tunnistamisella voisi olla merkitystä myös superkolonioille tyyppisten konfliktien synnyssä ja ratkaisussa (Helanterä ym. 2016, Schultner ym. 2014).

Vaikka sukulaisten tunnistusta on tutkittu melko paljon, todisteet sen olemassaolosta ovat vielä melko vähäisiä. Mustamuurahaisella (*Formica fusca*) on voitu osoittaa työläisten suosivan omia sukulaisiaan jälkeläisten hoivassa (Hannonen & Sundström 2003), mutta esimerkiksi karvaloviniskalla (*Formica exsecta*) on havaittu, etteivät työläiset erota läheistä sukua olevia yksilöitä ei-sukulaisistaan (Holzer ym. 2006). Tämä ei kuitenkaan tarkoita, etteikö sukulaisvalinta olisi tärkeä tekijä sosiaalisten hyönteisten

tunnistuskemian kehittämisessä. Ekologiset paineet ovat vaan muovanneet yhteiskuntia yhä monimutkaisemmiksi järjestelmiksi, joissa pesätoveruuden tunnistamisesta on suurempia etuja kuin sukulaisuuden tunnistamisesta. Näin ollen sosiaaliset hyönteiset, erityisesti suurissa yhteiskunnissa, tekevät yhteistyötä ehkä pikemminkin tuttuuteen (kts. 1.5) kuin geneettiseen samanlaisuuteen nojautuen. Lisäksi aitososiaalisen elintavan kehittyminen alun perin monogamisissa perheryhmissä, joissa pesän jäsenet ovat myös aina läheisiä sukulaisia, on varmasti vaikuttanut siihen, ettei sukulaistentunnistusta ole tarvittu, vaan pesätoveruuden tunnistaminen on riittänyt (Boomsma 2009).

### 1.5. Tuoksujen merkitys muurahaisten viestinnässä

Koska muurahaisyhteiskunta toimii vahvasti yhtenä yksikkönä, on kommunikaatio pesän yksilöiden välillä tärkeää. Ylivoimaisesti merkityksellisin viestintäkeino muurahaisille ja muille sosiaalisille hyönteisille on kemiallinen kommunikaatio. Niinpä myös pesätovereiden tunnistaminen tapahtuu pääasiassa aistimalla kemiallisia vihjeitä.

Tärkeimpiä tunnistukseen liittyvistä kemiallisista aineista ovat kutikulan (hyönteisen kova ulkokuori) hiilivety-yhdisteet (d’Ettorre & Lenoir 2010). Yhteiskunnan jäsenet havaitsevat kunkin yksilön ominaisen kemiallisen tuoksun kutikulan pinnan hiilivetyjä haistamalla. Nämä hiilivedyt voivat olla sisäsyntyisiä eli geenien ohjaamana tuotettuja tai ne voivat olla elinympäristöstä tai sosiaalisesta kanssakäymisestä peräisin. Nuoret yksilöt oppivat yhteiskunnan tuoksun ja omaksuvat sen myös osaksi omaa tuoksuaan elinympäristön hajujen synteessin, jälkeläishoivan ja nestemäisen ruuan vaihdon kautta. Opittuaan yhteiskuntansa tuoksun ne pystyvät erottamaan yhteiskunnan ulkopuolisen tuoksun vertaamalla sitä oman yhteiskuntansa tuoksuun (d’Ettorre & Lenoir 2010, Leboeuf ym. 2016, Soroker & Hefetz 2000, van Zweden & d’Ettorre 2010).

### 1.6. Hajuaistimus ja sen genetiikka

Hyönteiset aistivat hajuja erityisten hajuaistinelinten, sensillojen avulla. Sensillat sijaitsevat muurahaisilla pääasiassa niiden tuntosarvissa, mutta niitä löytyy myös jaloista ja siivistä. Tuoksujen kemiallisessa aistimuksessa toimii useita proteiineja, joiden tehtävänä on välittää hajuaaineita huokoisen kutikulan pinnalta aistinkarvojen imunesteeseen. Imunesteessä olevat proteiinit puolestaan toimivat reseptoreina, jotka käynnistävät aistinreaktioketjun, joka lopulta johtaa hajuaistin neuroneille (d’Ettorre & Lenoir 2010).

Kemiallisten viestien vastaanottamisessa toimii useisiin eri geeniperheisiin kuuluvia proteiineja, joiden evoluution on myös havaittu tapahtuvan geeniperhetasolla (Pelosi ym. 2006). Tuoksuja sitovat proteiinit (jatkossa myös englanninkielisen nimensä mukaisesti OBP (odor binding protein)), toimivat aistimuksen välittäjinä tässä tapahtumaketjussa ja ovat siksi olennainen osa hajujen tunnistamista (d’Ettorre & Lenoir 2010, González ym. 2009, Xu ym. 2009). Niiden kuten kemosensoriproteiinienkin (jatkossa myös englanninkielisen nimensä mukaisesti CSP (chemosensory protein)) tehtävä on vastata nimenomaan tuoksujen ja feromonien kuljetuksesta ja liukoiseksi tekemisestä hyönteisten nestemäisessä hemolymfassa (Leal 2013, Leal ym. 2005, Ozaki ym. 2005).

Makuaistinreseptorien (jatkossa englanninkielisen nimiensä mukaisesti myös GR (gustatory reseptor)) sen sijaan ajatellaan liittyvän hajuaistimuksen lisäksi myös makuaistimukseen, sillä eräiden GR koodaavien geenien on todettu ilmentyvän hyönteisten suuosien lisäksi myös esimerkiksi banaanikärpästen (*Drosophila melanogaster*) tuntosarvissa. Hajuaistimuksessa GR:n ajatellaan toimivat yhdessä tuoksureseptorien (OR, odor receptor) kanssa, sitomalla spesifisesti tiettyjä liukoisia hajuaineita ja välittämällä niiden aistimusta yhä eteenpäin aistinreaktioketjussa (Vosshall & Stocker 2007).

Tutkimuksessani tarkasteltavat geenit kuuluvat näihin kolmeen eri haju- ja makuaistimukseen osallistuvaan geeniperheeseen ja kunkin geeniperheen koko vaihtelee paljon lajien välillä. OBP:n on todettu muuntelevan CSP:a enemmän lajien välillä sekä lajin sisällä. CSP:a koodaavien geenien on puolestaan havaittu olevan OBP:a koodaavia geenejä konservoituneempia kaukaista sukua olevien lajienkin välillä (Pelosi ym. 2006).

OBP-geeniperheeseen kuuluu hyönteisillä 4 - 81 geeniä ja CSP-geeniperhe koostuu 3 - 22 geenistä (Forêt & Maleszka 2006, Forêt ym. 2007, Gong ym. 2007, Vieira & Rozas 2011). Nämä proteiinit kuuluvat eri geeniperheisiin, mutta niillä on mahdollisesti yhteinen evolutiivinen alkuperä 380 - 450 miljoonan vuoden takaa (Vieira & Rozas 2011). GR-geeniperheen koko puolestaan vaihtelee hyönteisillä tarhamehiläisen (*Apis mellifera*) 13 ja argentiinanmuurahaisen (*Linepithema humile*) 117 välillä (Robertson & Wanner 2006, Smith ym. 2011).

### 1.7. Geeniperheiden evoluutio hajuaistimukseen liittyvillä geneillä

Vaikka usein geenien toiminnasta puhutaan yksinkertaistetusti kertoen mitä mikäkin geeni tekee, on usein kuitenkin kyse geeniperheistä, joilla tarkoitetaan todennäköisesti yhteistä alkuperää olevien DNA-sekvensseiltään samankaltaisten geenien ryhmää (ortologiset geenit), jotka koodaavat samankaltaisia proteiineja. Geeniperheistä puhutaan myös silloin, kun sama geeni esiintyy useana kopiona (kahdentumat, duplikaatiot) genomissa. Geeniperheet laajentuvat nimenomaan duplikaatioiden seurauksena ja supistuvat

geenien kuoleman seurauksena tai geenien muuttuessa pseudogeeneiksi. Pseudogeenit muistuttavat toiminnallisia geenejä, mutta eivät ole enää toiminnallisia.

Geeniperheisiin kuuluvien geenien määrä voi vaihdella runsaasti niin lajien välillä kuin lajin sisälläkin (Schridder & Hahn 2010). Kopioiden määrän vaihtelulla on tärkeä rooli adaptaatiossa. Eri kopioiden erilaisen adaptaation seurauksena eliö voi sopeutua rakenteellisesti ja toiminnallisesti ympäristöönsä ja muuntelu voi mahdollistaa näin uusien ominaisuuksien synnyn (Innan & Kondrashov 2010, Sánchez-Gracia ym. 2009). Geeniperheen sisällä tapahtuvan geenien nopean vaihtuvuuden on osoitettu korreloivan nopean sekvenssitason evoluution kanssa (Chen ym. 2010) ja kooltaan konservoituneiden geeniperheiden tiedetään evolvoituvan sekvenssitasolla hitaasti.

Eräissä toiminnallisissa geeniryhmissä on havaittu toistuvasti geenien voimakasta lisääntymistä tai häviämistä. Näiden joukossa on geenejä, jotka liittyvät immuunipuolustukseen, stressivasteeseen, metaboliaan, solujen signaalointiin, lisääntymiseen ja kemosenzaatioon (hajujen, makujen ja feromonien aistiminen) (Demuth & Hahn 2009). Tutkimukseni geenit liittyvät nimenomaan hajujen ja makujen aistimiseen, joten geeniperhetason evoluutio on tutkimukseni kannalta mielenkiintoista.

Haju- ja makuaistimukseen liittyviä geenejä on tutkittu useilla hyönteisillä (Nozawa & Nei 2007, Sánchez-Gracia ym. 2009, Smadja ym. 2009, Vieira & Rozas 2011, Vieira ym. 2007, Zhou ym. 2012), mutta kemosenzisten geeniperheiden sisältä on löydetty vain harvoja geenejä, jotka ovat ortologisia useissa eri hyönteislahkoissa. Ortologisten geenien määrä vähenee nopeasti, kun lajiutumuksesta kulunut aika kasvaa (Vieira & Rozas 2011). Kemosenzisten geeniperheiden laajentumat ovatkin pääasiassa alaheimokohtaisia ja niiden uskotaan liittyvän muuttuvaan ympäristöön reagointiin. Monet tutkimukset toteavat kemosenzisten geeniperheiden evolvoituvan puhdistavan valinnan vaikutuksesta ja että positiivinen valinta vaikuttaa niihin vain vähäisissä määrin, jos ollenkaan (Forêt ym. 2007, Gardiner ym. 2008, Sánchez-Gracia ym. 2009, Vieira ym. 2007, Zhou ym. 2012).

Muurahaisten CSP-geeneissä on havaittu toistuvia laajentumia ja nopeaa sekvenssievoluutiota. CSP-geeniperhe koostuu muurahaisilla kahdesta ryhmästä geenejä, joiden evoluutio eroaa toisistaan (Kulmuni ym. 2013). Viimeisimpänä kahdentuneissa muurahaisspesifisissä CSP-geeneissä on havaittu nopeaa evoluutiota ja duplikaatiotaipumusta positiivisen valinnan alla. Toisen ryhmän geenien ortologeja löytyy kaikista muurahaisista (osa myös mehiläisistä). Tämän ryhmän evoluutio on hitaampaa, geeneihin vaikuttaa voimakas puhdistava valinta eikä näillä geeneillä ole taipumusta duplikoitua. Erilainen evoluutiotapa voi viitata näiden geenien erilaisiin tehtäviin. Muurahaisspesifinen laajentuma ja nopea evoluutio liitettyinä positiiviseen valintaan viittaa siihen, että muurahaisten CSP-geeneissä tapahtuu adaptiivista evoluutiota (Kulmuni ym. 2013).

Hyönteisten kemoreseptorien geeniperheen katsotaan koostuvan tuoksuseseptorien (OR) ja makuseseptorien (GR) geeniperheistä, joiden uskotaan olevan evolutiivisesti samaa alkuperää (Robertson ym. 2003, Scott ym. 2001). OR-geenien määrä on tässä joukossa runsastunut voimakkaasti. GR:t pitävät

sisällään hyvin monimuotoisia proteiineja (Robertson ym. 2003) ja siksi geeniperheen nimikin on harhaanjohtava. Ryhmä on nimetty banaanikärpäsen suosissa ilmentymisen mukaan, mutta ryhmän geenien on havaittu ilmentyvän myös muissa makuaistimukseen liittyvissä ruumiinosissa (Clyne ym. 2000). GR-geenit ilmentyvät myös hajuaistinelimissä, kuten tuntosarvissa, jonka vuoksi makureseptorien oletetaan toimivan myös tuoksureseptoreina (Fishilevich & Vosshall 2005, Scott ym. 2001, Suh ym. 2004). GR-geeniperhe on OBP:n ja CSP:n tapaan laajentunut hyönteisillä duplikaatioiden myötä. GR:ien ja niille läheistä sukua olevien OR-geenien määrä on kuitenkin pysynyt muurahaisten ryhmässä pitkään vakaana ja GR-geeniperheen duplikaatioiden uskotaan tapahtuneen jo *Formicidae*-ryhmän esi-isissä (Zhou ym. 2012).

Muurahaisilla (*Camponotus floridanus* ja *Harpegnathos saltator*) on tunnistettu 13 GR-geenien alaperhettä, joissa muinaiset duplikaatiot ja lajiryhmäkohtaiset laajentumat on havaittavissa. Suurimmat laajentumat löytyvät nimenomaan muurahaisspesifisestä GR-geeniperheestä ja GR-geenejä, kuten muitakin kemoreseptioon liittyviä geenejä, on löydetty muurahaisilta enemmän kuin tarhamehiläisiltä (Zhou ym. 2012). Tämä voisikin viestiä muurahaisten hienostuneemmasta kommunikaatiojärjestelmästä. Lisäksi maku- ja hajureseptoreja koodaavissa geeneissä tapahtuva vaihtuvuus (uusien geenien synty ja vanhojen geenien kuolema), viittaa siihen, että jotkin tekijät ajavat nopeaa evoluutiota muurahaisten kemiallisessa aistinjärjestelmässä. Yksi selitys voisi löytyä muutoksista muurahaisten monimutkaisissa CHC-profiileissa, jotka kontrolloivat niiden sosiaalista käytöstä.

### 1.8. Tutkimuksen kohdegeenit ja niiden ilmentyminen

OBP:ja on tutkittu erityisesti maailmanlaajuisesti levittäytyneellä invasiivisella tulimuurahaisella (*Solenopsis invicta*). Tulimuurahaiselta on löydetty 23 OBP-geeniperheen geeniä, (Pracana ym. 2017), joista osaa tavataan vain muurahaisilla. Yksi tutkituimmista *S. invictan* OBP-geeneistä on aiemmin Gp-9:ksi nimetty nykyisin OBP3-nimellä kulkeva geeni, jonka on ajateltu liittyvän lajin yhteiskuntien sosiaaliseen dimorfismiin (Yhteiskunnassa on joko vain yksi kuningatar tai jopa tuhansia kuningattaria.) (Pracana ym. 2017, Zhang ym. 2016). Sosiaalisen dimorfismin syy piilee Gp-9 geenissä, jonka alleeleista toisen on havaittu esiintyvän vain ja ainoastaan tulimuurahaisen polygynisissä, muttei koskaan monogynisissä yhteiskunnissa (Krieger & Ross 2002). Työläiset voivat säädellä kuningatarten määrää yhteiskunnassa kuningatarten OBP3-geenin ilmentymisen (kuningattaren erilaiset kemialliset signaalit) perusteella. Geeni kuuluu myös niin sanottuun sosiaaliseen kromosomiin ja säätelee kytkeytyneesti monen muunkin ominaisuuden ilmentymistä. Tuntosarvien lisäksi geeni ilmenee myös muissa kudoksissa, joten sen toiminnallisuus on yhä arvoitus (Wang ym. 2013).

