

Scolopendra morsitans -juoksujalkainen – laji vai lajikompleksi?

Johanna Hopkins

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto
Biologian laitos
27.3.2017

Linja: fysiologian ja genetiikan linja
Erikoistumisala: evoluutiobiologia

Laajuus: 40 op

Tarkastajat:

1:

2:

Hyväksytty (pvm):

Arvolause:

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti
tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.*

TURUN YLIOPISTO
Biologian laitos
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

HOPKINS, JOHANNA: *Scolopendra morsitans* -juoksujalkainen – laji vai lajikompleksi? [*The centipede Scolopendra morsitans – species or species complex?*]

Pro gradu -tutkielma, 82 s., 3 liitettä
Genetiikka ja fysiologia
Maaliskuu 2017

Scolopendromorpha-juoksujalkaiset (Chilopoda: Scolopendromorpha) muodostavat evolutiivisesti vanhan maaniveljalkaisryhmän, jonka systematiikkaa on viimeisen kymmenen vuoden aikana täydennetty DNA-sekvensseihin perustuvilla tutkimuksilla. *Scolopendra morsitans* on suurehko ja värikäs juoksujalkaislaji, jota tavataan laajalla alueella Afrikassa, Aasiassa ja Australiassa. Laji on ilmiänsuhtaan monimuotoinen, minkä vuoksi sitä on epäilty usean lajin muodostamaksi lajikompleksiksi. Lajiin onkin pitkään luokiteltu yksilöt, jotka eivät täytä minkään toisen *Scolopendra*-lajin tuntomerkkejä. Tutkimuksen tarkoituksena oli kartoittaa *S. morsitans* -lajin geneettistä muuntelua edustavalla maantieteellisellä otoksella ja selvittää, onko kyseessä pätevä laji vai lajikompleksi. Lajin evolutiivista historiaa kuvaavat fylogeneettiset puut rakennettiin *COI*-, *16S*- ja *28S*-geenisekvenssien pohjalta parsimoniaan ja suurimpaan uskottavuuteen perustuvilla menetelmillä. Suurimman uskottavuuden puulle määritettiin mahdolliset lajirajat bPTP-analyysillä. Lisäksi sekvenssien pohjalta laskettiin näytteille parittaiset etäisyydet kunkin merkkialueen suhteen. Tuloksissa *S. morsitans* -yksilöt muodostivat maantieteellisesti järjestäytyneitä ryhmiä ja fylogeneettiset puut olivat pääosin yhteneviä keskenään eri analyysien välillä. Uudelleenotantamenetelmiin perustuvat tukiarvot olivat korkeita fylogenioiden latvaosissa, mutta matalia niiden tyviosissa (evolutiivisesti vanhemmissa osissa). bPTP-analyysi löysi *S. morsitans* -lajin sisältä vähintään 21 mahdollista lajia. Lajin sisällä kaikkien kolmen geenin parittaiset etäisyydet olivat suurimmillaan yli 20 %. Tulokset tukevat käsitystä siitä, että *S. morsitans* -nimi kätkee alleen lajikompleksin ja lajin revisio on aiheellinen. Tutkimuksessa selvitettiin myös *S. morsitans* -lajia muistuttavan *Scolopendra antananarivoensis* -lajin ja *S. morsitans* -lajin kanssa synonymisoidun *Scolopendra amazonica* -fenotyypin lajistatusta geneettisen muuntelun valossa. Tulokset tukevat yksiselitteisesti *S. antananarivoensis* -lajin asemaa itsenäisenä lajina. *S. amazonica* -fenotyyppi sisältyy tulosten perusteella *S. morsitans* -lajikompleksiin ja sen lajistatuksen ratkaiseminen vaatii lisätutkimuksia.

ASIASANAT: DNA-viivakoodit, juoksujalkaiset, lajinmäärittäminen, systematiikka

SISÄLLYS

1. JOHDANTO

- 1.1 Miksi ja miten eliöitä luokitellaan?
- 1.2 Mikä on laji?
- 1.3 Miten eliöiden sukulaisuussuhteita tutkitaan?
 - 1.3.1 Tuntomerkit ja niiden ilmenemismuodot
 - 1.3.2 Fylogeneettiset puut
 - 1.3.3 Evoluutiomallit
 - 1.3.4 Sekvenssirinnastukset
- 1.4 Fylogeneettiset analyysimenetelmät
 - 1.4.1 Parsimonia
 - 1.4.2 Suurin uskottavuus
 - 1.4.3 Uudelleenjärjestelymenetelmät
 - 1.4.4 Fylogenian luotettavuuden arviointi
 - 1.4.5 Konsensuspuut
- 1.5 DNA-viivakoodaus
- 1.6 Tuhatjalkaiset
- 1.7 Juoksujalkaiset
- 1.8 Scolopendromorpha-lahko
- 1.9 *Scolopendra morsitans*
 - 1.9.1 Tuntomerkit, elintavat ja levinneisyys
 - 1.9.2 Lajinmäärittäminen
 - 1.9.3 Yksi laji vai lajikompleksi?
- 1.10 *Scolopendra amazonica* – nuorempi synonyymi vai oma lajinsa?
- 1.11 *Scolopendra antananarivoensis* – uusi laji vai *Scolopendra morsitans*?
- 1.12 Tutkimuksen tarkoitus

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

- 2.1 Taksonominen otanta
- 2.2 Menetelmät
 - 2.2.1 DNA:n eristäminen
 - 2.2.2 Geneettisten merkkialueiden monistaminen
polymeraasiketjureaktiolla
 - 2.2.3 DNA-elektroforeesi
 - 2.2.4 PCR-tuotteiden puhdistus

- 2.2.5 Sekvensointi
- 2.2.6 Sekvenssien laadun tarkistus
- 2.2.7 Sekvenssien visualisoiminen ja rinnastus
- 2.2.8 Fylogeneettiset analyysit
- 2.2.9 Parsimonia-analyysi
- 2.2.10 Suurin uskottavuus -analyysi
- 2.2.11 Lajirajojen määrittäminen suurimman uskottavuuden puolelle
- 2.2.12 Parittaiset etäisyydet