OBP-geenit ilmenevät tyypillisesti muurahaisten tuntosarvissa, mutta *S. invictalla* kasti- ja ruumiinosaspesifinen (tuntosarvet, pää, keskiruumis ja takaruumis) tarkastelu on osoittanut OBP-geenien ilmentyvän jopa tätä voimakkaampaa pään ja keskiruumiin alueella kaikilla kasteilla (työläiset, koiraat ja kuningattaret). Lisäksi geenien ilmentyminen on voimakasta koiraiden ja kuningattarten takaruumiissa. Kokonaisuudessaan OBP-geenien ilmentyminen on *S. invictalla* kuningattarilla koiraita ja työläisiä voimakkaampaa. Yksittäiset OBP-geenit ovat lajilla keskenään eri tavalla ilmentyneitä ja ilmeneminen vaihtelee eri kasteilla ja kudoksissa yksilöllisesti, viitaten OBP:n moninlaisiin funktioihin hajuaistin lisäksi (Zhang ym. 2016).

Muurahaisilla CSP-geeniperhe pitää sisällään lajista riippuen 11 - 21 toiminnallista geeniä (Kulmuni ym. 2013). Nämä CSP-geenit ilmentyvät OBP:n tapaan tyypillisesti muurahaisten tuntosarvissa. *Camponotus japonicus* -muurahaisella on havaittu erään tietyn CSP:n olevan lajin tuntosarvissa voimakkaimmin ilmentyvä proteiini ja tämän nimenomaisen proteiinin tiedetään kiinnittyvän kutikulan hiilivetyihin, joita käytetään pesätovereiden tunnistamisessa (Ozaki ym. 2005). Näin ollen muutokset tässä proteiinissa voisivat aiheuttaa vaihtelua siihen, miten työläiset hyväksyvät toisia yksilöitä ja erottavat ystävät vihollisista.

Tulimuurahaisen (*S. invicta*) tuntosarvienv pääasiallisesti ekspressoituva proteiini on myös CSP, joka sitoutuu kutikulan komponentteihin, mutta ei hiilivetyihin (González ym. 2009). Tämä ei kuitenkaan sulje pois sen mahdollista roolia pesätovereiden tunnistamisessa, jos tunnistaminen perustuu tulimuurahaisilla muihin aineisiin kuin hiilivetyihin (González ym. 2009). Kahden edellä mainitun lisäksi argentiinanmuurahaisen (*L. humile*) on osoitettu myös ilmentävän CSP:a tuntosarviensa pääproteiineina (Ishida ym. 2002). Näiden esimerkkien lisäksi yksittäisten CSP-geenien tarkkoja tehtäviä ei tunneta hyvin muurahaisilla. Mehiläisillä tehdyt ekspressiotutkimukset viittaavat siihen, että niillä CSP:t ovat geeniperhe, jolla on monia tehtäviä, joista yksi on hajujen ja makujen aistiminen (Forêt ym. 2007).

GR-geenien on havaittu ilmentyvän hyönteisten suosissa. Ne kuitenkin ilmentyvät myös esimerkiksi banaanikärpästen tuntosarvissa (Vosshall & Stocker 2007) spesifisesti tietyissä neuroneissa ja leukarimoissa, joiden viejähaarakkeet johtavat aivolohkon alueelle, jolla käsitellään tuntosarviltä tulevaa aisti-informaatiota. Jos nämä kyseiset makuaistinreseptorit toimivat myös hajuaistimuksessa, voidaan hajuaistinreseptorien toiminnallisuuden pitää tämän tiedon valossa evolvoituneen erikseen useampia kertoja GR-geeniperheen sisällä. Tämän ominaisuuden ajatellaan kehittyneen mahdollisesti maalla elävien hyönteisten kehityksessä vedessä eläneistä esi-isistään noin 400 miljoonaa vuotta sitten (Dunipace ym. 2001, Scott ym. 2001).

## 1.9. Geenien ilmentyminen ja kastien väliset erot ilmentymisessä

Geenien ilmentyminen tarkoittaa geenin koodaamien ominaisuuksien ilmentymistä eliön ilmiössä eli fenotyyppissä ja se voidaan havaita usealla tasolla geneettisestä transkriptiosta eliöiden rakenteiden, toimintojen ja käyttäytymisen muotoihin asti (Tirri ym. 2006). Geneettisen transkription tasolla geenien ilmentyminen tarkoittaa geenin sisältämän informaation muokkaamista toiminnalliseksi proteiiniksi. Erilainen geenien ilmentyminen mahdollistaa yksilöiden sopeutumisen ympäristöönsä. Geenien säätely voi toimia evolutiivisten muutosten ohjaajana, sillä geenien säätely vaikuttaa geenien ilmentymisen määrään, aikaan ja paikkaan. Toisin sanoen geenien säätely vaikuttaa voimakkaasti geenien toimintaan eliöissä.

Yksi sosiaalisten hyönteisten tärkeimmistä ominaispiirteistä on kastijärjestelmä. Sosiaalisten hyönteisten kastin määräytyminen perustuu kahden erilaisen fenotyypin, työläisten ja kuningattaren kehittymiseen yhdestä ja samasta genotyypistä. Kastien genomeissa ei ole eroja ja kastin määräytyminen on seurausta yksilöiden erilaisesta geenien ilmentymisestä (Evans & Wheeler 1999, Gräff ym. 2007, Liu & Zhang 2004).

Kastierot ovat erityisen mielenkiintoisia geenien ilmentymisen tutkimuksen näkökulmasta, sillä kastien tehtävät muurahaisyhteiskunnassa ovat täysin erilaisia. Kuningattaren tehtävä yhteiskunnassa on lisääntyä ja työläiset hoitavat käytännössä kaikki muut yhteiskunnan työt; pesän puolustuksen, ravinnonhankinnan, jälkeläisten hoidon ja pesän puhtaanapidon. Erikoistunut tehtäväjako on seurausta erilaisesta geenien ilmentymisestä ja se myös aiheuttaa erilaisia geenien ilmentämistarpeita. Työläisten aktiivinen rooli pesän ylläpitotehtävissä saa aikaan tarpeen tarkalle haju- ja makuaistille sekä tehokkaalle pesätovereiden tunnistusjärjestelmälle. Kuningattaren pesänsisäinen munintatehtävä ei puolestaan vaadi erityisen tarkkaa aistinjärjestelmää. Toki pesän ulkopuolella kuningattaren aistinjärjestelmällä on tärkeitä tehtäviä niin paritteluun liittyvissä signaaleissa kuin pesänperustamisessakin. Näistä ekologisista lähtökohdista sekä aiempien havaintojen pohjalta voimme olettaa haju- ja makuaistingeenien ilmentymisen eroavan kastien välillä (Chau & Goodisman 2017, Hunt ym. 2011).

Geenien ilmentyminen eri tavoin kasteilla on välttämätöntä, mutta voi saattaa työläisillä ilmentyvät geenit alttiiksi mutaatioiden kumuloitumiselle ja näin jopa vahingoittaa yhteiskuntaa. Kastierot vaikuttavat evoluutionopeuteen ja ovat siksi tärkeä tekijä hyönteisten sosiaalisessa evoluutiossa (Evans & Wheeler 1999, Gräff ym. 2007, Helanterä ym. 2009, Liu & Zhang 2004). Esimerkiksi tulimuurahaisen geenit, joilla havaitaan kastieroja, evoluutuvat nopeammin kuin geenit joilla kastieroja ei havaita (Hunt ym. 2011). Kuningattarilla voimakkaammin ilmentyvien geenien evoluutio on mehiläisillä nopeampaa, kuin niiden geenien, joiden ilmentymien ei eroa kastien välillä tai joita työläiset ilmentävät kuningattaria voimakkaammin (Hunt ym. 2011). Jotta geenien ilmentymisen toiminnallisuuksiin ja sekvenssievoluutioon saataisiin vastauksia, täytyy geenien ilmentymisen pysyvyyttä ymmärtää. Tässä apunamme voi toimia

tutkimukset, joita tehdään kapealla fylogeneettisellä joukolla, eli toisilleen läheistä sukua olevien lajien välillä. Tässä tutkimuksessa kannan oman pienen korteni yhteiseen kekkoon.

#### 1.10. Tutkimuksen tarkoitus ja tutkimushypoteesit

Tämän työn tarkoitus on tutkia kemialliseen kommunikaatioon ja pesätovereiden tunnistukseen liittyvien geenien ilmentymistä suomumurahaisilla. Tutkimuksessani selvitän miten tunnistukseen ja kemialliseen kommunikaatioon liittyvien geenien ilmentyminen vaihtelee seitsemän suomumurahaislajin välillä. Tarkoitukseni on verrata sukulaisrakenteisten ja superkoloniaalisten lajien geenien ilmentymistä toisiinsa ja selvittää onko näiden lajien kemosensoiristen geenien ilmentymisessä eroja. Erot näissä geneeissä voisivat tarkoittaa, että myös lajien pesätovereiden tunnistuskyvyssä on eroja.

Hypoteesini on, että pesätovereiden tunnistus on voimakkaampaa sukulaisrakenteisilla lajeilla, koska nämä lajit ovat superkoloniaalisia lajeja aggressiivisempia pesän ulkopuolisia tunkeutujia kohtaan. Parempi pesätovereiden tunnistuskyky voisi näin aiheuttaa myös tunnistukseen liittyvien geenien voimakkaampaa ilmentymistä näillä lajeilla. Voi toki myös olla, että sukulaisrakenteisten ja superkoloniaalisten lajien tarpeet pesätovereiden tunnistukseen ovat erilaiset. Sukulaisrakenteisilla yhteiskunnilla tunnistustarve saattaisi olla jo yhteiskunnan olemuksen vuoksi superkoloniaalisia voimakkaampaa. Superkoloniaalisten lajien yksilöt eivät ehkä kohtaa tunkeutujia laajan reviirinsä ja pesärakenteensa vuoksi yhtä useasti, kuin sukulaisrakenteisten yhteiskuntien lajit. Tälle ajatukselle vastakkaisena hypoteesina puolestaan voisi olettaa juuri polygynisten lajien kuningatarten olevan matalasti polygynisiä tai monogynisiä lajeja aktiivisempia tunnistamaan sekä ilmentämään tunnistukseen liittyviä genejä, koska superkolonioissa niiden välillä on enemmän kilpailua, kun sukulaisrakenteisten yhteiskuntien kuningattarilla.

Työssäni selvitän myös, eroaako kunkin tutkimuslajin työläisten ja kuningatarten geenien ilmentyminen toisistaan. Hypoteesini on, että tunnistukseen liittyvien geenien ilmentyminen on voimakkaampaa työläisillä kuin kuningattarilla. Muurahaisyhteiskunnassa kuningattaren tehtävä on lisääntymien ja kaiken muun työn yhteiskunnassa hoitavat työläiset. Tämän vuoksi on mielestäni loogista olettaa, että työläisten haju- ja makuaistin on oltava kuningatarten aisteja tehokkaampi, riippumatta työläisen roolista yhteiskunnassa. Sillä niin jälkeläisten hoito, ravinnonhankinta kuin pesänpuolustuskin vaativat hyvin kehittyntä aistinjärjestelmää monimutkaisessa muurahaisyhteiskunnassa.



## 2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 2.1. Tutkimuslajit

Tutkimuksen suomumuurahaislajit kuuluvat *Formica*-suvun kolmeen eri alaryhmään. *Coptoformica*-alaryhmän lajeja ovat karvaloviniska (*F. exsecta*) ja kaljuloviniska (*F. pressilabris*), *Serviformica*-alaryhmään kuuluvat mustamuurahainen (*F. fusca*) ja samettimuurahainen (*F. cinerea*) ja kolmanteen eli kekomuurahaisten (*Formica s. srt.*) alaryhmään kuuluvat niittymuurahainen (*F. pratensis*), kantomuurahainen (*F. truncorum*) ja tupsukekomuurahainen (*F. aquilonia*) (Collingwood 1979, Czechowski ym. 2002, Seifert 2000). Osa lajeista (karvaloviniska, niittymuurahainen ja mustamuurahainen) on populaatiorakenteeltaan tyypillisesti sukulaistrakenteisia ja loput (kantomuurahainen, kaljuloviniska, samettimuurahainen ja tupsukekomuurahainen) muodostavat usein superkolonioita. Lajien polygynian aste tutkimuspopulaatioissani kasvaa edellä mainitussa järjestyksessä ollen matalinta loviniskamuurahaisella ja korkeinta tupsukekomuurahaisella (Collingwood 1979, Czechowski ym. 2002, Helanterä ym. 2009, Seifert 2000, Sundström ym. 2005).

Tutkimustani varten kerätyt karvaloviniska- ja niittymuurahaisyhteiskunnat olivat monogynisiä (Helanterä ym. 2016, Sundström ym. 2003) ja mustamuurahaisyhteiskunnista osa oli monogynisiä, osa heikosti polygynisiä (Chernenko ym. 2012). Muiden kerättyjen lajien yhteiskunnat olivat superkoloniaalisia (Hakala ym. 2020, Schultner ym. 2014, Schultner ym. 2016). Käytän tässä työssä jatkossa tutkimuspopulaatioiden yhteiskuntien tyypilliseen kuningatarmäärään (taulukko 1) perustuvaa järjestystä lajiesittelyissä sekä kaikissa taulukoissa ja kuvissa.

Karvaloviniska on erittäin yleinen laji koko Fennoskandiassa. Se on aggressiivisesti käyttäytyvä lehtikarikkeesta kohtuullisen pieniä kekopesiä rakentava avointen metsämaiden, nummien ja laidunmaiden laji. Lajilla tavataan kahta sosiaalista muotoa, monogynistä ja polygynistä. Karvaloviniskat suhtautuvat vieraisiin reviirilleen tunkeutujiin aggressiivisesti, mutta superkoloniaalisissa yhteiskunnissa viereisten pesienyksiöihin suhtautuminen on suopeaa. Tämä viittaisi siihen, että niillä on kyky tunnistaa mitkä yksilöt ovat osa samaa superkoloniaa ja mitkä tulevat kokonaan toisesta yhteiskunnasta (Collingwood 1979, Czechowski ym. 2002, Seifert 2000, Sundström ym. 2003).

Niittymuurahainen on paikallisesti yleinen laji, jota tavataan niin vuoristoisilla laidunmailla kuin alavien maastojen metsän rajoilla, pensaikoissa ja kanervikoissa. Lajin yksittäiset matalat kekopesät muodostavat eristyneitä yhteiskuntia. Pesät ovat tavallisesti muiden kekomuurahaislajien pesiä pienempiä ja pesämateriaali karkeampaa. Niittymuurahaisen yhteiskunnissa on tavallisesti vain yksi tai hyvin harvoja kuningattaria (Collingwood 1979, Czechowski ym. 2002, Helanterä ym. 2016).

Mustamuurahainen esiintyy yleisenä koko eteläisessä Fennoskandiassa ja sitä tavataan paikallisesti koko paleoarktisella alueella. Mustamuurahainen pesii yleensä pientareilla, avohakkuilla ja

muilla avoimilla alueilla ja rakentaa pesänsä tavallisesti kivien alle tai kantoihin (Collingwood 1979, Czechowski ym. 2002, Seifert 2000). Laji on pioneerilaji, jota tavataan tyypillisesti hakkuualueilla sukcession alkuvaiheessa (5 - 20 vuotta hakkuusta), mutta puuston sulkeuduttua sen yhteiskunnat vähenevät dominoivampien lajien tieltä (Punntila ym. 1991, Savolainen & Vepsäläinen 1988). Lajin yhteiskunnat ovat yleensä melko pieniä ja koostuvat usein noin 500 - 2000 työläisestä ja yhdestä tai muutamista kuningattarista (Czechowski ym. 2002, Savolainen & Vepsäläinen 1988). Mustamuurahainen on laji, jota muut lajit orjuuttavat melko yleisesti. Lajin pesätovereiden tunnistuksenkyvyn tiedetään olevan hyvin tarkka (Chernenko ym. 2012, Hannonen & Sundström 2003, Helanterä & Sundström 2007).