3. TULOKSET

- 3.1 Fylogeneettiset analyysit
- 3.2 Parittaiset etäisyydet
 - 3.2.1 *Scolopendra morsitans*
 - 3.2.2 *Scolopendra amazonica*
 - 3.2.3 *Scolopendra antananarivoensis*

4. POHDINTA

- 4.1 Lajinsisäinen ja lajien välinen geneettinen muuntelu
- 4.2 Onko *Scolopendra morsitans* laji vai lajikompleksi?
 - 4.2.1 Afrikka
 - 4.2.2 Pohjoinen ja eteläinen Intian niemimaa
 - 4.2.3 Thaimaa-Kambodža ja Thaimaa-Filippiinit
 - 4.2.4 Australia
- 4.3 Onko *Scolopendra amazonica* oma lajinsa?
- 4.4 Onko *Scolopendra antananarivoensis* oma lajinsa?
- 4.5 Toimiiko DNA-viivakoodaus juoksujalkaisilla?
- 4.6 Tulosten luotettavuus
 - 4.6.1 Aineiston riittävyys
 - 4.6.2 Geenialueiden valinta
 - 4.6.3 *Wolbachia* – mahdollinen virhelähde?
- 4.7 Jatkotutkimukset

KIITOKSET

KIRJALLISUUS

LIITTEET

- Liite 1.
- Liite 2.
- Liite 3.

1. JOHDANTO

1.1 Miksi ja miten eliöitä luokitellaan?

Kaikki maapallolla nykyisin elävät eliöt ovat polveutuneet yksisoluisesta esi-isästä, joka eli maapallolla 3,5 - 3,8 miljardia vuotta sitten (Arndt & Nisbet 2012; Weiss ym. 2016). Vuosimiljoonien kuluessa evoluutio on muovannut tämän viimeisen yhteisen esi-isän jälkeläisistä valtavan kirjon rakenteeltaan ja elintavoiltaan erilaisia elämänmuotoja. Yhtenä eliökunnan monimuotoisuuden mittarina pidetään lajien lukumäärää eli lajirikkautta. Nykyisin elävien aitotumallisten lajien lukumäärän arvioidaan olevan 8,7 miljoonaa. Noin 90 % näistä lajeista on edelleen tieteelle tuntemattomia (Mora ym. 2011).

Koko historiansa ajan ihminen on ollut riippuvainen ympäröivästä luonnosta. Tämän vuoksi ihmisellä on ollut tarve tunnistaa eliöitä ja nimetä ne (Mayr & Ashlock 1991). Eliökunnan monimuotoisuutta hahmottaakseen ihminen on myös luonut erilaisia tapoja luokitella eliöitä. Nykyisen tieteellisen luokittelun pohjana on binominen nimistö, jonka kehitti Carl von Linné (1753; 1758). Järjestelmässä jokaisella lajilla on yksilöllinen, kaksiosainen nimi: ensimmäinen osa on suvun nimi, jälkimmäinen osa lajiepiteetti. Jokaisesta lajista tallennetaan lajin kuvaamisen yhteydessä holotyypin, tyyppinäyte, johon tieteellinen nimi ja lajinkuvaus on sidottu.

Tieteellinen luokittelu muodostaa hierarkkisen järjestelmän, jossa jokainen eliölaji luokitellaan kuuluvaksi tiettyyn sukuun, heimoon, lahkoon, luokkaan ja pääjaksoon, sekä mahdollisiin välitasoihin, kuten alaheimoihin ja alalajeihin. Näitä ryhmiä kutsutaan taksonomisiksi tasoiksi (engl. rank). Jollekin taksonomiselle tasolle asetuvaa yhtenäistä eliöryhmää, esimerkiksi tiettyä lajia tai lahkkoa, kutsutaan taksoniksi. Tämän tutkielman tutkimusorganismien, *Scolopendra morsitans* -juoksujalkaisen, luokittelu on esitetty taulukossa 1 sekä nykymuodossaan, että Linnén (1758) käyttämässä varhaisimmassa muodossaan.

Linné luokitteli eliöryhmät ulkoisten tuntomerkkien eli morfologian perusteella siten, että ulkomuodoltaan samankaltaiset eliöt muodostivat yhtenäisen ryhmän. Samankaltaisuuden taustalla oli muuttumaton luonnonjärjestys, joka oli seurausta

luomistyöstä. Sata vuotta myöhemmin Charles Darwin (1859) esitteli evoluutioteorian, joka mullisti käsityksen eliökunnan monimuotoisuuden alkuperästä. Evoluutioteorian mukaan ilmiasu eli fenotyyppi kertoi eliöryhmien keskinäisistä sukulaisuussuhteista: toisiaan suuresti muistuttavilla eliöillä oli pidempi yhteinen polveutumishistoria ja ne olivat erkaantuneet omiksi ryhmikseen lähempänä nykyhetkeä.

Evoluutioteoriaan nojaten nykykäytäntönä on pyrkiä siihen, että taksonit ovat samansyntyisiä (monofyleettisiä), eli niihin sisältyvät kaikki tietyn esi-isän jälkeläiset ja ainoastaan ne. Ehdon täytyessä taksonit vastaavat kladeja (engl. clade), haaroja eliökunnan sukupuussa. Tietyn taksonin on oltava erotettavissa muista taksonista jollakin evoluution kannalta merkitsevällä kriteerillä, esimerkiksi morfologian, DNA-sekvenssin, elintapojen tai eliömaantieteellisen levinneisyyden suhteen. Taksonien määrittelyä vaikeuttaa se, etteivät niiden rajat ole luonnossa välittömästi nähtävillä. Keskinäistä hierarkkista järjestystä lukuun ottamatta taksonomisilla tasoilla ei myöskään ole yleispäteviä määritelmiä. Käytännössä esimerkiksi suku viittaa ominaisuuksiltaan ja laajuudeltaan erilaiseen ryhmään linnuilla kuin niveljalkaisilla.