Kaljuloviniska esiintyy Suomessa paikallisesti ja rakentaa pesänsä ruhosta ja karikkeesta kuiville laidunmaille, pientareille tai avoimen metsämaan penkereille (Collingwood 1979, Seifert 2000). Yksittäinen pesä voi olla läpimitaltaan jopa metrin. Yhteiskunnan perustaminen tapahtuu kaljuloviniskalla usein sosiaalisen parasitismien kautta, jolloin laji loisii *Serviformica*-lajien pesiä (Czechowski 2002). Myös sekundaarinen polygynia on lajille tyypillistä. Tällöin tytärkuningattaret jäävät alun perin monogyniseen pesäänsä lisääntymään. Polygyninen kaljuloviniska muodostaa tyypillisesti superkolonioita (Collingwood 1979, Czechowski ym. 2002, Hakala ym. 2020, Schultner ym. 2014, Seifert 2000).

Samettimuurahaista esiintyy Suomessa koko rannikkoalueella. Se rakentaa pesänsä useimmiten dyynihiekkaan, mutta toisinaan se pesii myös karkeaan moreenimaahan. Laji on aggressiivinen ja hankkii ravintonsa saalistamalla. Samettimuurahaispesän voi perustaa yksi kuningatar, mutta alueilla, joilla laji on runsaslukuinen, yhteiskunnat ovat yleisesti polygynisiä ja muodostavat superkolonioita (Collingwood 1979, Czechowski ym. 2002).

Kantomuurahaista tavataan paikallisesti Fennoskandiassa. Laji elää laajalle levinneinä yhteiskuntina kivisillä penkereillä, kallioilla ja metsänrajojen pehmeissä puun kannoissa. Laji kasaa toisinaan pesäkseen löyhän kummun neulas- tai lehtikarikkeesta tai rakentaa pieniä kekopesiä. Kantomuurahainen suosii aurinkoisia paikkoja ja on myös melko tavallinen laji rannikkomeren saarilla. Laji on aggressiivinen ja puolustaa pesäänsä suihkuttamalla muurahaishappoa tunkeutujan päälle. Kantomuurahaisella tavataan sekä useiden kymmenien tuhansien yksilöiden polygynisiä superkolonioita, että pienempiä monogynisiä yhteiskuntia. Laji perustaa uusia yhteiskuntia joko jakamalla pesiä tai loisimalla toisten lajien kuten mustamuurahaisen yhteiskuntia (Collingwood 1979, Czechowski ym. 2002, Schultner ym. 2014).

Tupsukekomuurahainen on kiistämättä koko Fennoskandian yleisin *Formica*-suvun laji, joka rakentaa pesänsä tyypillisesti havupuuvaltaisiin metsiin. Tupsukekomuurahainen on vahvasti polygyninen ja muodostaa usein monien yhteiskuntien superkolonioita. Yksittäisten pesien olemassaolo on hyvin harvinaista. Tupsukekomuurahainen on yksi vähiten aggressiivisista kekomuurahaislajeista. Se rakentaa metsiin näkyviä polkuja vierekkäisten pesien ja ravinnonlähteiden välille, eikä lähekkäisten pesien yksilöiden ole havaittu käyttäytyvän lainkaan aggressiivisesti toisiaan kohtaan (Collingwood 1979, Czechowski ym. 2002, Schultner ym. 2016).

## 2.2. Näytteiden keruu

Tutkimuksen näytteet kerättiin Lounais-Suomesta, Hangosta, Tvärminnen eläintieteellisen aseman lähiympäristöstä sekä Hangon saaristosta kevään 2011 (loviniskamuurahainen, mustamuurahainen, kantomuurahainen, irveloviniska, tupsukekomuurahainen ja samettimuurahainen) ja 2012 (niittymuurahainen) aikana. Aikuiset kuningattaret ja työläiset kerättiin heti lumen sulamisen jälkeen, kun muurahaiset virkosivat talvihorroksestaan, mutta kuningattaret eivät vielä olleet aloittaneet munintaa. Työläisiä kerättiin ainoastaan pesän sisältä, jotta voitiin minimoida työläisten välinen vaihtelu. Pesän sisältä kerättyjen työläisten voitiin näin olettaa olevan kerätyn yhteiskunnan sisätyöläisiä. Jokaisen lajin kaikki näytteet kerättiin yhden päivän aikana niin, että kutakin lajia kerättiin aina vain yhdestä sijainnista. Näytteiden keruu tapahtui kaikkien lajien osalta mahdollisimman vakioiduin olosuhtein, jotta kaikki näytteet olisivat mahdollisimman vertailukelpoisia keskenään.

Jokaiselta lajilta kerättiin näytteitä yhteensä viidestä yhteiskunnasta. Kaikista yhteiskunnista kerättiin sekä työläisiä että kuningattaria. Työläisiä otettiin tutkimukseen mukaan mahdollisuuksien mukaan vähintään viisi yksilöä ja enimmillään 12 yksilöä. Kuningatarten näytemäärä vaihteli sen mukaan, oliko kyseessä sukulaisrakenteinen laji vai superkoloniaalinen laji. Kaikki tutkimuksessa mukana olevat karvaloviniska- ja niittymuurahaisyhteiskunnat olivat monogynisiä (Helanterä ym. 2016, Sundström ym. 2003), joten näiltä lajeilta kuningattaria tutkimukseen otettiin vain yksi kustakin yhteiskunnasta. Mustamuurahaiskolonioista osa oli monogynisiä osa matalasti polygynisiä (Chernenko ym. 2012), joten näiden yhteiskuntien kuningatarten näytemäärä vaihteli yhdestä neljään. Superkoloniaalisilta lajeilta tutkimukseen otettiin mukaan korkeintaan viisi kuningatarta kustakin pesästä (Hakala ym. 2020, Schultner ym. 2014, Schultner ym. 2016). Näytemäärät lajeittain ja kasteittain on kirjattu taulukkoon 1. Kaikki näytteet kerättiin koeputkiin ja pakastettiin -80°C välittömästi laboratorioon tuonnin jälkeen, jotta RNA ei päässyt hajoamaan.

**Taulukko 1.** Tutkimuslajit sekä kerättyjen yhteiskuntien (kpl) ja yksilöiden määrät (kpl) kasteittain.

Laji	Kuningattaret	Työläiset	Yhteiskunnat
Karvaloviniska	5	41	5
Niittymuurahainen	5	51	5
Mustamuurahainen	9	45	5
Kaljuliniska	13	49	5
Samettimuurahainen	18	52	5
Kantomuurahainen	22	41	5
Tupsukekomuurahainen	25	56	5

### 2.3. Tunnistusgeenien ilmentymisen tutkiminen kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla

Tein suomumuuraahaisten tunnistusjärjestelmään liittyvien geenien ilmentymiseen (ekspressioon) liittyvät mittaukset Helsingin yliopiston Molekyyliekologian ja systematiikan laboratoriossa (MES). Kunkin yksilön kokonais-RNA:n -eristyksen jälkeen käytin kaksivaiheista kvantitatiivista polymeraasiketjureaktio -menetelmää (reverse transcriptase -quantitative polymerase chain reaction, jatkossa RT-qPCR) komplementaarisen DNA-kirjaston luomiseksi ja suhteellisen geenien ilmentymisen mittaamiseksi.

#### 2.3.1. RNA-eristys

Eristin pakastettujen näytteiden kokonais-RNA:n käyttäen Trizol-menetelmää (TRIzol, Bioline). Tein eristykset kokonaisista muurahaisista kemikaalikitin valmistajan ohjeen mukaan. Jauhoin jäädytetyt muurahaisnäytteet RNA:n vapauttamiseksi soluista metallihelmien avulla eppendorffputkissa 1000 µl:ssa Trizurea yhden minuutin ajan. Murskaamisen jälkeen inkuboin näytteitä 5 minuutin ajan huoneenlämmössä. Lisäsin näytteisiin 200 µl kloroformia, sekoitin ja inkuboin huoneenlämmössä 3 minuuttia. Sekoitin näytteet uudelleen ja sentrifugoin 15 minuutin ajan 12 000 g, kylmähuoneessa. Sentrifugoinnin seurauksena näyte jakaantui kahteen faasiin: alempaan orgaaniseen faasiin ja ylempään vesifaasiin, johon näytteiden RNA eluotui. Pipetoin ylemmän faasin uuteen eppendorffputkeen, johon olin aiemmin lisännyt 500 µl isopropanolia.

Inkuboin näytteitä 10 minuuttia huoneenlämmössä ja sentrifugoin 10 minuuttia 12 000 g, kylmähuoneessa. Poistin tarkasti kaiken supernatantin muodostuneen RNA-pelletin päältä ja lisäsin näytteisiin 1000 µl 75 % kylmää etanolia pelletin pesemiseksi. Sentrifugoin näytteitä 5 minuuttia 7600 g kylmähuoneessa, poistin etanoli-supernatantin ja kuivasin näytteitä 57 °C lämpöhauteessa 10 minuutin ajan korkit avoimina. Kun näytteet olivat täysin kuivia, lisäsin niihin 50 µl Milli-Q® vettä (ultrapuhdasta suodatettua ja deionisoitua vettä, tekstissä jatkossa MQ-vesi), sekoitin näytteet perusteellisesti ja sentrifugoin kevyesti, jotta näyte painui eppendorffputken pohjalle. Lopuksi inkuboin näytteitä jäällä 30 minuuttia. Valmiit näytteet säilöin pakastimeen -80 °C:een.

### 2.3.2. cDNA-synteesi

Eristetyt RNA:t käsittelin genomisen DNA:n kontaminaatioiden poistamiseksi DNAasilla (DNase I, Fermentas) ja puhdistetulle RNA:lle suoritin cDNA synteesin (iScript cDNA Synthesis Kit, BioRad), jotta tätä cDNA:ta voitiin käyttää jatkossa RT-qPCR:n lähtöaineena (BioRad 2006).

cDNA-synteesi tarkoittaa komplementaarisen DNA-kirjaston luomista. DNA-kirjaston luomisessa käytin käänteistä polymeerasiketjureaktiota (RT-PCR), jotta sain tuotettua kokonais-RNA:sta yksijuosteisen komplementaarisen DNA:n (cDNA).

Ennen cDNA-kirjaston luomista määritin eristettyjen RNA-näytteiden pitoisuuden ja puhtauden spektrofotometrisesti aallonpituuksien A280 ja A260 suhteena NanoDrop -laitteella (Thermo Scientific). Saantoon perustuen laimensin näytteet MQ-vedellä niin, että jokaisen näytteen konsentraatio oli 500 ng RNA:ta /  $\mu\text{l}$  DNAasi-reaktiossa. DNAasi reaktiot tein 25  $\mu\text{l}$  reaktioina. Reaktioseos sisälsi puhdistettavan RNA:n lisäksi 1  $\mu\text{l}$  DNase I ja 1  $\mu\text{l}$  10 x reaktiopuskuria. Sentrifugoin pipetoidut reaktioseokset näytelevyjien pohjalle ja inkuboin reaktioseoksia 30 minuuttia 37 °C PCR-laitteessa. Sentrifugoin näytelevyt inkubaation jälkeen uudelleen, jotta koko seos painui jälleen levyn pohjalle. Lisäsin 1  $\mu\text{l}$  EDTA:ta ja inkuboin seoksia uudelleen 10 minuuttia 65 °C.

cDNA-synteesireaktiot tein 20  $\mu\text{l}$  reaktioseoksina. Reaktioseos sisälsi 11  $\mu\text{l}$  juuri puhdistettua genomisesta DNA:sta vapaata RNA:ta, 1  $\mu\text{l}$  Random H alukkeita, 4  $\mu\text{l}$  5 x puskuria, 1  $\mu\text{l}$  RNAasi inhibiittoria, 2  $\mu\text{l}$  dNTP ja 1  $\mu\text{l}$  käänteiskopioijaentsyymiä. RT-PCR-ajo piti sisällään seuraavat syklit: 5 minuuttia 25 °C, 60 minuuttia 42 °C, 60 minuuttia 45 °C, 60 minuuttia 49 °C, 5 minuuttia 70 °C. Valmiit cDNA-näytteet laimensin 1/10 ja säilöin näytteet pakastimeen -20 °C.

### 2.3.3. Geenien ilmentymisen suhteellinen kvantifiointi

Käytin työssäni seitsemän muurahaislajin tunnistusgeenien ilmentymisen tutkimiseen kvantitatiivista reaaliaikaista polymeerasiketjureaktiota eli RT-qPCR-menetelmää. Menetelmä perustuu fluoresoivan reaktioliuoksen käyttöön (qPCR SYBR Green supermix, BioRad) polymeerasiketjureaktiossa (BioRad 2006). Tässä reaktiossa kaksijuosteinen DNA denaturoidaan ja syntyneisiin yksijuosteisiin molekyyliin syntetisoidaan komplementaarinen vastinnauha, johon fluoresoiva leima kiinnittyy. Alukkeina käytetään kohdegeenien tunnettuihin sekvensseihin suunniteltuja alukkeita (sekvenssit geenipankista). Alukkeiden väliin jäävää jaksoa kopioidaan qPCR:n kussakin reaktiosykliissä niin, että jokainen sykli johtaa tuotteen määrän kaksinkertaistumiseen. qPCR laitteen (BioRad CFX 384 qPCR) ja fluoresoivan reaktioseoksen käyttö mahdollistaa tuotteen synnyn seuraamisen reaaliaikaisesti. Kun reaktion lähtöaineena käytetään aina

vakiomäärää cDNA:ta, voidaan kunkin yksilön geenien ilmentymistä mitata tuotteen määrällä (Finzymes, 2009).

Fluoresenssin määrää mittaamalla voidaan selvittää geenien ilmentymisen voimakkuutta, sillä fluoresoiva signaali on verrannollinen kussakin sykliä tuotetun DNA:n määrään (BioRad 2006). Geenien ilmentyminen määritellään C(t)-arvolla (threshold cycle = kynnyssykli). Tällä tarkoitetaan sykliä, jonka aikana DNA:n tuottama fluoresoiva signaali ylittää taustan signaalin tasolle. Mitä matalampi C(t)-arvo on, sitä voimakkaampaa on tutkittavan geenin ilmentyminen.

qPCR-menetelmän tuloksia voidaan analysoida joko absoluuttisesti tai suhteellisesti. Absoluuttinen kvantifiointi tapahtuu vertaamalla saatua tulosta standardisuoran arvoihin. Suhteellisessa kvantifiointissa geenien ilmentymisen vaihtelua tutkitaan vertaamalla saatua arvoa sisäiseen kontrolliin. Tutkimuksessani käytin vertailevan kvantifiointin menetelmää, jossa vertasin kohdegeenin ilmentymistä (C(t)-arvoa) kontrolligeenien ilmentymiseen (C(t)-arvoon). Kun kontrolligeenien C(t)-arvo vähennetään kohdegeenin C(t)-arvosta saadaan tutkimusgeenin suhteellista ilmentymistä kuvaava  $\Delta C(t)$ -arvo. Vertailevan kvantifiointin menetelmää kutsutaan myös vertailevaksi  $\Delta C(t)$ -menetelmäksi, tai Pfaffl-menetelmäksi (Pfaffl 2001).

#### *2.3.4. Kontrolligeenit*

Jotta tulokset olisivat luotettavia, on kunkin kohdegeenin ilmentymistasot normalisoitava, vertaamalla näiden geenien ilmentymistä kontrolligeenien ilmentymiseen. Kontrolligeeneinä käytetään yleisesti niin sanottuja ylläpitogeenejä, joiden ilmentyminen on aina kaikissa olosuhteissa vakaata. Vakaalla ilmentymisellä tarkoitetaan geenin ilmentymistä kaikissa kudoksissa ja kaikissa yksilön elämänkierron vaiheissa aina samanlaisena. Tällaisia geenejä ovat geenit, jotka toimivat solujen perusaineenvaihdunnassa. Käytin tutkimuksessani kontrolligeeneinä kahta ribosomaalista proteiinia RpS9:ää ja Rp48:ää sekä glyseraldehydi-fosfaatti-dehydrogenaasia (GAPDH). Ribosomaaliset proteiinit toimivat translaatiassa muodostaen pienemmän (RpS9) ja suuremman (Rp48) ribosomaalisen alayksikön. GAPDH toimii glykolyyssissä hajottaen glukoosia hiilivahditeiksi vapauttaen samalla energiaa solun käyttöön. Näiden geenien ilmentymisen on todettu aiemmissa tutkimuksissa olevan vakaata kaikissa tilanteissa (Corona ym. 2005, Nipitwattanaphon ym. 2013, Scharlaken ym. 2008, Wang ym. 2008) ja niitä on käytetty myös työni tutkimuslajeilla aiemmin (Morandin ym. 2014).