Taulukko 1. *Scolopendra morsitans* -lajin tieteellinen luokittelu Linnén (1758) käyttämässä muodossa ja nyky muodossaan. Toisiaan vastaavat taksonomiset tasot on esitetty samalla rivillä. Merkittävin ero luokittelutapojen välillä on kasvanut taksonomisten tasojen määrä.

Nykyinen luokittelu		Linnén käyttämä luokittelu	
Domeeni	Eucarya (Aitotumaiset)	Regio	Animalia
Kunta	Animalia (Eläimet)		
Pääjakso	Arthropoda (Niveljalkaiset)		
Alajakso	Myriapoda (Tuhatjalkaiset)		
Luokka	Chilopoda (Juoksujalkaiset)	Classis	Insecta
Lahko	Scolopendromorpha	Ordo	Aptera
Heimo	Scolopendridae		
Alaheimo	Scolopendrinae		
Sukuryhmä	Scolopendrini		
Suku	<i>Scolopendra</i>	Genus	<i>Scolopendra</i>
Laji	<i>Scolopendra morsitans</i>	Species	<i>Scolopendra morsitans</i>

1.2 Mikä on laji?

Laji on perustavanlaatuinen taksonominen taso ja olennainen biologinen käsite, mutta sen aukoton määrittely on osoittautunut vaikeaksi (ns. species problem). Erilaisia lajikäsityksiä onkin muotoiltu useita. Mayrin ja Ashlockin (1991) mukaan Linnén lajikäsitys oli typologinen tai essentialistinen. Morfologisesti samanlaiset yksilöt muodostivat lajin, mikä oli heijastuma Platonin ideaopista. Lajit säilyivät ajallisesti muuttumattomina ja lajinsisäinen variaatio johtui lajin idean epätäydellisestä ilmentymisestä. Toista äärilaitaa edustaa nominalistinen lajikäsitys, jonka mukaan lajit ovat ihmisten luomia abstraktioita ja ainoastaan yksilöt ovat todellisia (Mayr & Ashlock 1991).

Nykyisin käytetyin lajikäsitys on biologinen lajikäsitys (engl. biological species concept, BSC), jonka Mayr (1942) esitti seuraavasti: ”Laji on keskenään tosiasiallisesti tai mahdollisesti lisääntyvien luonnonpopulaatioiden muodostama ryhmä, joka on eristäytynyt muista vastaavista ryhmistä lisääntymisen suhteen” (Futuyma 2013). BSC perustuu lajien väliseen biologiseen lisääntymisestäeseen, mikä rajaa lajikäsityksen koskemaan lähinnä suvullisesti lisääntyviä eliöitä. Lisäksi lisääntymisestäeen toteaminen ajallisesti ja maantieteellisesti toisistaan eristäytyneillä populaatioilla on usein mahdotonta. Käytännössä lajien tunnistamisessa käytetään tuntomerkkejä, jotka eivät kerro suoraan lisääntymisestää, mutta viittaavat populaatioiden geneettiseen eriytymiseen toisistaan. Lajia, jonka määritelmä perustuu ainoastaan sen fenotyyppiin, kutsutaan morfolajiksi. Vastaavasti biolajiksi kutsutaan lajia, joka on määritelty geneettisten tuntomerkkien perusteella.

Evoluutiobiologian alalla biologisen lajikäsityksen kanssa kilpailee fylogeneettinen tai evolutiivinen lajikäsitys (engl. phylogenetic species concept, PSC; Mayr & Ashlock 1991; Winston 1999). Simpsonin (1961) alkuperäisen määritelmän mukaan tällainen laji on ”perimälinja ..., joka kehittyy erillisenä muista ja jolla on oma yhtenäinen evolutiivinen rooli ja taipumukset” (Mayr & Ashlock 1991). Koska PSC korostaa polveutumista, se on BSC:ia käyttökelpoisempi lajikäsite systemaattisessa tutkimustyössä. PSC:n käytössä keskeinen kysymys on, miten suuret genotyyppiset erot vaaditaan, jotta lähisukuiset populaatiot lasketaan kuuluviksi eri lajeihin.

Lajien tunnistaminen on erityisen vaikeaa tilanteessa, jossa lähisukuisten lajien fenotyypit muistuttavat toisiaan suuresti. Lajit, joita ei kyetä erottamaan toisistaan morfologian avulla, muodostavat lajiryhmän tai lajikompleksin. Saman lajinimen alla piileviä lajeja kutsutaan kryptisiksi lajeiksi. Kryptisten lajien tunnistamisessa hyödynnetään tarkkojen morfologisten tutkimusten ohella geneettisten merkkialueiden vertailua ja eläimillä käyttäytymispiirteiden havainnointia (esim. Hebert ym. 2004; Amato ym. 2007; Dornburg ym. 2016).

1.3 Miten eliöiden sukulaisuussuhteita tutkitaan?

Fylogeniikka, systematiikka ja taksonomia ovat eliöiden keskinäisiä sukulaisuussuhteita tutkivia tieteenaloja. Termejä käytetään usein synonyymeinä, eikä niille ole olemassa virallisia määritelmiä, mutta alat eroavat tiettyjen painotusten suhteen. Taksonomia tutkii eliöiden luokittelua ja fylogeniikka eliöryhmien kehityshistoriaa. Systematiikan tutkimuskenttään kuuluu edellä mainittujen lisäksi eliöiden ominaisuuksien kehityshistorian tutkimus ja eliömaantiede.

Taksonomian sisällä on ollut historian saatossa erilaisia koulukuntia. Kladistiikka ja fenetiikka viittaavat 1950-luvulla virinneeseen filosofiseen keskusteluun siitä, miten eliöiden ominaisuuksista kertynyttä tietoa tulisi hyödyntää luokittelua tehtäessä (Schuh 2000, kts. s. 6-7). Feneetikot katsoivat, ettei eliöiden todellisia kehityshistorioita (fylogenioita) ole useinkaan mahdollista selvittää, minkä vuoksi luokittelun tulisi perustua objektiivisesti mitattuun kokonaissamankaltaisuuteen (Sokal & Sneath 1963). Sitä vastoin kladistikoiden mukaan synapomorfiat, viimeisimmältä yhteiseltä esi-isältä perityt samankaltaisuudet, kertoivat luotettavasti polveutumishistoriasta, jota myös luokittelun tulisi heijastaa (Hennig 1950; Hennig 1966). Kladistiikan periaatteita sovelletaan nykyään laajasti systematiikan alalla ja feneettisestä lähestymistavasta muistuttavat lähinnä etäisyyteen perustuvat analyysimenetelmät.

1.3.1 Tuntomerkit ja niiden ilmenemismuodot

Nykyisin elossa olevien eliöryhmien evoluutiohistoriaa selvitetään tutkimalla eliöiden ominaisuuksia ja vertaamalla ryhmiä keskenään. Ominaisuutta, joka erottaa tutkittavat eliöt toisistaan, kutsutaan tuntomerkiksi (engl. character). Mielekkäällä tuntomerkillä on puolestaan vähintään kaksi ilmenemismuotoa (engl. character state).

Fylogeneettisissä analyyseissä käytetään tuntomerkeinä tavallisimmin morfologisia piirteitä sekä DNA-, RNA- ja proteiinisekvenssejä. Lisäksi fossiiliaineistosta voidaan saada jonkin verran tietoa menneisyydessä eläneistä eliöistä.

Morfologia oli 1900-luvun puoliväliin asti hallitseva ja usein ainoa kriteeri biologista luokittelua tehtäessä. Eliöiden morfologian keskinäistä vertailua helpottaa se, että monet tuntomerkit ovat välittömästi nähtävissä ja niitä voidaan tarkastella kokonaisuutena. Morfologisten tuntomerkkien käytön suurimpia ongelmakohtia on tiedon karttumisen hitaus. Luokittelussa käytettävien morfologisten tuntomerkkien valinta on taksonikohtaista, minkä vuoksi niiden tulkinta vaatii usein erityisasiantuntemusta. Jatkuvilla tuntomerkeillä, kuten pituusmitoissa, ongelmia saattaa aiheuttaa ilmenemismuotojen päällekkäisyys.

Viime vuosikymmeninä molekyyli-systematiikka on kehittynyt nopeasti uusien laboriotekniikoiden käyttöönoton myötä. DNA-sekvenssiin perustuvissa fylogeneettisissä analyyseissä tietyssä lokuksessa sijaitseva emäs on tuntomerkki ja emäksen ilmenemismuoto (A, G, T tai C) on kyseisen tuntomerkin ilmenemismuoto. DNA-sekvenssien käyttö mahdollistaa suurten datamatriisien luomisen lyhyessä ajassa ja onnistuneesta sekvensointituloksesta tuntomerkkien ilmenemismuodot voidaan tulkita yksiselitteisesti. Fylogeneettisissä tutkimuksissa pyritään käyttämään rinnakkain useita geenialueita, sillä yksittäisen geenin evoluutiohistoria ei välttämättä kerro koko totuutta eliön kehityshistoriasta.

Fylogeneettisissä analyyseissä käytettävien tuntomerkkien ja niiden saamien ilmenemismuotojen tulee olla mielekkäitä tutkittavan eliöryhmän kehityshistoriaa ajatellen. Fylogeniati perustuvat ensinnäkin homologisiin tuntomerkkeihin, jotka ovat periytyneet tutkittaville eliöille niiden yhteiseltä esi-isältä (Schuh 2000). Vastaavasti homoplasiat ovat usealle eliölle yhteisiä tuntomerkin ilmenemismuotoja, jotka ovat kehittyneet toisistaan riippumatta. Apomorfiat ovat evolutiivisessa mielessä uusi (engl. derived) tuntomerkin ilmenemismuoto. Synapomorfiat ovat apomorfoita, jotka ovat oletettavasti periytyneet tutkittaville eliöille niiden viimeisimmältä yhteiseltä esi-isältä. Niillä on fylogeneettisissä analyyseissä erityinen merkitys, sillä niiden avulla on mahdollista tunnistaa homologiset tuntomerkit ja monofyleettiset ryhmät (Schuh 2000).

1.3.2 Fylogeneettiset puut

Fylogeneettisten analyysien lopputuloksena on fylogenia, hypoteesi taksonomisten ryhmien sukulaisuussuhteista. Fylogenia esitetään tavallisesti fylogeniapuuna (engl. phylogenetic tree), jossa taksonit ryhmitellään hierarkkisiin monofyleettisiin ryhmiin. Kladogrammi on nimitys puulle, joka on saatu kladistisesta analyysistä (Schuh 2000). Monissa puunrakennusmenetelmissä oksapituus on suoraan verrannollinen evolutiivisten muutosten määrään kussakin oksassa. Tällaista puuta kutsutaan fylogrammiksi (Vandamme 2009).

Fylogeneettinen puu voi olla juureton tai juurellinen. Juuri paikannetaan useimmiten liittämällä puun tyveen ulkoryhmä (Vandamme 2009), joka on tutkittavien taksonien lähisukulainen, mieluiten sisaryhmä. Tutkimuksen kohteena olevien taksonien muodostamaa ryhmää kutsutaan vastaavasti sisäryhmäksi. Juurellisesta puusta voidaan lukea ajan etenemissuunta. Lisäksi ulkoryhmävertailun avulla määritetään kunkin tuntomerkin muutoksen suunta puussa (Vandamme 2009).

1.3.3 Evoluutiomallit

Evoluutiomalleja käytetään molekyyli-systematiikassa DNA-sekvenssievoluution matemaattiseen mallintamiseen. Ne määrittävät, kuinka yleisinä eli todennäköisinä kutakin emäsubstituutiota, emäksen korvautumista toisella, pidetään. Emästen esiintymistäajuudet vaihtelevat eliöiden genomeissa ja transitiot ovat transversioita tavallisempia (Tamura & Nei 1993). Evoluutiomalleja onkin pyritty kehittämään joustavammiksi vaihtelevien emäsfrekvenssien ja substituutiodennäköisyyksien suhteen.