### 2.3.5. Kohdegeenien valinta ja etsintä geenipankista

Valitsin tutkimukseen geenejä, jotka vastaavat tuoksujen ja feromonien kuljetuksesta ja liukoiseksi tekemisestä hyönteisten hemolymfassa ( d’Ettorre ja Lenoir 2010, González ym. 2009, Leal ym. 2005, Ozaki ym. 2005, Vosshall & Stocker 2007, Xu ym. 2009). Otin mukaan tutkimukseen kemosensoirproteiinia (chemosensory protein, CSP), hajuja sitovaa proteiinia (odorant binding protein, OBP) ja makuaistinreseptoria (gustatory reseptor trehalose, GRT) koodaavat geenit, joiden sekvenssit etsin karvaloviniskan transkriptomista (sekvensoitua lähetti-RNA:ta) (Dhaygude ym. 2017) tekemällä blast-hakuja transkriptomin ja geenipankissa julkaistujen tunnettujen tunnistusgeenien sekvenssien välillä (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool).

### 2.3.6. Alukkeiden suunnittelu

Alukkeet suunnittelin geenien eksonien ja intronien raja-alueille, jotta genomisen DNA:n monistuminen PCR-reaktiossa olisi mahdollisimman vähäistä. Alukkeiden suunnitteluun käytin Primer3-ohjelmistoa (Untergasser ym. 2007). Kontrolligeenien alukkeet suunnittelin yhteistyössä Claire Morandin kanssa, sillä kyseisiä alukkeita oli määrä käyttää myös hänen tutkimuksessaan (Morandin ym. 2014).

Alukkeiden tehokkuudet qPCR-reaktiossa (E) laskin laimennussarjan standardisuoran avulla. Standardisuoran määrittämiseen käytin laimennoksia 1, 1:2, 1:4, 1:8 1:16 ja 1:32 ja laskennan tein BioRad CFX manager v. 1.6 -ohjelmistossa yhtälön  $E = 10^{-1/\text{kulmakerroin}}$  mukaisesti. Kontrolligeenien ja kohdegeenien alukkeiden sekvenssit ja alukkeiden optimaaliset kiinnittymislämpötilat (T<sub>m</sub>) qPCR-ajoissa on kirjattu taulukkoon 2. ja alukkeiden tehokkuudet löytyvät taulukosta 3.

**Taulukko 2.** Tutkimuksessa käytettyjen kontrolligeenien ja kohdegeenien alukkeiden sekvenssit ja optimaaliset kiinnittymislämpötilat (T<sub>m</sub>).

Geeni	Forward-alue	Reverse-alue	Optimaalinen kiinnittymislämpötila °C (T <sub>m</sub> )
<i>RpS9</i>	CCAACGGCATATTCGAGTAC	CAGTTTAATCCTCCTCTTCTTC	58
<i>Rp48</i>	CAAGGGCCAATACTTGATGC	TTAAGACTTCAAGTTCCTTCAC	60
<i>GAPDH</i>	ACGGTTTTCTGAGTGGCTGT	ATCTGCTCATTGGAAGGC	59
<i>CSP</i>	CAAGCAGCATGCCGCTGA	TCGTTCCGGTCGTAGCATCAC	60
<i>OBP</i>	AACAAATGTGCCAAGCAAGACG	TCCACGAGCGAGTTGTTTTCT	60
<i>GRT</i>	CGATGCGGAATTGTCAAGAT	CAGCACCAGCAGACAGAACAC	58

Varmistuakseni monistamieni geenituotteiden oikeudesta tein tietokoneella sekvenssivertailun, sekä kontrolligeenien että tutkimusgeenien alukkeiden sekvensseille, ja geenisekvensseille, joita näiden alukkeiden oli määrä monistaa. Alukkeet oli sekvensoitu alukevalmistajan toimesta ennen niiden toimitusta. Kontrolligeenit oli sekvensoitu tutkimuksessa, joissa niitä oli käytetty aiemmin (Morandin ym. 2014). Kohdegeenejä, joita monistin RT-qPCR:llä työssäni ei sekvensoitu ja siksi sekvenssivertailu, jonka tein niille perustui ainoastaan alkuperäisiin geenipankista otettuihin geenisekvensseihin, joiden pohjalta suunnittelin alukkeet. Vertasin näitä geenipankin sekvenssin osia julkaistuun karvaloviniskan nukleotidisekvenssiin tietokoneella blast-haulla (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool).

Sekvenssivertailussa kaikki suunnitellut alukkeet kiinnittyivät spesifisesti ainoastaan siihen kohtaan karvaloviniskan sekvenssiä, mihin olin ne suunnitellut. Myös geenituotteet olivat 100 % yhdenmukaisia sen kanssa, mitä geeniä oli tarkoitus monistaa, eivätkä geenituotteiden sekvenssit täsmänneet mihinkään muuhun geenipankista löytyvään sekvenssiin. Tällä tavalla varmistin, että RT-qPCR:n monistamat tuotteet olivat täsmälleen sitä mitä pitikin. Analysoin vielä jokaisen kohdegeenin RT-qPCR-tuotteet kaikilta lajeilta 1,5 % agarosigeelillä. Kaikkien kohdegeenien monistaminen oli onnistunut kaikilla tutkimuslajeillani ja kohdegeenien sekvenssit olivat geeliajon perusteella oikean pituisia (Kukin geeni monistui kaikilla lajeilla yhtä pitkänä.), eli vastasivat monistettavaksi suunniteltujen sekvenssien pituuksia.

**Taulukko 3.** Alukkeiden tehokkuudet (%) kullekin tutkimuksen *Formica*- lajille.

Laji	OBP	CSP	GRT	RpS9	Rp48	GAPDH
Karvaloviniska	100	95	104	100	86	95
Niittymuurahainen	100	95	100	94	100	106
Mustamuurahainen	98	97	97	95	104	106
Kaljuliniska	101	100	98	94	104	97
Samettimuurahainen	101	88	112	87	93	106
Kantomuurahainen	101	109	100	101	110	110
Tupsukekomuurahainen	92	81	100	97	100	121

### 2.3.7. qPCR ajo-olosuhteet

RT-qPCR-reaktiot ajoin BioRad CFX 384 qPCR -laitteella. Fluoresoivan leiman aikaansaamiseksi käytin BioRad iQ qPCR SYBR Green Master Mix:iä. Kuhunkin reaktioon pipetoin 1 µl cDNA, 5 µl SYBR-green mastermix, 1 µl forward-aluketta, 1 µl reverse-aluketta (1/20 laimennos alkuperäisestä alukeliuksesta, alukkeiden



valmistaja Oligomer), 2 µl MQ-vettä. qPCR-laitteen ohjelma oli seuraavanlainen: alkudenaturaatio 95 °C 3 minuuttia, 45 sykliä, joissa: denaturaatio 95 °C 10 sekuntia, alukkeiden kiinnittymisvaihe alukekohtaisessa kiinnittymislämpötilassa 10 sekuntia, pidennysreaktio 72 °C 30 sekuntia, ja lopun varmistusreaktio 72 °C 3 minuuttia.

qPCR-reaktiot tein jokaisesta näytteestä kolmena rinnakkaisena mittauksena, jotta pystyin varmistumaan mittauksen tarkkuudesta ja RT-PCR-reaktion toistettavuudesta. Tulosten analysointiin otin mukaan ne tulokset, joiden C(t)-arvot poikkesivat toisistaan korkeintaan 1,1 yksikön verran. Otin analyysihin mukaan tulokset, joista sain tällä valintamenettelyllä vähintään kaksi rinnakkaista arvoa. Mikäli kaikki kolme mittaustulosta olivat sallitun vaihtelun sisällä, otin nämä kaikki arvot mukaan analyysihin. Tein näytteistä uudelleenmäärytyksiä, mikäli tulokset poikkesivat toisistaan liikaa. Suhteellisen geenien ilmentymisen laskennan tein Pfaffl -menetelmällä (Pfaffl 2001).

Tarkastelin mittauksista myös sulamiskäyrää, jotta pystyin varmistumaan, että reaktiossa syntyi vain yhtä haluttua tuotetta. Jokaiseen qPCR-ajoon otin mukaan myös negatiiviset kontrollit, joiden avulla varmistin, ettei näytteissä ollut kontaminaatiota, syntynyt alukkeiden yhteenliittymiä (primerdimer) tai ettei reaktioissa monistunut genomisen DNA:n jäänteitä. Negatiivisina kontrolleina käytin kontrollia, jossa ei ollut templaattia (sisälsi MQ-vettä, mastermixiä, jossa oli alukkeita ja SYBR-Green -leimaa) ja kontrollia, johon en laittanut cDNA:ta ollenkaan (sisälsi tavallisen mastermixin lisäksi satunnaista DNA:ta käsiteltyä RNA-näytettä laimennettuna 1/10).

## 2.4. Tilastolliset analyysit

Tarkastelin geenien suhteellista ilmentymistä ensin piirtämällä (R-ohjelmistolla) kunkin tutkimusgeenin  $\Delta C(t)$ -arvojen avulla pylväsdiagrammit, joista näkyi kunkin lajin työläisten ja kuningatarten aineiston muuntelun määrä silmämääräisesti.

Aineiston normaalisuuden testaus osoitti, ettei aineisto sellaisenaan ollut täysin normaalisti jakautunut, vaan normaalisuuden saavuttamiseksi  $\Delta C(t)$ -arvoille piti tehdä potenssimuunnos (<sup>0,1</sup>). Normalisoidut  $\Delta C(t)$ -arvot analysoin R-ohjelmistolla (versio R i386 3.6.3 <https://cran.r-project.org/>) nlme-kirjaston lme-funktiolla (Pinheiro ym. 2017). Käytin lineaarista yhdistelmämallia (GLMM, general linear mixed model) tutkiakseni kastin vaikutusta tunnistusgeenien ilmenemiseen, sekä kohdegeenien korrelaatiota. Yhteiskunta oli mukana malleissa satunnaismuuttujana, koska saman yhteiskunnan yksilöiden mittaustulokset eivät ole toisistaan riippumattomia, ja näin mallit huomioivat myös yhteiskunnan vaikutuksen tuloksiin.

#### *2.4.1 Kuningatarten ja työläisten geenien ilmentymisen vertaaminen*

Tutkiakseni kuningatarten ja työläisten kastin vaikutusta kohdegeenien ilmenemiseen analysoin jokaisen kohdegeeni tulokset erikseen GLMM-mallin avulla. Asetin kohdegeenin normalisoidut  $\Delta C(t)$ -arvot malliin vastemuuttujaksi (response variable), kastin riippumattomaksi selittäväksi muuttujaksi (fixed explanatory variable) ja yhteiskunnan satunnaismuuttujaksi (random factor). Malli oli muotoa:  $\text{lme}(\Delta C(t)^{0.1} \sim \text{kasti}, \text{random} = \sim 1 \mid \text{yhteiskunta})$ .

#### *2.4.2 Kohdegeenien ilmentymisen välinen korrelaatio*

Koska suhteellisten ilmentymistasojen tarkastelun perusteella OBP ja CSP geeni näyttivät ilmentyvän hyvin samalla tavalla kaikilla tutkimuslajeilla, joilla tarkastelin näitä geenejä, vertasin näiden geenien korrelaatiota keskenään GGLM-mallin avulla. Myös tässä mallissa käytin normalisoituja  $\Delta C(t)$ -arvoja. Mallissa vastemuuttujina oli tuoksuja sitovaan proteiinia koodaavan geenien  $\Delta C(t)$ -arvot (OBP $\Delta C(t)$ ) ja selittävässä muuttujana kemosensoirproteiinia koodaavan geenin  $\Delta C(t)$ -arvot (CSP $\Delta C(t)$ ) kasti, sekä interaktio. Yhteiskunnan otin malliin mukaan satunnaismuuttujana, malli oli muotoa:  $\text{lme}(\Delta C(t)_{OBP}^{0.1} \sim \Delta C(t)_{CSP}^{0.1} * \text{kasti}, \text{random} = \sim 1 \mid \text{yhteiskunta})$ .

### 3. TULOKSET

Kaikki tutkimusgeenit ilmentyivät kaikilla tutkimuksen lajeilla ja molemmissa tutkituissa kasteissa. Sekvenssien yhteenliittymistä ei havaittu lainkaan qPCR-ajojen aikana ja sulamiskäyrät osoittivat, että jokaisessa reaktiossa monistui vain yhtä tuotetta. Tuotteiden koko oli agarosigeelijaon perusteella oikea. Geenien ilmentyminen vaihteli huomattavasti sekä geenien välillä että kunkin geenin sisällä (kuvat 1 – 3 ja taulukko 4). Lajikohtaiset erot geenien ilmentymisessä olivat huomattavia ja kaikkien geenien ilmentyminen oli työläisillä kuningattaria voimakkaampaa kaikilla lajeilla. Tutkimusgeeneistä voimakkaimmin ilmentyi OBP:a koodaava geeni (vertailugeenien avulla normalisoitujen Ct-arvojen ( $\Delta C(t)$ ) aritmeettinen keskiarvo ( $\bar{x}$ ) kaikilla tutkimusyksilöillä = 0.65, keskihajonta (s.d.) = 1.16, n = 426) ja vähäisintä oli GRT:a koodaavan geenin ilmentyminen ( $\bar{x}$  = 0.09, s.d. = 0.06, n = 421). CSP ilmentyminen oli näiden geenien ilmentymisen väliltä ( $\bar{x}$  = 0.11, s.d. = 0.21, n = 324).

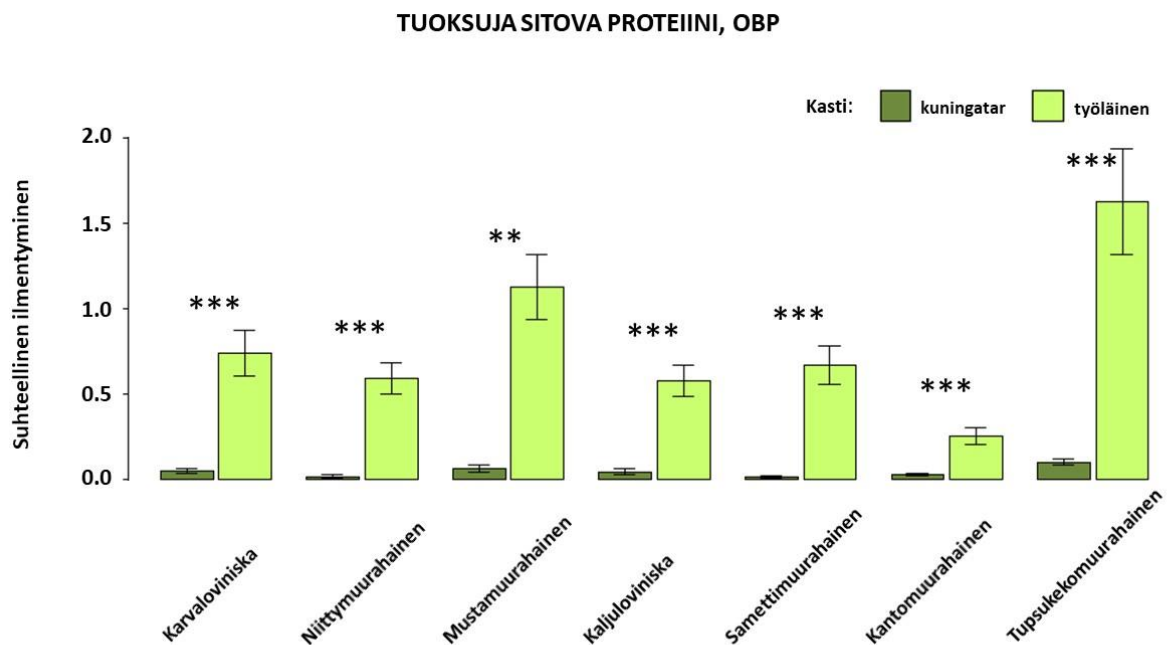
**Taulukko 4.** tutkimusgeenien  $\Delta C(t)$ -arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat ( $\bar{x} \pm sd$ ) sekä yksilömäärät (n) kaikilla tutkimuslajeilla kasteittain.