Nykyisin käytetyin DNA-evoluutiomalli on GTR (general time reversible; Lanave ym. 1984), joka sallii paitsi transitioiden ja transversioiden todennäköisyyden vaihtelun ja vaihtelevat emäsfrekvenssit, myös yksilölliset substituutiodennäköisyydet jokaisen kahden emäksen välillä. GTR-mallissa substituutiodennäköisyydet ovat kuitenkin symmetrisiä eli muutos adeniinista tymiiniksi yhtä todennäköinen kuin tymiinistä adeniiniksi (Felsenstein 2004). Useimmat evoluutiomallit saa johdettua GTR-mallista asetuksia muuttamalla.

1.3.4 Sekvenssirinnastukset

Fylogeneettiset analyysit perustuvat tuntomerkkien ilmenemismuotojen vertailuun tutkittavien lajien välillä. Vertailu on mielekästä vain, mikäli se koskee jokaisella tutkittavalla lajilla samaa tuntomerkkiä. Molekyylifylogeneettisten analyysien pohjana on usein rinnastettu eli linjattu sekvenssitiedosto, jossa putatiivisesti homologiset emäkset ovat kohdakkain – näin niiden ilmenemismuotojen vertailu on mahdollista. Tavoitteena on järjestää sekvenssit riveittäin siten, että ilmenemismuodoltaan samanlaiset tuntomerkit (emäkset) osuvat samoihin sarakkeisiin (Tuimala 2005). Kun rinnastuksessa kohdakkain asettuvat emäkset eivät täsmää tietyssä kohdassa, vaihtoehtoina on jättää rinnastukseen huti tai avata kyseiseen kohtaan aukko (Tuimala 2005). Hudit tulkitaan emässubstituutioiksi, kun taas aukot merkitsevät rinnastuksessa insertioita ja deleetioita. Optimaalisessa rinnastuksessa hutien ja aukkojen määrä on minimoitu. Sekvenssien samanlaisuusaste ilmoitetaan esimerkiksi osumien prosenttiosuutena (Tuimala 2005).

Yksinkertaisin sekvenssirinnastustyyppi on kahden sekvenssin rinnastus (engl. pairwise alignment). Usean sekvenssin rinnastuksessa (engl. multiple sequence alignment) optimaalisen ratkaisun löytäminen on huomattavasti monimutkaisempaa (Wang & Jiang 1994) ja siihen on kehitetty monia strategioita. Esimerkiksi MUSCLE-ohjelma (Edgar 2004) tekee ensin kahden sekvenssin rinnastukset kaikille sekvenssipareille. Parittaisten samankaltaisuusarvojen pohjalta rakennetaan mallipuu, jonka osoittamassa järjestyksessä sekvenssit lisätään rinnastukseen. Ohjelma korjaa alkuperäisiä kahden sekvenssin rinnastuksia etsiessään optimaalista usean sekvenssin rinnastusta, jolloin tulos ei riipu alkuperäisten rinnastusten onnistumisesta.

1.4 Fylogeneettiset analyysimenetelmät

Fylogeneettisten analyysimenetelmien tavoitteena on rakentaa aineistoon perustuvia fylogeniapuita ja löytää puuavaruudesta optimaalisin puu. Eri menetelmät eroavat toisistaan sen suhteen, miten nämä kaksi tehtävää suoritetaan. Parsimoniamenetelmässä, suurimmassa uskottavuudessa ja bayesiläisessä menetelmässä sovelletaan optimaalisuuskriteeriä, joka määrittelee optimaalisen puun ominaisuudet (Tuimala 2005). Sitä vastoin etäisyysmenetelmät perustuvat kullekin näyteparille lasketuille

parittaisille etäisyyksille (Felsenstein 2004), eikä varsinaista optimaalisuuskriteeriä käytetä.

Pieneen aineistoon perustuvien puiden joukosta voidaan etsiä optimaalinen puu täydellisellä eli eksaktilla haulla, jossa käydään läpi kaikki puuvaihtoehdot. Optimaalisen puun löytäminen kooltaan tyypilliselle fylogeneettiselle aineistolle on kuitenkin erittäin vaikea laskutehtävä, jota kutsutaan laskettavuusteoriassa NP-täydelliseksi ongelmaksi (Graham & Foulds 1982). On epävarmaa, onko näin vaikean laskutehtävän ratkaiseminen polynomiajassa mahdollista edes tietokoneiden kehittyessä (P=NP? -ongelma; Fortnow 2009). Tämän vuoksi fylogeneettisissä analyyseissä käytetään tavallisesti heuristisia menetelmiä, jotka rajaavat puuavaruudesta kiinnostavimmat puut ja etsivät parasta puuta niiden joukosta. Heurististen menetelmien käyttö ei takaa parhaiden puiden löytymistä kaikkien mahdollisten puiden joukosta, mutta ne keskittävät käytettävissä olevan laskutehon potentiaalisimpina pidettyihin puihin ajan säästämiseksi (Felsenstein 2004).

Sopivan fylogeneettisen analyysimenetelmän valinta riippuu aineiston luonteesta ja tutkimuskysymyksestä. Eri menetelmillä on myös omat kannattajansa ja vastustajansa. Julkaisuissa yleistyvä käytäntö on analysoida sama aineisto usealla fylogeneettisellä analyysimenetelmällä. Tässä tutkimuksessa aineiston analysoimiseen käytettiin parsimoniapohjaista menetelmää ja suurimman uskottavuuden menetelmää.

1.4.1 Parsimonia

Parsimoniamenetelmissä optimaalisena pidetään lyhintä analyysin tuottamaa fylogeniapuuta, joka selittää aineiston pienimmällä mahdollisella määrällä evolutiivisia muutoksia. Tarkoituksena on minimoida puuta tukevien ad hoc -oletusten, eli homoplasian, määrä (Schuh 2000). Parsimonia ei ole itsessään menetelmä puiden rakentamiseen, vaan optimaalisuuskriteeri, jonka perusteella optimaalinen puu valitaan. Parsimonian on nähty sisältyvän Hennigin periaatteeseen (engl. auxiliary principle; Hennig 1950; Hennig 1966) jonka mukaan homologian tulisi olla oletusarvo, mikäli tätä vastaan ei ole todisteita (Schuh 2000). Ensimmäisen parsimoniapohjaisen analyysimenetelmän kehittivät Edwards ja Cavalli-Sforza (1963; 1964).