Laji	kasti	OBP	CSP	GRT
		$\bar{x} \pm s.d., n$	$\bar{x} \pm s.d., n$	$\bar{x} \pm s.d., n$
Karvaloviniska	kuningattaret	0.047 $\pm$ 0.032, n= 5	-	0.079 $\pm$ 0.044, n=5
	työläiset	0.740 $\pm$ 0.856, n=40	-	0.101 $\pm$ 0.055, n=39
Niittymuurahainen	kuningattaret	0.016 $\pm$ 0.018, n=5	-	0.051 $\pm$ 0.022, n=5
	työläiset	0.591 $\pm$ 0.653, n=51	-	0.101 $\pm$ 0.060, n=50
Mustamuurahainen	kuningattaret	0.063 $\pm$ 0.054, n=9	0.013 $\pm$ 0.008, n=9	0.045 $\pm$ 0.027, n=9
	työläiset	1.125 $\pm$ 1.250, n=43	0.231 $\pm$ 0.243, n=42	0.102 $\pm$ 0.076, n=44
Kaljuloviniska	kuningattaret	0.045 $\pm$ 0.067, n=13	0.005 $\pm$ 0.006, n=13	0.069 $\pm$ 0.054, n=13
	työläiset	0.576 $\pm$ 0.643, n=47	0.067 $\pm$ 0.072, n=49	0.112 $\pm$ 0.044, n=46
Samettimuurahainen	kuningattaret	0.014 $\pm$ 0.018, n=18	0.004 $\pm$ 0.004, n=17	0.034 $\pm$ 0.032, n=18
	työläiset	0.668 $\pm$ 0.791, n=52	0.116 $\pm$ 0.113, n=52	0.076 $\pm$ 0.043, n=51
Kantomuurahainen	kuningattaret	0.026 $\pm$ 0.030, n=22	0.001 $\pm$ 0.001, n=21	0.036 $\pm$ 0.020, n=21
	työläiset	0.252 $\pm$ 0.321, n=40	0.019 $\pm$ 0.024, n=41	0.092 $\pm$ 0.053, n=40
Tupsukekomuurahainen	kuningattaret	0.101 $\pm$ 0.082, n=25	0.018 $\pm$ 0.024, n=25	0.072 $\pm$ 0.038, n=25
	työläiset	1.626 $\pm$ 2.302, n=56	0.295 $\pm$ 0.371, n=55	0.102 $\pm$ 0.068, n=55

### 3.1. Tuoksuja sitova proteiini, OBP

OBP:n ilmentyminen oli työläisissä ( $\bar{x} = 0.82$ , s.d. = 1.26, n = 329) yli kymmenkertaista kuningattariin ( $\bar{x} = 0.05$ , s.d. = 0.06, n = 97) nähden (kuva 1). OBP ilmentyi kaikilla seitsemällä tutkimuslajilla työläisillä kuningattaria voimakkaammin (taulukko 4) ja kastien välinen ero ilmentymisessä oli kaikilla lajeilla merkitsevä (taulukko 5).

Voimakkainta OBP:n ilmentyminen oli tupsukekomuurahais- ( $\bar{x} = 1.626$ , s.d. = 2.302, df = 56), mustamuurahais- ( $\bar{x} = 1.125$ , s.d. = 1.250, df = 43) ja karvaloviniskatyöläisillä ( $\bar{x} = 0.740$ , s.d. = 0.856, df = 40). Työläisistä matalinta ilmentyminen oli kantomuurahaisella ( $\bar{x} = 0.252$ , s.d. = 0.321, df = 40). Kuningattarilla OBP:n ilmentyminen oli voimakkainta tupsukekomuurahaisella ( $\bar{x} = 0.101$ , s.d. = 0.082, df = 25) ja mustamuurahaisella ( $\bar{x} = 0.063$ , s.d. = 0.054, df = 9) ja matalinta samettimuurahaisella ( $\bar{x} = 0.014$ , s.d. = 0.018, df = 18) ja niittymuurahaisella ( $\bar{x} = 0.016$ , s.d. = 0.018, df = 5).



**Kuva 1.** Tuoksuja sitovan proteiinin (OBP) suhteellinen ilmentyminen suomuurahaisilla (n=426). Kukin pylväsdiagrammi kuvaa vertailugeenien avulla normalisoitua kohdegeenin suhteellista ilmentymistä  $\Delta C(t)$ -arvojen keskiarvona kullakin lajilla kasteittain. Pylväsdiagrammissa janat kuvaavat keskiarvon keskivirhettä. Kunkin lajin kastien välisen ilmentymisen eron merkitsevyys on merkitty kuvaan tähdin (\*\*\*) p < 0.001, \*\* p < 0.01 ja \* p < 0.05).

**Taulukko 5.** OBP-geenin ilmentymisen erot työläisten ja kuningatarten kasteilla seitsemällä suomumuurahaislajilla. Taulukossa on esitetty lineaarisen yhdistelmämallin ( $\text{lme}(\Delta C(t)^{0.1} \sim \text{kasti, random} = \sim 1 \mid \text{yhteiskunta})$ ) tulokset.

	Karvaloviniska	Niittymuurahainen	Mustamuurahainen	Kalju-loviniska	Samettimuurahainen	Kantomuurahainen	Tupsukekomuurahainen
<b>OBP tuoksua sitova proteiini</b>							
Estimaatin arvo	0.175	0.255	0.186	0.205	0.280	0.141	0.193
Keskivirhe	0.049	0.051	0.059	0.037	0.037	0.028	0.031
df	45	56	52	60	70	62	81
t-arvo	3.58	5.01	3.17	5.50	7.58	5.10	6.28
p-arvo	0.0009	<0.0001	0.0027	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

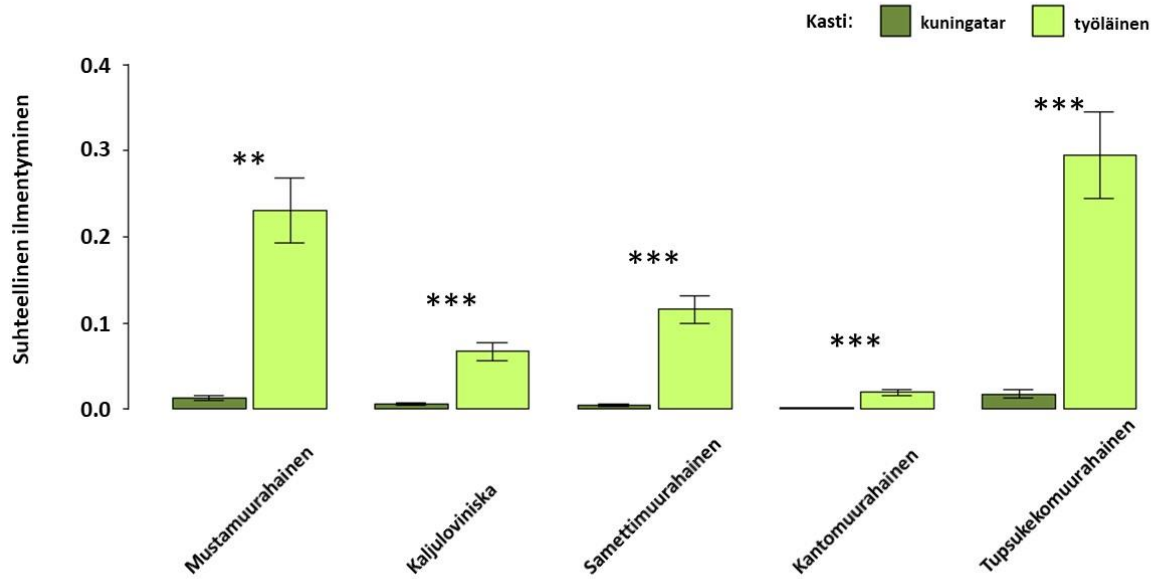
### 3.2. Kemosensoiriproteiini, CSP

CSP:n tuloksista pystyin analysoimaan vain viiden lajin mittauksia, sillä karvaloviniskan ja niittymuurahaisen tulokset tuhoutuivat, kun tallennusvälineeni, jolla ne olivat, korruptoitui. Tässä vaiheessa minulla ei valitettavasti ollut enää mahdollisuutta toistaa kyseisiä mittauksia.

CSP:n ilmentyminen oli työläisillä ( $\bar{x} = 0.015$ , s.d. = 0.24, n = 239) lähes 20-kertaista kuningattariin nähden (taulukko 4 ja kuva 2). Kuningatarten CSP geenin ilmentyminen oli hyvin vähäistä, ollen lähellä nollaa ( $\bar{x} = 0.008$ , s.d. = 0.02, n = 85).

CSP:n ilmentyminen erosi kastien välillä kaikilla viidellä lajilla (taulukko 6). Voimakkainta CSP:n ilmentyminen oli tupsukekomuurahais- ( $\bar{x} = 0.295$ , s.d. = 0.371, df = 55) ja mustamuurahaistyöläisillä ( $\bar{x} = 0.231$ , s.d. = 0.243, df = 42). Työläisistä matalinta ilmentyminen oli kantomuurahaisella ( $\bar{x} = 0.019$ , s.d. = 0.024, df = 41). Kuningattarilla CSP:n ilmentyminen oli voimakkainta tupsukekomuurahaisella ( $\bar{x} = 0.018$ , s.d. = 0.024, df = 25) ja mustamuurahaisella ( $\bar{x} = 0.013$ , s.d. = 0.008, df = 9) ja matalinta kantomuurahaisella ( $\bar{x} = 0.001$ , s.d. = 0.001, df = 21).

## KEMOSENSORIPROTEIINI, CSP



**Kuva 2.** Kemosensoriproteiinin (CSP) suhteellinen ilmentyminen suomumuurahaisilla (n=324). Kukin pylväsdiagrammi kuvaa vertailugeenien avulla normalisoitua kohdegeenin suhteellista ilmentymistä  $\Delta C(t)$ -arvojen keskiarvona kullakin lajilla kasteittain. Pylväsdiagrammissa janat kuvaavat keskiarvon keskivirhettä. Kunkin lajin kastien välisen ilmentymisen eron merkitsevyys on merkitty kuvaan tähdin (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  ja \*  $p < 0.05$ ).

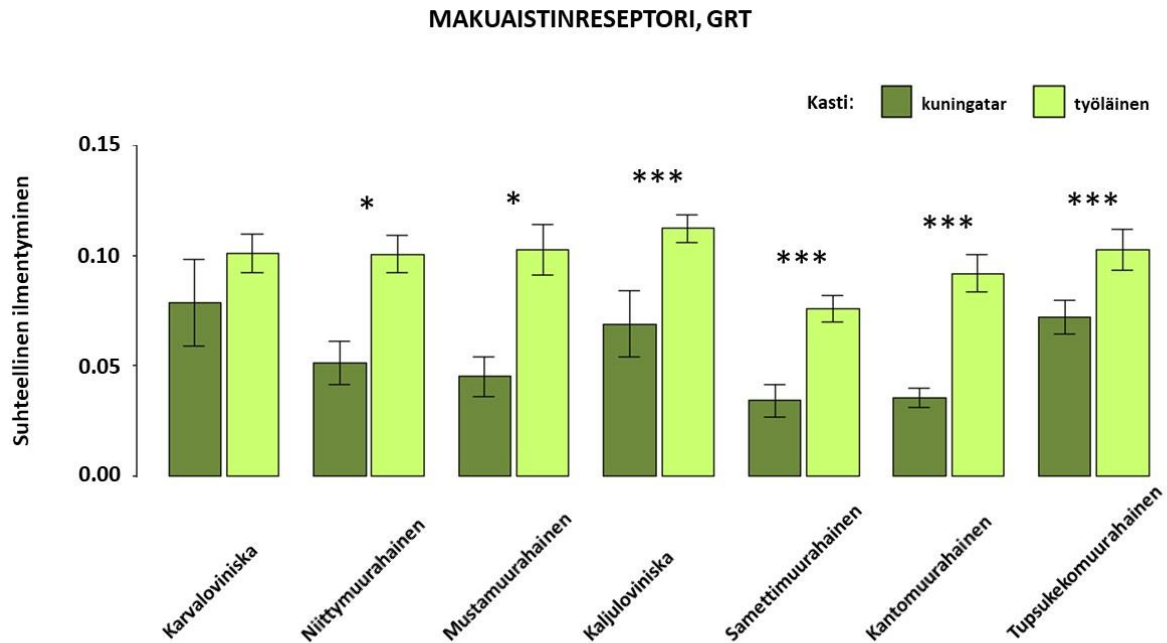
**Taulukko 6.** CSP-geenin ilmentymisen erot työläisten ja kuningatarten kasteilla seitsemällä suomumuurahaislajilla. Taulukossa on esitetty lineaarisen yhdistelmämallin ( $\text{lme}(\Delta C(t)^{0.1} \sim \text{kasti}, \text{random} = \sim 1 \mid \text{yhteiskunta})$ ) tulokset.

	Musta- muurahainen	Kaljuliniska	Sametti- muurahainen	Kanto- muurahainen	Tupsukeko- muurahainen
<b>CSP kemosensoriproteiini</b>					
Estimaatin arvo	0.149	0.162	0.203	0.139	0.189
Keskivirhe	0.050	0.026	0.027	0.021	0.029
df	51	62	69	62	80
t-arvo	2.98	6.24	7.63	6.64	6.57
p-arvo	0.0047	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

### 3.3. Makuainreseptori, GRT

GRT-geeni ilmeni kaikilla seitsemällä tutkimuslajilla työläisillä ( $\bar{x} = 0,10$ , s.d. = 0.06, n = 325) kuningattaria ( $\bar{x} = 0.05$ , s.d. = 0.04, n = 96) voimakkaammin. Voimakkainta keskimääräinen GRT:n ilmentyminen oli kaljuloviniskatyöläisillä ( $\bar{x} = 0.112$ , s.d. = 0.044, df = 46) ja matalinta samettimuurahaiskuningattarilla ( $\bar{x} = 0.034$ , s.d. = 0.032, df = 18), mutta erot geenin ilmentymisessä lajien sekä kastien välillä olivat melko

pieniä (taulukot 4 ja 7, kuva 3). Kastien välin ero GRT:n ilmentymisessä oli tilastollisesti merkitsevää kaikilla muilla lajeilla paitsi karvaloviniskalla (GLMM,  $df = 44$ ,  $p_{\text{kasti}} = 0,69$ ,  $t_{\text{kasti}} = 0,4$ ).



**Kuva 3.** Makuaiistinreseptorin (GRT) suhteellinen ilmentyminen suomumuurahaisilla ( $n=421$ ). Kukin pylväsdiagrammi kuvaa vertailugeenien avulla normalisoitua kohdegeenin suhteellista ilmentymistä  $\Delta C(t)$ -arvojen keskiarvona kullakin lajilla kasteittain. Pylväsdiagrammissa janat kuvaavat keskiarvon keskivirhettä. Kunkin lajin kastien välisen ilmentymisen eron merkitsevyys on merkitty kuvaan tähdin (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  ja \*  $p < 0.05$ ).

**Taulukko 7.** GRT-geenin ilmentymisen erot työläisten ja kuningatarten kasteilla seitsemällä suomumuurahaislajilla. Taulukossa on esitetty lineaarisen yhdistelmämallin ( $\ln_e(\Delta C(t))^{0.1} \sim \text{kasti}, \text{random} = \sim 1 \mid \text{yhteiskunta}$ ) tulokset.