Kladistiikan periaatteiden mukaisesti parsimonia-analyysissä huomioidaan vain synapomorfiat. Kun tuntomerkit ovat keskenään ristiriidassa, puuhun jää homoplasioita. Parsimonisimmassa puussa on vähiten muutoksia kaikki tuntomerkit huomioiden. Puu rakennetaan aineiston pohjalta joko Hennigin argumentaatiolla (Hennig 1966) tai Wagnerin menetelmällä (Kluge & Farris 1969; Farris 1970; Tuimala 2005). Hennigin argumentaatiossa lähtökohtana on sisäryhmien ja ulkoryhmän muodostama ratkaisematon puu. Tuntomerkkien ilmenemismuodot lisätään puuhun tuntomerkki kerrallaan ja lajit ryhmitellään synapomorfioiden perusteella (ElMaraghy ym. 2008). Tässä tutkimuksessa käytettiin Wagnerin menetelmää, jossa jokainen taksoni sijoitetaan puuhun vuoron perään siten, että puun pituus kasvaa mahdollisimman vähän (Tuimala 2005).

Parsimoniamenetelmissä evoluutiomallia vastaa optimaalisuuskriteeri, joka määrittelee, miten monta askelta ilmenemismuotojen muutoksiin sisältyy – tämä perustuu arvioon kunkin substituution todennäköisyydestä. Tässä tutkimuksessa parsimonia-analyysi tehtiin TNT-ohjelmalla (Goloboff ym. 2008), jossa sekvenssiaineistoihin käytetään oletusasetuksena Fitchin (1971) optimaalisuuskriteeriä. Sen mukaan kaikki emässubstituutiot tietyistä emäksestä toiseen ovat mahdollisia (Felsenstein 2004).

Parsimoniamenetelmien filosofinen pohja perustuu Occamin partaveitsenä tunnetulle ohjenuoralle. Evoluutio ei välttämättä etene mahdollisimman yksinkertaisesti, mutta ad hoc -oletusten minimoiminen helpottaa hypoteesien testaamista. Parsimoniamenetelmien heikkoutena on ns. long branch attraction eli taipumus ryhmitellä virheellisesti yhteen kehityslinjoja, joissa on tapahtunut paljon evolutiivista muutosta (Felsenstein 1978).

1.4.2 Suurin uskottavuus

Suurimman uskottavuuden menetelmässä (engl. maximum likelihood) maksimoidaan aineiston todennäköisyys tietyn evoluutiomallin vallitessa, kun lopputuloksena on tietty puu. Intuitiivisesti ajatellen menetelmässä etsitään puuta, joka sopii parhaiten yhteen aineiston kanssa. Suurimman uskottavuuden tilastollisena menetelmänä popularisoi Ronald Fisher (Fisher 1912; Fisher 1921; Fisher 1922) ja ensimmäisen fylogeneettisen sovelluksen menetelmälle kehittivät hänen oppilaansa Edwards ja Cavalli-Sforza (Edwards & Cavalli-Sforza 1963; Edwards & Cavalli-Sforza 1964; Cavalli-Sforza &

Edwards 1967). Suurinta uskottavuutta sovelletaan nykyisin erityisesti molekyyliaineistolle, minkä on mahdollistanut tehokkaan molekyyliaineistolle suunnatun laskentatavan (Felsenstein 1981) kehittäminen.

Suurimmassa uskottavuudessa oletetaan, että tuntomerkit ja kehityslinjat kehittyvät toisistaan riippumatta (Felsenstein 2004). Aineistona on aineistomatriisi, esimerkiksi sekvenssirinnastus. Tämän lisäksi tarvitaan evoluutiomalli, joka kertoo erityyppisten emässubstituutioiden todennäköisyyden. Yksi yleisimmin käytetyistä evoluutiomalleista on GTR + Γ , jossa lokusten välinen mutaatiotodennäköisyys noudattaa gammajakaumaa. Analyysin lähtökohtana on yleensä juureton puutopologia, jota pidetään analyysissä todellisena kuvauksena lajien sukulaisuussuhteista. Aloituspuu voidaan muodostaa esimerkiksi parsimoniapohjaisella puunrakennusmenetelmällä tai lisäämällä sekvenssit puuhun siten, että sen uskottavuus maksimoituu (Tuimala 2005).

Koska tuntomerkkien oletetaan kehittyvän toisistaan riippumatta, uskottavuus lasketaan erikseen jokaiselle sekvenssirinnastuksen lokukselle (engl. site). Koko puun uskottavuus lasketaan kaikkien lokusten uskottavuuksien tulona (Felsenstein 2004). Suurimman uskottavuuden menetelmässä optimaalisin on puu, joka maksimoi aineiston uskottavuuden. Suurimman uskottavuuden luotettavuus menetelmänä riippuu evoluutiomallin oikeasta valinnasta (Felsenstein 2004).

1.4.3 Uudelleenjärjestelymenetelmät

Fylogeneettisten analyysimenetelmien tavoitteena on löytää puuavaruudesta kaikkein optimaalisin puu, globaali optimi. Heuristisia menetelmiä käytettäessä voidaan puuavaruudessa päätyä myös paikalliseen optimiin, puuhun, joka ei ole enää käytössä olevalla etsintämenetelmällä parannettavissa. Siksi parsimoniamenetelmien ja suurimman uskottavuuden menetelmän tukena käytetään uudelleenjärjestelymenetelmiä, jotka pyrkivät estämään haun pysähtymisen paikallisiin optimeihin (kts. esim. Felsenstein 2004).

1.4.4 Fylogenen luotettavuuden arviointi

Kun fylogeneettisten analyysimenetelmien avulla on löydetty optimaalisin puu, on vielä arvioitava, miten hyvin se kuvastaa aineistoa ja siten sukulaisuussuhteita taksonien

välillä. Tähän tarkoitukseen käytetään uudelleenotantamenetelmiä. Niissä aineistosta tehdään määrätynlainen otanta, jossa painotetaan satunnaisesti eri tuntomerkkejä. Otannan pohjalta luodaan puu, joka on estimaatti todellisesta fylogeniasta. Toimenpide toistetaan monta kertaa uusilla otannoilla, jolloin tulokseksi saadaan sarja toisistaan eroavia puita. Estimaattipuita verrataan keskenään, jolloin saadaan selville niiden välinen hajonta. Tulokseksi saadaan estimaattipuissa useimmin esiintyneille ryhmille tuki-arvoja.