	Karvalovi- niska	Niitty- muurahainen	Musta- muurahainen	Kalju- loviniska	Sametti- muurahainen	Kanto- muurahainen	Tupsukeko- muurahainen
<b>GRT Makuaiistinreseptori</b>							
Estimaatin arvo	0.010	0.047	0.050	0.044	0.070	0.071	0.189
Keskivirhe	0.025	0.020	0.015	0.011	0.011	0.011	0.029
df	44	55	53	59	69	61	80
t-arvo	0.40	2.36	3.27	3.90	6.40	6.64	6.57
p-arvo	0.6933	0.0222	0.002	0,0003	<0.0001	<0.0001	<0.0001

### 3.4 Tutkimusgeenien korrelaatio

CSP-geenin ilmentyminen vaikutti hyvin samankaltaiselta kuin OBP:n ilmentyminen perustuen lajeihin ja kasteihin, joilla ilmentyminen oli voimakkainta tai matalinta. Tämän vuoksi päätin tarkastella tilastollisesti myös kyseisten geenien välistä korrelaatiota.

OBP:n ilmentyminen oli kaikilla lajeilla voimakkaampaa kuin CSP:n (taulukko 4 ja kuvat 1 - 2). Molempien geenien ilmentyminen oli kaikilla lajeilla työläisillä kuningattaria voimakkaampaa (taulukot 5 ja 6, kuvat 1 ja 2). Suuriman osan OBP:n ilmentymisestä selitti CSP:n ilmentyminen ( $p < 0,001$ ) (taulukko 8). Kaikilla vertaamillani lajeilla OBP:n ja CSP:n ilmentyminen oli positiivisesti korreloitunutta, eli CSP-geenin ilmentyminen kasvoi OBP-geenin ilmentymisen kasvaessa. Mustamuurahaisella (GLMM,  $df = 43$ ,  $p_{\text{interaktio}} = 0.043$ ,  $t_{\text{interaktio}} = -2.09$ ) ja tupsukekomuurahaisella (GLMM,  $df = 71$ ,  $p_{\text{interaktio}} = 0.0002$ ,  $t_{\text{interaktio}} = 3.99$ ) CSP-geenin vaikutus OBP-geenin ilmentymiseen oli myös riippuvasta kastista. Mustamuurahaisilla interaktio-termin negatiivinen estimaatin arvo kertoo siitä, että korrelaatio on pienempi työläisillä kuin kuningattarilla. Tupsukekomuurahaisten positiivinen estimaatin arvo kertoo interaktion olevan työläisillä kuningattaria voimakkaampaa.

**Taulukko 8.** OBP:n ja CSP:n ilmentymisen välinen korrelaatio suomumuurahaisilla. Taulukossa on esitetty lineaarisen yhdistelmämallin ( $\Delta C(t)OBP^{0.1} \sim \Delta C(t)CSP^{0.1} * \text{kasti}$ ,  $\text{random} = \sim 1 \mid \text{yhteiskunta}$ ) tulokset tutkimuslajeittain.

Laji	muuttuja	Estimaatin arvo	df	keskivirhe	t-arvo	p-arvo
Mustamuurahainen	$\Delta C(t)CSP$	1.63	43	0.26	6.17	<0.0001
	kasti	0.39	43	0.17	2.26	0.029
	interaktio	-0.56	43	0.27	-2.09	0.043
Kaljuloviniska	$\Delta C(t)CSP$	1.17	52	0.19	6.05	<0.0001
	kasti	-0.10	52	0.12	-0.85	0.397
	interaktio	0.16	52	0.21	0.78	0.436
Samettimuurahainen	$\Delta C(t)CSP$	1.13	61	0.27	4.16	<0.0001
	kasti	-0.07	61	0.17	-0.42	0.674
	interaktio	0.16	61	0.29	0.54	0.589
Kantomuurahainen	$\Delta C(t)CSP$	1.14	53	0.20	5.58	<0.0001
	kasti	-0.09	53	0.11	-0.84	0.403
	interaktio	0.12	53	0.22	0.57	0.574
Tupsukekomuurahainen	$\Delta C(t)CSP$	0.72	71	0.08	8.84	<0.0001
	kasti	-0.23	71	0.06	-3.90	0.0002
	interaktio	0.36	71	0.09	3.99	0.0002



## 4. TULOSTEN TARKASTELU

Tutkimushypoteesini mukaisesti kaikkien tutkimusgeenien suhteellinen ilmentyminen oli työläisillä voimakkaampaa kuin kuningattarilla ja kastien välinen ero ilmentymisessä oli tilastollisesti merkitsevä OBP:lla sekä CSP:lla kaikilla lajeilla ja GRT:lla kuudella seitsemästä tutkimukseni suomumuurahaislajista. Tutkimuksessani havaittu kemosensoistorien geenien kastispesifinen ilmentyminen on erityisen mielenkiintoista muurahaisten monimutkaisen sosiaalisen järjestäytyneisyyden ja sitä ohjaavan kemiallisen kommunikaation näkökulmasta.

### 4.1. Kastierot geenien ilmentymisessä

Geenien ilmentymisen kastieroja tarkasteltaessa on hyvä pitää mielessään, että työläisten ja kuningattarten tehtävät muurahaisyhteiskunnassa ovat täysin erilaisia. Kuningatar on käytännössä munintakone ja työläiskasti hoitaa loput tehtävät yhteiskunnan sisällä. Tämä johtaa myös erilaiseen tunnistustarpeeseen. Työläisten aistinjärjestelmältä vaaditaan paljon niin pesänpuolustuksessa, ravinnonhankinnassa kuin jälkeläisten hoidossakin. Kuningattaren aistinjärjestelmän vaatimukset voivat olla niiden erilaisen tehtävän vuoksi pienemmät.

Vastoin hypoteesiani, en havainnut kuningattarten geenien ilmentymisessä eroja superkoloniaalisten ja sukulaistrakenteisten lajien välillä. Olisi voinut odottaa, että kuningattarten aistinjärjestelmän geenien ilmentyminen olisi ollut superkoloniaalisilla lajeilla muita lajeja voimakkaampaa, sillä niille tehokkaasta hajuaistista voisi olla hyötyä kuningattarten välisissä konflikteissa pesän sisällä. Toki on mahdollista, että lajien välillä on tällaista kilpailua, vaikka tässä tutkimuksessa sitä ei havaittukaan. Mahdollisesti juuri näytteenotto aikana kuningattarten välillä ei ole ollut kilpailua ja siksi geenien ilmentymistasoissakaan ei havaittu eroja sukulaistrakenteisiin lajeihin nähden. Havaittu kemosensoistorien geenien ilmentyminen voisi olla täysin toisenlaista, jos tutkimusyksilömme olisivat olleet esimerkiksi lentoikäisiä nuoria kuningattaria, sillä pesän ulkopuolella kuningattaren aistinjärjestelmän on kyettävä tunnistamaan parittelun ja pesänperustamisen kannalta tärkeitä kemiallisia signaaleja.

OBP- ja CSP-geenien ilmentyminen vaihteli sukulaistrakenteisilla sekä superkoloniaalisilla lajeilla eikä vaihtelun havaittu riippuvan lajin yhteiskuntarakenteesta. Yhteiskuntarakenne ei näyttänyt vaikuttavan myöskään GRT-geenin ilmentymiseen, vaan ilmentyminen oli kaikilla lajeilla hyvin samanlaista ja voimakkaampaa työläisillä kuin kuningattarilla. Työläisten rooli pesässä selittää havaittua kaavaa, liittyipä GRT sitten tuoksujen aistimiseen tai makuaistimuksen syntyyn (Vosshall & Stocker 2007, Zhou ym.2012).

Työläiset hoitavat myös pesän ravinnonhankinnan, joten niiden makuaistinjärjestelmän luulisi olevan kuningatararten makuaistia tehokkaampi.

Mikäli voisin olla varma tutkimusgeenieni toiminnallisuuksista ja tehtävistä tutkimuslajeillani, olisi mielenkiintoista tarkastella kyseisten geenien ilmentymistä tarkemmin myös kastien sisällä. Jos tietäisin tutkimusgeenien täydellä varmuudella liittyvän pesätovereiden tunnistamiskykyyn ja näin vaikuttavan esimerkiksi yksilöiden aggressiivisuuteen, geenien ilmentymisen tarkastelu eri tehtäviä hoitavien työläisten välillä, voisi kertoa näiden työläisten geneettisestä taustasta tunnistamisen takana. Olisi mielenkiintoista nähdä, eroaako esimerkiksi hajuaistinjärjestelmän geenien ilmentyminen pesänpuolustukseen keskittyvien ulkotyöläisten, ravinnonhankintaa hoitavien työläisten ja erityisesti pesän sisällä jälkeläisten hoitoon erikoistuneiden työläisten välillä, kuten *F. fuscalla* on eräiden muiden geenien havaittu eroavan (Morandin ym. 2019). Tätä näkökulmaa olisi mielenkiintoista tarkastella myös lajeilla, joiden työläisillä pesänulkopuolisia yksilöitä kohtaan suunnatun aggression tiedetään olevan keskenään erilaista.

Geenit voivat ilmentyä osin myös hyvin tilannesidonnaisesti ja esimerkiksi eri ikäisillä tai eri tehtäviä hoitavilla yksilöillä eri tavoin (Kohlmeier ym. 2019, Morandin ym. 2019). Kaikin kaikkiaan geenien ilmentymiseen vaikuttaa aina yksilön sen hetkinen tilanne ja tällainen tilannesidonnainen vaihtelu yksittäisten muurahaisten geenien aktiivisuudessa (esimerkiksi aggressiivinen kohtaaminen toisen yksilön kanssa) voisi vaikuttaa tuloksiin (Manfredini ym. 2014, 2013, Okada ym. 2017). Kaikki tutkimukseni näytteet kerättiin pesän sisältä välittömästi muurahaisten herättyä talvihorroksesta, joten yhteiskuntien elämä ei tällöin vielä ollut aktiivisimmillaan, eikä kuningatar ollut vielä aloittanut munintaa. Keruuajalla voi olla vaikutusta myös kemosensoristen geenien ilmentymiseen. Esimerkiksi heti horroksesta heräämisen jälkeen, pesän puolustuksesta vastaavat yksilöt, eivät välttämättä ole vielä aktivoituneet roolissaan, jolleivat ne ole kohdanneet muiden yhteiskuntien yksilöitä. Tutkimusgeenieni ilmentyminen kaikilla lajeilla geenistä riippumatta melko samalla tavalla, saa minut kuitenkin uskomaan kontekstisidonnaisen geenienilmentymisen vaikutuksen olevan tuloksiini hyvin vähästä ja näytteiden olevan keskenään vertailukelpoisia.

Hypoteesini mukaisesti tutkimusgeenien ilmentyminen oli työläisillä voimakkaampaa kuin kuningattarilla. Havainto herättää miettimään johtuuko työläisten voimakkaampi geenien ilmentäminen ylipäättään paremmasta hajuaistista vai jopa paremmasta pesätovereiden tunnistuskyvystä. Aiemmin CSP:lla on havaittu tehtäviä nimenomaan kutikulan hiilivetyjen sitomisessa, joita käytetään pesätovereiden tunnistamiseen (Ozaki ym. 2005). Toisen CSP:n on myös todettu sitoutuvan kutikulan muihin komponentteihin tulimuurahaisella, ja ajateltu toimivan pesätovereiden tunnistamisessa, sillä tulimuurahaisilla pesätovereiden tunnistus saattaa perustua muihin aineisiin kuin hiilivetyihin (González ym. 2009).

#### 4.2. Geenien ilmentyminen kastien sisällä

Kaikki tutkimusgeenit ilmentyivät kuningattarilla, mutta geenien ilmentymistasot olivat lajien välillä eri geneeillä erilaisia. Ainut säännönmukaisuus kuningatarten geenien ilmentymisessä oli korrelaatio OBP- ja CSP-geenien välillä. Myös työläisillä OBP:n ja CSP:n ilmentyminen oli korreloitunutta. Tätä korrelaatiota selitti mustamuurahaisella ja tupsukekomuurahaisella myös kasti. Tutkimukseni mustamuurahaispopulaatioista osa oli monogynisiä ja osa matalasti polygynisiä. Kaikki tupsukekomuurahaisyhteiskunnat olivat voimakkaasti polygynisiä. Kuningatarten määrä ei siis vaikuttanut selittävän tätä tulosta. Mustamuurahaisilla OBP- ja CSP-geenien välinen korrelaatio oli kuningattarilla työläisissä voimakkaampaa. Tupsukekomuurahaisilla OBP- ja CSP-geenien välinen korrelaatio oli työläisillä kuningattaria voimakkaampaa. Seitsemästä tutkimuslajista juuri mustamuurahaisten ja tupsukekomuurahaisten työläiset ilmensivät sekä OBP- että CSP-geeniä kaikista voimakkaimmin.

Tällaista usean mahdollisesti samaa tehtävää hoitavan geenin samanaikaista voimakasta (tai toisaalta vähäistä) ilmentymistä, voi selittää geenien ilmentymisen tilannesidonnaisuus, johon jo aiemmin viittasin, tai geenien yhteiset säätelymekanismit (Kohlmeier ym. 2019, Manfredini ym. 2014, 2013, Morandin ym. 2019, Okada ym. 2017). Voi olla, että jotkut yksilöt ovat aistien suhteen aktiivisempia, joko siksi, että hoitavat tiettyä tehtävää yhteiskunnassa (esim. sotilaat) tai siksi, että ovat juuri kohdanneet tilanteen, jossa tiettyjen geenien aktiivisuutta vaaditaan. Esimerkiksi tunkeilijan kohtaaminen yhteiskunnassa voi saada aistit valpastumaan ja puolustusreaktion käyntiin. Geenien säätely ja sen ymmärtämien on monimutkainen kokonaisuus ja siksi geenien ilmentymisen yhteisvaikutusten tutkimus on mielenkiintoista ja geeniverkoston toiminnan sekä geenien säätelyn ja evoluution ymmärtämiseksi tärkeää (Morandin ym. 2014).

#### 4.3. Kudosspesifisyys geenien ilmentymisessä

Tutkimuksessani käytin geenien ilmentymisen tutkimiseen kokonaisia yksilöitä, joten en voi olla täysin varma tuottavatko tutkimani geenit nimenomaan niitä aistinjärjestelmän proteiineja, jotka ilmentyvät voimakkaasti hyönteisten tuntosarvissa. Erot ilmentymisessä voivat johtua myös siitä, että tutkimusgeneeillä on meille tuntemattomia kudosspesifisiä tehtäviä tuntosarvien lisäksi muissa kudoksissa (Warner ym. 2017). Tulosten tulkintaa vaikeuttaa se, ettei minulla ole käytössäni kudosspesifistä aineistoa. Ilmentymisen tarkastelu myös kudostasolla tutkimuslajeiltani toisi paljon arvokasta lisätietoa tutkimusgeneistäni.

Kokonaisten yksilöiden käyttö lajikohtaisten ilmenemiseröjen selvittämisessä on kuitenkin perusteltua, sillä tälläkin menetelmällä ilmentymistasot ovat keskenään vertailukelpoisia. Lajien välinen

kokoero ei vaikuta tulostasoon, sillä tutkimuksessa on käytetty kontrolligeenejä (Morandin ym. 2014), jotka poistavat lajien kokovaihtelun vaikutuksen. Saman RNA-määrän käyttö kaikilla yksilöillä takaa näyttemateriaalin määrän olevan vakioitu. Näin ollen lajien väliset erot geenien ilmentymisessä eivät voi johtua lajien välisistä kokoeroista, vaikkakin kudosten suhteelliset kokoerot lajien välillä voivat vaikuttaa tuloksiin. Tutkimusgeenieni kudosspesifistä ilmentymistä ei tunneta vielä tarpeeksi hyvin, mutta jos jollakin lajeista geeniä ilmentävää kudosta on toista lajia enemmän suhteessa ruumiinkokoon, voi geenin ilmentyminen tällä lajilla näyttäytyä tuloksissani virheellisesti voimakkaampana.