Tavallisimmin käytettyjä uudelleenotantamenetelmiä ovat jackknife ja bootstrap. Jackknife-menetelmässä (Quenouille 1949; Quenouille 1956) alkuperäisestä aineistosta poistetaan kerrallaan yksi tuntomerkki. Näin muodostettujen estimaattipuiden välinen hajonta jää pieneksi. Hajonnan kasvattamiseksi on kehitetty vaihtoehtoisia jackknife-menetelmiä, joissa pois pudotettavien tuntomerkkien määrä on suurempi. Esimerkiksi parsimonia-jackknife -menetelmässä (Farris ym. 1996) pois jätettyjen emästen osuus on e^{-1} . Bootstrap-menetelmässä (Efron 1979) otanta koostuu alkuperäisen kokoisesta aineistosta, joka on muodostettu poimimalla siihen alkuperäisestä aineistosta tuntomerkkejä satunnaistetusti. Toisin kuin jackknife-menetelmässä, tietty tuntomerkki voi esiintyä otannassa useammin kuin kerran tai jäädä kokonaan pois.

1.4.5 Konsensuspuut

Fylogeneettisissä analyyseissä löydettyjä yhtä optimaalisia puita on usein enemmän kuin yksi. Tällöin puut yhdistetään konsensuspuuksi, jossa esiintyy niille yhteisiä ryhmiä. Konsensuspuut eroavat sallivuutensa suhteen. Tulokset voidaan esittää esimerkiksi tiukkana konsensuspuuna (engl. strict consensus), jossa on ainoastaan ryhmiä, jotka esiintyvät kaikissa konsensuspuun lähtökohtana olevissa puissa (Felsenstein 2004). Majority rule -konsensuspuut puolestaan koostuvat ryhmistä, jotka esiintyvät yli 50 prosentissa lähtökohtana olevista puista (Felsenstein 2004).

On syytä huomauttaa, että lopullinen totuus eliöryhmien kehityshistoriasta jää aina jossakin määrin hämärän peittoon. Tutkimuksen tehtävänä on muodostaa hypoteesi, joka perustuu mahdollisimman vankkaan näyttöön ja jota voidaan pitää perustelluimpana käsityksenä todellisesta lajiutumisen järjestyksestä.

1.5 DNA-viivakoodaus

Morfologia on fylogeneettisten analyysien lisäksi ollut pitkään johtava tai jopa ainoa lajintunnistuksessa käytettävä kriteeri. Myös lajintuntemuksessa morfologian käytön ongelmana ovat kryptiset lajit ja erityisasiantuntemuksen tarve. Elinympäristöjen tuhoutumisesta johtuva lajien häviäminen on lisännyt tarvetta kehittää entistä nopeampia lajintunnistusmenetelmiä. DNA-viivakoodaus (Hebert ym. 2003a) pyrkii vastaamaan tähän tarpeeseen. Menetelmässä vertaillaan tietyn geenialueen sekvenssejä laskemalla niille parittainen etäisyys, eli toisistaan eroavien emästen prosenttiosuus. Mikäli sekvenssit ovat riittävän samanlaiset, yksilöiden katsotaan kuuluvan samaan lajiin. Menetelmässä käytettäväksi geenialueeksi on eläimillä vakiintunut sytokromioksidaasi I eli *COI* (Hebert ym. 2003b). Pyrkimyksenä on kehittää DNA-viivakoodauksesta menetelmä, jossa näytekysilön lajinmääritys voitaisiin tehdä vertaamalla sen *COI*-sekvenssiä tietokantoihin varastoituun sekvenssiaineistoon.

DNA-viivakoodauksen toimivuuden teoreettisena ehtona on, että *COI*-sekvenssin parittaiset etäisyydet ovat suurempia lajien välillä kuin lajien sisällä (Hebert ym. 2003a; Hebert ym. 2003b). Ehdon toteutumista juoksujalkaisilla on tarkasteltu yksittäisissä tutkimuksissa (Spelda ym. 2011; Siriwut ym. 2016; Wesener ym. 2016), joissa lajien väliset etäisyydet ovat olleet korkeita, mutta osa lajinsisäisistä parittaisista etäisyyksistä on ollut myös yllättävän suuria. Tässä tutkimuksessa selvitettiin *S. morsitans* -lajin lajinsisäisen geneettisen muuntelun astetta myös *COI*-sekvenssin suhteen, minkä vuoksi tulosten perustella voidaan ottaa kantaa viivakoodauksen luotettavuuteen *S. morsitans* -lajin lajintunnistuksessa ja yleisimminkin *Scolopendra*-lajien erottamisessa toisistaan.

1.6 Tuhatjalkaiset

Tuhatjalkaiset (alajakso Myriapoda) ovat pitkänomaisia ja moniraajaisia maaniveljalkaisia, joiden ruumis on muodostunut peräkkäin toistuvista jaokkeista. Ryhmä on evolutiivisesti hyvin vanhaa perua. Ensimmäiset suurikokoiset tuhatjalkaiset nousivat maalle siluurikauden keskivaiheeseen mennessä (Shear & Edgecombe 2010), mikä tekee niistä varhaisimpia maaniveljalkaisia. Kyky hengittää ilmaa ja kemiallisen puolustuskeinon käyttö ovat nykyisin laajalle eläinkuntaan levinneitä evolutiivisia innovaatioita, joiden varhaisimmat merkit on löydetty tuhatjalkaisten kehityslinjaan kuuluvista fossiileista (Wilson & Anderson 2004; Wilson 2006). Elintavoiltaan

tuhatjalkaiset ovat piilottelevia. Suurin osa lajeista elää kosteassa maaperässä hajottaen ravinnokseen kuolleita kasvinosia, mutta joukossa on myös petoja.