*Camponotus floridanus* ja *H. saltator* -muurahaisilla tuntosarvispesifisten GR:ien on todettu ilmentyvän voimakkaammin työläisillä, kuin koirailta. Ilmentymiseron on ehdotettu liittyvän siihen, että koirailta puuttuu osa aistinhermopäätteistä (glomerul), jotka kuningattarilta ja työläisiltä löytyvät. Aistinhermopäätteiden määrä korreloi myös toimivien kemoreseptorien määrän kanssa. Havainto herättää pohtimaan, voiko näin ollen naaraiden hajuaisti olla koiraita parempi ja näin myös vaikuttaa esimerkiksi pesätoveruuden tunnistuskykyyn. Tätä hypoteesia tukee se, että *C. japonicuksella* on havaittu vain naarailla olevan hajuaistinsensilloja, jotka ovat välttämättömiä pesänulkopuolisten yksilöiden CHC-profiilien tunnistamisessa (Nakanishi ym. 2009, Ozaki ym. 2005). *C. floridanuksella*, *H. saltatorilla* ja *C. japonicuksella* tehdyt havainnot herättävät kiinnostusta selvittää myös tutkimusgeenieni ilmentymistä työläisten ja kuningatararten lisäksi koirailta ja erityisesti niin, että tarkastelu tehtäisiin kastitason lisäksi myös kudostasolla. Koirailta voisi olla tarvetta tehokkaalle hajuaistille tunnistamisessa esimerkiksi parittelutilanteissa, jos niillä olisi sen ansiosta mahdollisuus tunnistaa itselleen läheistä sukua olevat yksilöt muista yksilöistä ja näin ollen välttää sisäsiitosta. Muilla tutkimukseni lajeilla tätä asiaa ei ole selvitetty, mutta tupsukekomuurahaisilla tehdyissä tutkimuksissa tällaista sisäsiitoksen välttämiskäyttäytymistä ei kuitenkaan ole havaittu (Fortelius 2005).

Tutkimusgeenini kuuluvat geeniperheisiin, joista ei ole vielä julkaistu suurta määrää yksittäisten geenien ilmentymisaineistoa ja vain muutamien geenien ilmentymistä on tutkittu kudostasolta. Näihin geeniperheisiin kuuluvat geenit vaikuttavat kuitenkin tämänhetkisten tutkimustietojen valossa ilmentyvän nimenomaan tuntosarvispesifisesti. Tuntosarvien pääasiallisesti ilmentyvänä proteiinina on pidetty CSP-geeniperheen proteiineja useammassakin tutkimuksessa (Forêt ym. 2007, González ym. 2009, Ishida ym. 2002, Ozaki ym. 2005, Zhang ym. 2016). Lisäksi monien OBP geenien ilmentyminen on voimakasta myös muurahaisten tuntosarvissa (Pracana ym. 2017, Wang ym. 2013). GR-geeniperheen geenit saivat nimensä alun perin hyönteisten suosissa ilmentymisen perusteella, mutta niiden todettiin myös myöhemmin ilmentyvän hyönteisten tuntosarvissa (Vosshall & Stocker 2007).

#### 4.4. Geenien nimeämisestä ja tehtävistä muurahaisilla

Vaikka tutkimukseni geenit oli valittu ja näin ollen myös nimetty niiden toimintojen perusteella, en voi tietenkään olla varma niiden tehtävistä tutkimuslajeillani. Kaikkien tutkimuksessani käyttämiäni geenien on havaittu geeniperhetasolla liittyvän hajuaistimuksen syntyyn vähintään yhdellä muurahaislajilla ja tästä näkökulmasta niitä itsekkin tarkastelin tässä tutkimuksessa. On kuitenkin tärkeää muistaa, että hajuaistimuksen lisäksi näillä geeneillä voi olla paljon muitakin tehtäviä ja ne voivat jopa pääasiallisesti liittyä johonkin aivan muuhun kuin hajuaistimuksen syntyyn.

Meidän täytyy olla varovaisia, kun annamme ymmärtää, että joku geeni toimii tietyssä tehtävässä vain siltä pohjalta, että sen sekvenssi on homologinen toisen sekvenssin kanssa, koska paralogiset kopiot eivät välttämättä säilytä niiden muinaisia toiminnallisuuksia. Tämän vuoksi lisätutkimukset myös tutkimusgeenieni toiminnallisuuksista olisivat tarpeen. Lisäselvyyttä näiden geenien toimintaan toisi niin kudosspesifisen ilmentymisen tutkiminen kuin kastin sisäisen vaihtelun tarkastelu eri tehtäviin erikoistuneilla yksilöillä. Näitä ominaisuuksia voitaisiin tutkia esimerkiksi tekemällä geenien muokkausta tai poistoa CRISPR-tekniikalla ja tarkastelemalla käyttäytymiskokeiden avulla kykenevätkö poistogeeniset yksilöt yhä tunnistamaan pesätovereitaan. Jos eivät, varmistuisimme geenien todella liittyvän pesätoveruuden tunnistukseen. Tätä menetelmää on käytettykin jo muurahaisilla hajuaistin tutkimuksessa (Trible ym. 2017), joten sitä olisi kiinnostavaa kokeilla myös tutkimusgeeneilläni.

Tutkimusgeenieni tehtävien ollessa yhä epäselviä voimme vain spekuloida niiden toiminnallisuuksia. Siksi katsoin aiheelliseksi tarkastella tutkimusgeenejä työssäni geeniperhetasolla siitä lähtökohdasta, että kyseisten geenien toiminnallisuus vastaa tutkimuslajeillani samantyyppisiä toiminnallisuuksia, joita geeniperheiden on havaittu ohjaavan muilla hyönteisillä (d’Ettorre & Lenoir 2010, González ym. 2009, Leal ym. 2005, Leal ym. 2013, Ozaki ym. 2005, Vosshall & Stocker 2007, Xu ym. 2009).

#### 4.5. Tutkimusgeenien evoluutioaipeumus

Tutkimuksessani kaikkien hajuaistimukseen liittyvien geenien ilmentyminen noudatti yhteistä kaavaa ollen voimakkaampaa työläisillä kuin kuningattarilla. Kaava toistui samanlaisena myös lähes kaikilla lajeilla. Ainoastaan karvaloviniskalla GRT:lla ei havaittu kastien välistä eroa. Kastispesifisten geenien evoluutio on tyypillisesti nopeaa, ja se voi tapahtua joko positiivisen valinnan vaikutuksesta tai neutraalisti (Harpur ym. 2014, Helanterä & Uller 2014, Mikheyev & Linksvayer 2015, Warner ym. 2017). Tutkimuksessani havaittu kaavamainen kastispesifinen ilmentyminen voisi kertoa siitä, että tutkimusgeeneihin vaikuttaa positiivinen valinta, sillä havaintoni on yhteneväinen muurahaispesifisissä CSP-geeneissä havaitun positiivisen valinnan

alla tapahtuvan nopean evoluution ja duplikaatiotaipumuksen kanssa (Kulmuni ym. 2013, Kulmuni & Havukainen 2013). Myös haju- ja makureseptoreiden on aiemmin havaittu evolvoituvan nopeasti (Zhou ym. 2012). Nopean evoluution syyksi muurahaisten kemiallisessa aistinjärjestelmässä on ehdotettu muurahaisten sosiaalista käytöstä ohjaavissa CHC-profiileissa tapahtuvia muutoksia.

Tarkempi kemosenzaatioon liittyvien geeniperheiden tutkimus suomumuurahaisilla sekä muilla muurahaislajeilla toisi meille lisää tietoa myös näiden geenien evoluutiosta. Esimerkiksi sekvenssievoluution tarkastelu voisi olla seuraava looginen askel tutkimusgeeniäni tutkimuksessa. Tämän tyyppistä geeniperhetason tutkimusta on jo muilla geeneillä tehtykin. Tutkimuslajeillani on esimerkiksi selvitetty vitellogeniinien geeniperheeseen kuuluvien geenien määrää, proteiinirakennetta, sekvenssievoluutiota ja geenien ilmentymistä kasteittain ja työläiskastin sisällä (Morandin ym. 2019, Morandin ym. 2014). Sekä vitellogeniinillä, että muilla geeneillä tehdyissä tutkimuksissa on selvinnyt, että geeniperheisiin kuuluvien geenien määrä voi vaihdella runsaasti niin lajien välillä kuin lajin sisälläkin (Morandin ym. 2019, Morandin ym. 2014, Schrider & Hahn 2010) ja näiden geenien ilmentyminen voi olla eri lajeilla kastien välillä erilaista. Geeniperheiden geenien kopioiden määrän vaihtelulla onkin tärkeä rooli adaptaatiossa ja erilaistuminen uusiin funktioihin tapahtuu tyypillisesti geenien kahdentumisen seurauksena (Chau ja Goodisman 2017, Innan ja Kondrashov 2010, Sánchez-Gracia ym. 2009).

#### 4.6. Lopuksi

Tutkimuksessani havaitsin seitsemän suomumuurahaislajin kemosenzoristen geenien ilmentymisen olevan hypoteesini mukaisesti työläisillä kuningattaria voimakkaampaa. Sukulaisrakenteisten lajien tuoksu- ja makuaistingenien ilmentyminen ei ollut superkoloniaalisia lajeja voimakkaampaa, vaan lajien välillä havaittiin vaihtelua, joka ei näyttänyt riippuvan populaatioiden polygynia-asteesta. Tutkimukseni tarjoaa arvokasta tietoa tunnistusjärjestelmään liittyvien kemosenzoristen geenien ilmentymisestä ja herättää useita uusia mielenkiintoisia tutkimuskysymyksiä. Kemiallisen aistinjärjestelmän tutkimusta on tehty laajalla skaalalla, mutta geenien ilmentymisen, geeniduplikaatioiden ja evoluutionopeuden tutkimuksessa työsarkaa vielä riittää.

## KIITOKSET

Tämä työ tehtiin Tvärminnen eläintieteellisellä asemalla ja Helsingin yliopiston Molekyyliökologian ja systematiikan laboratoriossa. Kiitos yliopistolle laadukkaista työtiloista ja laitteistoista, laboratorion henkilökunnalle käytännön neuvoista sekä eläintieteelliselle asemalle leppoisasta majoituksesta ja hyvästä ruuasta.

Kiitos ohjaajani Heikki ja Claire. Olitte parhaat mahdolliset oppaat pitkäksi venyneelle gradumatkalleni. Heikki, Olet auttanut, kannustanut ja jaksanut uskoa minuun. Tämä matka oli vähällä jäädä kesken, mutta teit siitä mahdollisen ja kulkemisen arvoisen. Opin kaiken kahdesti, joten nyt varmasti osaan paljon. Kiitollisuuden määrä on rajaton. Claire, before I met you, I already was familiar with working in the laboratory. But little did I know about ant work in the lab. I enjoyed the time we went through with you. You teached me and guided me but let me use my own brains as well. And challenges I love. Thank you, Claire. Kiitos myös koko TEAM:: Antzz, erityisesti Unni, Annu, Sanja, Jenni ja Eva.

Tämä matka otti aikaa ja kokeellisen työn ja kirjoituksen välissä nimeni vaihtui, sain kaksi maailman rakkainta ja elämän merkitykselliseksi tekevää lasta. Kotikin löytyi lopulta aivan muualta kuin betoniviidakosta. Tie ei ole ollut kaikkein kevyin kulkea, mutta motivaatio lopulta löytyi, kun elämänpolku hiukan sitä ohjaili. Nyt tiedän mikä on tärkeää ja mitkä asiat on tehtävä, jotta niiden tärkeiden vaaliminen olisi mahdollista.

Kirjoitustyö poikkeuksellisen erikoisena keväänä on vaatinut paljon myös kotijoukoilta. Äiti, Elise olet maailman ihanin mummi, tukesi ja rajattoman apusi ansiosta uskalsin hypätä tähän kelkkaan uudestaan. Kiitos myös isi ja appivanhemmat, kaikkien teidän apu, on ollut tärkeää. Paulus ja Isla, te ette vielä ymmärrä miksi äiti joutui istumaan niin paljon tietokoneen ääressä yhteisten leikkien sijaan, mutta annoitte minulle sen suurimman kimmokkeen tehdä tämä työ loppuun. Kiitos. Timi, Kärsivällisyyttäsi on koeteltu, mutta se ei koskaan loppunut. Olet rakas. Kiitos.

## VIITELUETTELO

- Alexander, R. D., Noonan, K. M. & Crespi, B. J. 1991: The evolution of eusociality. — *The Biology of the Naked Mole rat*. Ed. Sherman, P. W., Jarvis, J. U. M. & Alexander R. D. Princeton University Press. (s. 3–44). Princeton.
- Bio-Rad. 2006: Real-Time PCR - Applications Guide.
- Boomsma, J. J. 2009: Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. — *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364: 3191–3207.
- Boomsma, J. J., & Gawne, R. 2018: Superorganismality and caste differentiation as points of no return: how the major evolutionary transitions were lost in translation. — *Biological Reviews*. 93: 28–54.
- Breed, M. D. 2014: Kin and nestmate recognition: The influence of W. D. Hamilton on 50 years of research. — *Animal Behaviour*. 92: 271–279.
- Chau, L. M., & Goodisman, M. A. D. 2017: Gene duplication and the evolution of phenotypic diversity in insect societies. — *Evolution*. 71: 2871–2884.
- Chen, F. C., Chen, C. J., Li, W. H., & Chuang, T. J. 2010: Gene family size conservation is a good indicator of evolutionary rates. — *Molecular Biology and Evolution*. 27: 1750–1758.
- Chernenko, A., Helanterä, H., & Sundström, L. 2012: Colony kin structure and queen recruitment in the ant *Formica fusca* (Hymenoptera: Formicidae). — *Myrmecological News*. 16: 93–100.
- Clyne, P. J., Warr, C. G., & Carlson, J. R. 2000: Candidate taste receptors in *Drosophila*. — *Science*. 287: 1830–1834.
- Collingwood, C. A. 1979: The Formicidae (Hymenoptera) of Fennoscandia and Denmark. — *Fauna Entomologica Scandinavica* 8: 1–174.
- Corona, M., Hughes, K. A., Weaver, D. B., & Robinson, G. E. 2005: Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. — *Mechanisms of Ageing and Development*. 126: 1230–1238.
- Crozier, R. H. & Pamilo, P. 1996: Evolution of social insect colonies. — Sex allocation and kin selection. Oxford University Press. Oxford.
- Czechowski, W., Radchenko, A., & Czechowska, W. 2002: The ants (Hymenoptera, Formicidae) of Poland. — Museum and Institute of Zoology PAS. Warszawa. 200 s.
- Demuth, J. P., & Hahn, M. W. 2009: The life and death of gene families. — *BioEssays*. 31: 29–39.
- d’Ettorre, P. and Lenoir, A. 2010: Nestmate recognition. — *Ant Ecology*. Ed. Lach, L., Parr, C. L. & Abbott, K. L. Oxford University Press. (s. 194–209) Oxford.
- Dhaygude, K., Trontti, K., Paviola, J., Morandin, C., Wheat, C., Sundström, L., & Helanterä, H. 2017: Transcriptome sequencing reveals high isoform diversity in the ant *Formica exsecta*. — *PeerJ*. 11: 1–31.
- Dunipace, L., Meister, S., Mcnealy, C., & Amrein, H. 2001: Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the. — *Current Biology*. 11: 822–835.
- Evans, J. A. Y. D., & Wheeler, D. E. 1999: Differential Gene Expression between Developing Queens and Workers in the Honey. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Published by: National Academy of Sciences*. 96: 5575–5580.
- Fishilevich, E., & Vosshall, L. B. 2005: Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. — *Current Biology*. 15: 1548–1553.
- Finnzymes Oy. 2009. Principles of qPCR. Press Edita. Helsinki.



- Forêt, S., & Maleszka, R. 2006: Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). — *Genome Research*. 16: 1404–1413.
- Forêt, S., Wanner, K. W., & Maleszka, R. 2007: Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. — *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37: 19–28.
- Fortelius, W. 2005: Mating behaviour in the polygynous/polydomous wood ant *Formica aquilonia*. — *Annales Zoologici Fennici*. 42: 213–224.
- Gardiner, A., Barker, D., Butlin, R. K., Jordan, W. C., & Ritchie, M. G. 2008: *Drosophila* chemoreceptor gene evolution: Selection, specialization and genome size. — *Molecular Ecology*. 17: 1648–1657.
- Gong, D. P., Zhang, H. jie, Zhao, P., Lin, Y., Xia, Q. Y., & Xiang, Z. H. 2007: Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. — *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37: 266–277.
- González, D., Zhao, Q., McMahan, C., Velasquez, D., Haskins, W. E., Sponsel, V., Cassill, A. & Renthal, R. 2009: The major antennal chemosensory protein of red imported fire ant workers. — *Insect Molecular Biology*. 18: 395–404.
- Gräff, J., Jemielity, S., Parker, J. D., Parker, K. M., & Keller, L. 2007: Differential gene expression between adult queens and workers in the ant *Lasius niger*. — *Molecular Ecology*. 16: 675–683.
- Hakala, S. M., Ittonen, M., Seppä, P., & Helanterä, H. 2020: Limited dispersal and an unexpected aggression pattern in a native supercolonial ant. — *Ecology and Evolution*. 10: 3671–3685.
- Hamilton, W. D. 1964: The genetical evolution of social behavior. — *Journal of Theoretical Biology*. 7: 1–52.
- Hamilton, W. D. 1972: Altruism and related phenomena, mainly in social insects. — *Annual Review of Ecology and Systematics*. 3: 193–232.
- Hannonen, M., & Sundström, L. 2003: Worker nepotism among polygynous ants. — *Nature*. 421: 910.
- Harpur, B. A., Kent, C. F., Molodtsova, D., Lebon, J. M. D., Alqarni, A. S., Owayss, A. A., & Zayed, A. 2014: Population genomics of the honey bee reveals strong signatures of positive selection on worker traits. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111: 2614–2619.
- Helanterä, H., Kulmuni, J., & Pamilo, P. 2016: Sex allocation conflict between queens and workers in *Formica pratensis* wood ants predicts seasonal sex ratio variation. — *Evolution*. 70: 2387–2394.
- Helanterä, H., Strassmann, J. E., Carrillo, J., & Queller, D. C. 2009: Uniclonal ants: where do they come from, what are they and where are they going? — *Trends in Ecology and Evolution*. 24: 341–349.
- Helanterä, H., & Sundström, L. 2007: Worker policing and nest mate recognition in the ant *Formica fusca*. — *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 61: 1143–1149.
- Helanterä, H., & Uller, T. 2014: Neutral and adaptive explanations for an association between caste biased gene expression and rate of sequence evolution. — *Frontiers in Genetics*. 5: 1–27.
- Holmes, W. G. 2004: The early history of Hamiltonian-based research on kin recognition. — *Annales Zoologici Fennici*. 41: 691–711.
- Holzer, B., Kümmerli, R., Keller, L., & Chapuisat, M. 2006: Sham nepotism as a result of intrinsic differences in brood viability in ants. — *Biological Sciences*. 273: 2049–2052.
- Hunt, B. G., Ometto, L., Wurm, Y., Shoemaker, D. W., Yi, S. V., Keller, L., & Goodisman, M. A. D. 2011: Relaxed selection is a precursor to the evolution of phenotypic plasticity. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108: 15936–15941.
- Hölldobler, B. and Wilson, E. O. 1990: *The ants*. Springer Verlag. Berlin.

- Innan, H., & Kondrashov, F. 2010: The evolution of gene duplications: Classifying and distinguishing between models. — *Nature Reviews Genetics*. 11: 97–108.
- Ishida, Y., Chiang, V., & Leal, W. S. 2002: Protein that makes sense in the Argentine ant. — *Naturwissenschaften*. 89: 505–507.
- Kohlmeier, P., Alleman, A. R., Libbrecht, R., Foitzik, S., & Feldmeyer, B. 2019: Gene expression is more strongly associated with behavioural specialization than with age or fertility in ant workers. — *Molecular Ecology*. 28: 658–670.
- Krieger, M. J. B., & Ross, K. G. 2002: Identification of a major gene regulating complex social behavior. — *Science*. 295: 328–332.
- Kulmuni, J., Wurm, Y., & Pamilo, P. 2013: Comparative genomics of chemosensory protein genes reveals rapid evolution and positive selection in ant-specific duplicates. — *Heredity*. 110: 538–547.
- Kulmuni, J., & Havukainen, H. 2013: Insights into the Evolution of the CSP Gene Family through the Integration of Evolutionary Analysis and Comparative Protein Modeling. — *PLoS ONE*. 8.
- Leal, W. S. 2013: Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. — *Annual Review of Entomology*. 58: 373–391.
- Leal, W. S., Chen, A. M., Ishida, Y., Chiang, V. P., Erickson, M. L., Morgan, T. I., & Tsuruda, J. M. 2005: Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 5386–5391.
- Leal, W. S., Choo, Y. M., Xu, P., Da Silva, C. S. B., & Ueira-Vieira, C. 2013: Differential expression of olfactory genes in the southern house mosquito and insights into unique odorant receptor gene isoforms. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110: 18704–18709.
- Leboeuf, A. C., Waridel, P., Brent, C. S., Gonçalves, A. N., Menin, L., Ortiz, D., ... Keller, L. 2016: Oral transfer of chemical cues, growth proteins and hormones in social insects. — *ELife*. 5: 1–27.
- Liu, N., & Zhang, L. 2004: CYP4AB1, CYP4AB2, and Gp-9 gene overexpression associated with workers of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. — *Gene*. 327: 81–87.
- Manfredini, F., Lucas, C., Nicolas, M., Keller, L., Shoemaker, D., & Grozinger, C. M. 2014: Molecular and social regulation of worker division of labour in fire ants. — *Molecular Ecology*. 23: 660–672.
- Manfredini, F., Riba-Gognuz, O., Wurm, Y., Keller, L., Shoemaker, D. W., & Grozinger, C. M. 2013: Sociogenomics of Cooperation and Conflict during Colony Founding in the Fire Ant *Solenopsis invicta*. — *PLoS Genetics*. 9.
- Michener, C. D. 1969: Comparative Social Behavior of Bees. — *Annual Review of Entomology*. 14: 299–342.
- Mikheyev, A. S., & Linksvayer, T. A. 2015: Genes associated with ant social behavior show distinct transcriptional and evolutionary patterns. — *ELife*. 4: 1–17.
- Moffett, M. W. 2012: Supercolonies, nests, and societies: Distinguishing the forests from the trees. — *Behavioral Ecology*. 23: 938–939.
- Morandin, C., Hietala, A., & Helanterä, H. 2019: Vitellogenin and vitellogenin-like gene expression patterns in relation to caste and task in the ant *Formica fusca*. — *Insectes Sociaux*. 66: 519–531.
- Morandin, C., Havukainen, H., Kulmuni, J., Dhaygude, K., Trontti, K., & Helanterä, H. 2014: Not only for egg yolk-functional and evolutionary insights from expression, selection, and structural analyses of formica ant vitellogenins. — *Molecular Biology and Evolution*. 31: 2181–2193.
- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F., & Nishikawa, M. 2009: Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: Structure and distribution of sensilla on the flagellum. — *Cell and Tissue Research*. 338: 79–97.

- Nipitwattanaphon, M., Wang, J., Dijkstra, M. B., & Keller, L. 2013: A simple genetic basis for complex social behaviour mediates widespread gene expression differences. — *Molecular Ecology*. 22: 3797–3813.
- Nowak, M. A., Tarnita, C. E., & Wilson, E. O. 2010: The evolution of eusociality. — *Nature*. 466: 1057–1062.
- Nozawa, M. & Nei, M. 2007: Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in *Drosophila* species. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 104: 7122–7127.
- Okada, Y., Watanabe, Y., Tin, M. M. Y., Tsuji, K., & Mikheyev, A. S. 2017: Social dominance alters nutrition-related gene expression immediately: transcriptomic evidence from a monomorphic queenless ant. — *Molecular Ecology*. 26: 2922–2938.
- Ozaki, M., Wada-Katsumata, A., Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokohari, F., Satoji, Y., Nisimura, T., & Yamaoka, R. 2005: Ant Nestmate and Non-Nestmate Discrimination by a Chemosensory Sensillum. — *Science*. 309: 311–314.
- 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.
- Pelosi, P., Zhou, J. J., Ban, L. P., & Calvello, M. 2006: Soluble proteins in insect chemical communication. — *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63: 1658–1676.
- Pfaffl, M. W. 2001: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. — *In Nucleic Acids Research*. 29: 9.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., Heisterkamp, S. & Van Willigen, B. 2017: nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. — *R Packag*. 3rd edn.
- Pracana, R., Levantis, I., Martínez-Ruiz, C., Stolle, E., Priyam, A., & Wurm, Y. 2017: Fire ant social chromosomes: Differences in number, sequence and expression of odorant binding proteins. — *Evolution Letters*. 1: 199–210.
- Punntila, P., Haila, Y., Pajunen, T., & Tukia, H. 1991: Colonisation of Clearcut Forests by Ants in the Southern Finnish Taiga: A Quantitative Survey — *Oikos*. 61: 250–262.
- Ratnieks, F. L. W., Foster, K. R., & Wenseleers, T. 2006: Conflict Resolution in Insect Societies. — *Annual Review of Entomology*. 51: 581–608.
- Robertson, H. M., & Wanner, K. W. 2006: The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. — *Genome Research*. 16: 1395–1403.
- Robertson, H. M., Warr, C. G., & Carlson, J. R. 2003: Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 14537–14542.
- Rosset, H., & Chapuisat, M. 2006: Sex allocation conflict in ants: When the queen rules. — *Current Biology*. 16: 328–331.
- Sánchez-Gracia, A., Vieira, F. G., & Rozas, J. 2009: Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. — *Heredity*. 103: 208–216.
- Savolainen, R. & Vepsäläinen, K. 1988: A Competition Hierarchy among Boreal Ants: Impact on Resource Partitioning and Community Structure. — *Oikos*. 51: 135–155.
- Scharlaken, B., de Graaf, DC., Goossens, K., Brunain, M., Peelman, L. & Jacobs, F. 2008: Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: the head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. — *Journal of Insect Science*. 8: 1–10.
- Schrider, D. R., & Hahn, M. W. 2010: Gene copy-number polymorphism in nature. — *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 277: 3213–3221.

- Schultner, E., Gardner, A., Karhunen, M., & Helanterä, H. 2014: Ant larvae as players in social conflict: Relatedness and individual identity mediate cannibalism intensity. — *American Naturalist*. 184: E161–E174.
- Schultner, E., Saramäki, J., & Helanterä, H. 2016: Genetic structure of native ant supercolonies varies in space and time. — *Molecular Ecology*. 25: 6196–6213.
- Scott, K., Brady, R., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C., & Axel, R. 2001: A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. — *Cell*. 104: 661–673.
- Seifert, B. 2000: A taxonomic revision of the ant subgenus *Coptoformica*. — *Zoosystema*. 22.
- Smadja, C., Shi, P., Butlin, R. K., & Robertson, H. M. 2009: Large gene family expansions and adaptive evolution for odorant and gustatory receptors in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. — *Molecular Biology and Evolution*. 26: 2073–2086.
- Smith, C. D., Zimin, A., Holt, C., Abouheif, E., Benton, R., Cash, E., Croset, V., Currie, C. R., Elhaik, E., Elsik, C. G., Fave, M.-J., Fernandes, V., Gadau, J., Gibson, J. D., Graur, D., Grubbs, K. J., Hagen, D. E., Helmkamp, M., Holley, J.-A., Hu, H., Viniegra, A. S. I., Johnson, B. R., Johnson, R. M., Khila, A., Kim, J. W., Laird, J., Mathis, K. A., Moeller, J. A., Muñoz-Torres, M. C., Murphy, M. C., Nakamura, R., Nigam, S., Overson, R. P., Placek, J. E., Rajakumar, R., Reese, J. T., Robertson, H. M., Smith, C. R., Suarez, A. V., Suen, G., Suhr, E. L., Tao, S., Torres, C. V., van Wilgenburg, E., Viljakainen, L., Walden, K. K. O., Wild, A. L., Yandell, M., Yorke, J. A. & Tsutsui, N. D. 2011: Draft genome of the globally widespread and invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108: 5673–5678.
- Soroker, V., & Hefetz, A. 2000: Hydrocarbon site of synthesis and circulation in the desert ant *Cataglyphis niger*. — *Journal of Insect Physiology*. 46: 1097–1102.
- Steiner, F. M., Crozier, R. H. & Sclik-Steiner, B. C. 2010: Colony Structure. — *Ant Ecology*. Ed. Lach, L., Parr, C. L. & Abbott, K. L. Oxford University Press. (s. 177–193) Oxford.
- Sturgis, S. J., & Gordon, D. M. 2012: Nestmate recognition in ants (Hymenoptera: Formicidae): A review. — *Myrmecological News*. 16: 101–110.
- Suh, G. S. B., Wong, A. M., Hergarden, A. C., Wang, J. W., Simon, A. F., Benzer, S., Axel, R. & Anderson, D. J. 2004: A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. — *Nature*. 431: 854–859.
- Sundström, L., Keller, L., & Chapuisat, M. 2003: Inbreeding and sex-biased gene flow in the ant *Formica exsecta*. — *Evolution*. 57:1552–1561.
- Tarpy, D. R., Nielsen, R., & Nielsen, D. I. 2004: A scientific note on the revised estimates of effective paternity frequency in *Apis*. — *Insectes Sociaux*. 51: 203–204.
- Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S. & Portin, P. 2006: Biologian sanakirja. — Otavan Kirjapaino Oy. Keuruu.
- Tribble, W., Olivios-Cisneros, L., McKenzie, S. K., Saragosti, J., Chang, N. C., Matthews, B. J., Oxley, P. R. & Kronauer, D. J. C. 2017: orco Mutagenesis Causes Loss of Antennal Lobe Glomeruli and Impaired Social Behavior in Ants. — *Cell*. 170: 727-735.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. 2007: Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. — *Nucleic Acids Research*. 35: 71–74.
- van Zweden, J. S., & d’Ettorre, P. 2010: Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. — *Insect Hydrocarbons Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. s. 222–243.
- Vieira, F. G., & Rozas, J. 2011: Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the arthropoda: Origin and evolutionary history of the chemosensory system. — *Genome Biology and Evolution*. 3: 476–490.

- Vieira, F. G., Sánchez-Gracia, A., & Rozas, J. 2007: Comparative genomic analysis of the odorant-binding protein family in 12 *Drosophila* genomes: Purifying selection and birth-and-death evolution. — *Genome Biology*. 8.
- Vosshall, L. B., & Stocker, R. F. 2007: Molecular Architecture of Smell and Taste in *Drosophila*. — *Annual Review of Neuroscience*. 30: 505–533.
- Wang, J., Ross, K. G., & Keller, L. 2008: Genome-wide expression patterns and the genetic architecture of a fundamental social trait. — *PLoS Genetics*. 4.
- Wang, J., Wurm, Y., Nipitwattanaphon, M., Riba-Grognuz, O., Huang, Y. C., Shoemaker, D., & Keller, L. 2013: A Y-like social chromosome causes alternative colony organization in fire ants. — *Nature*. 493: 664–668.
- Warner, M. R., Mikheyev, A. S., & Linksvayer, T. A. 2017: Genomic Signature of Kin Selection in an Ant with Obligately Sterile Workers. — *Molecular Biology and Evolution*. 34:1780–1787.
- Wilson, E. O. 2008: One Giant Leap: How Insects Achieved Altruism and Colonial Life. *BioScience*. 58: 17–25.
- Wilson, E. O. 1971: *The Insect Societies*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Xu, Y. L., He, P., Zhang, L., Fang, S. Q., Dong, S. L., Zhang, Y. J., & Li, F. 2009: Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. — *BMC Genomics*. 10: 1–13.
- Zhang, W., Wanchoo, A., Ortiz-Urquiza, A., Xia, Y., & Keyhani, N. O. 2016: Tissue, developmental, and caste-specific expression of odorant binding proteins in a eusocial insect, the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. — *Scientific Reports*. 6: 1–16.
- Zhou, X., Slone, J. D., Rokas, A., Berger, S. L., Liebig, J., Ray, A., Reinberg, D. & Zwiebel, L. J. 2012: Phylogenetic and Transcriptomic Analysis of Chemosensory Receptors in a Pair of Divergent Ant Species Reveals Sex-Specific Signatures of Odor Coding. — *PLoS Genetics*. 8.