Laajat molekyylogeneettiset tutkimukset tukevat tuhatjalkaisten alajakson monofyleettisyyttä (Regier ym. 2010; Rota-Stabelli ym. 2011). Lisäksi morfologisista tuntomerkeistä tuhatjalkaisten monofyleettisyyttä tukee erityisesti pään sisäisen tukirangan rakenne (Koch 2003; Edgecombe 2011). Tuhatjalkaisten evolutiivisia sukulaisuussuhteita muihin niveljalkaisiin on tutkittu pitkään. Vankin tutkimusnäyttö tukee Mandibulata-hypoteesia, jonka mukaan tuhatjalkaisten lähimpiä sukulaisia ovat äyriäiset ja kuusijalkaiset (Regier ym. 2010; Rota-Stabelli ym. 2011; Legg ym. 2013).

Tuhatjalkaislajeja on kuvattu tieteelle noin 16500 (Sombke & Edgecombe 2014). Todellisen lajimäärän arviointi on vaikeaa, sillä osa lajeista on saatettu kuvata useita kertoja. Tuhatjalkaisten lajirikkaus on joka tapauksessa merkittävästi pienempi kuin esimerkiksi hyönteisillä tai hämähäkeillä. Nykyisin elossa olevat tuhatjalkaislajit jaetaan neljään luokkaan: harvajalkaisiin (Pauropoda), juoksujalkaisiin (Chilopoda), kaksoisjalkaisiin (Diplopoda) sekä sokkojuoksiaisiin (Symphyla).

1.7 Juoksujalkaiset

Vanhimmat juoksujalkaisten (luokka Chilopoda) fossiilit ovat peräisin siluurikauden lopulta 418 miljoona vuotta sitten (Edgecombe & Giribet 2007). Juoksujalkaisten fossiiliaineistossa on merkittäviä aukkoja, sillä niiden elintavat ja anatomia eivät suosi fossiloitumista (Shear & Bonamo 1988). Tunnetut juoksujalkaisfossiilit muistuttavat kuitenkin rakenteeltaan varsin paljon nykyisin eläviä juoksujalkaisia (Shear & Bonamo 1988; Shear ym. 1998). Tieteellisessä luokittelussa juoksujalkaiset jaetaan noin 400 sukuun ja noin 3150 validiin lajiin (Minelli 2011b).

Juoksujalkaisten aikuispituus on 4 - 300 mm, joskin suurin osa lajeista on aikuispituudeltaan 10 - 100 mm (Edgecombe & Giribet 2007). Juoksujalkaisen ruumis koostuu peräkkäisistä jaokkeista kuten muidenkin tuhatjalkaisten. Tyypilliseen ruumiinrakenteeseen kuuluu kuusi pääjaoketta, vaihteleva määrä vartalojaokkeita ja kaksi genitaalijaoketta (Edgecombe & Giribet 2007). Vartalojaoketta peittää kaksi sarveislevyä: selkäpuolella selkäkilpi I. tergiitti ja vatsapuolella vatsakilpi I. sterniitti (Lewis 1981). Kussakin vartalojaokkeessa on lisäksi yksi raajapari - tämä erotuksena

kaksoisjalkaisiin, joilla on vartalojoakkeissaan kaksi raajaparia. Aikuisilla yksilöillä on lajista riippuen 15 - 191 raajaparia (Edgecombe & Giribet 2007), aina pariton määrä (Minelli 2011b). Poikkeuksena säännöstä *Strigamia maritima* -lajilta (Leach 1817) on kuvattu yksilö, jolla on viimeisen raajaparin kahdentuman vuoksi 48 raajaparia (Kettle ym. 1999). Juoksujalkaisilla ei ole muodonvaihdosta (Lewis 1981). Sen sijaan nuoret juoksujalkaisyksilöt kasvavat nahanluontien yhteydessä. Usein juoksujalkainen myös syö luomansa nahan.

Lähes kaikki juoksujalkaislajit ovat petoja (Minelli 2011b). Juoksujalkaisten merkillepantavimpia anatomisia synapomorfoita ovatkin ensimmäisessä vartalojoakkeessa sijaitsevat myrkkyleuat (lat. forcipulae), jotka ovat kehittyneet ensimmäisestä raajaparista (Lewis 1981). Saalistaessaan juoksujalkainen tarttuu saaliseläimeen myrkkyleuoillaan ja ruiskuttaa niiden avulla uhriinsa neurotoksista myrkyä, jota erittyy myrkkyleukojen sisällä sijaitsevista rauhasista (Lewis 1981). Suurin osa lajeista saalista niveljalkaisia, mutta suurikokoisimpien lajien ruokavalioon kuuluu myös selkärankaisia, kuten pikkunisäkkäitä ja liskoja (Lewis 1981; Molinari ym. 2005; Edgecombe & Giribet 2007). Useimmat juoksujalkaislajit ovat yöaktiivisia ja elävät muiden tuhatjalkaisten tavoin maaperässä ja karikkeessa (Voigtländer 2011). Kuitenkin tietyt lajit viihtyvät myös ääriolosuhteissa, kuten luolissa, littoraalivyöhykkeellä ja aavikoilla (Edgecombe & Giribet 2007; Voigtländer 2011).

Juoksujalkaisia esiintyy kaikilla mantereilla Antarktista lukuun ottamatta (Bonato & Zapparoli 2011). Lajirikkaus on suurinta subtrooppisella ja lauhkealla vyöhykkeellä (Bonato & Zapparoli 2011). Monilla juoksujalkaislajeilla luontainen esiintymisalue on suhteellisen rajoittunut ja heijastaa lajin kehityshistoriaa, minkä vuoksi nämä lajit soveltuvat eliömaantieteellisen tutkimustyön kohteeksi (Edgecombe & Giribet 2007). Osa juoksujalkaislajeista on synantrooppeja, jotka viihtyvät erityisen hyvin ihmisen luomissa ympäristöissä – tästä esimerkkinä rakennuksiin hakeutuva hämähäkkijuoksijainen, *Scutigera coleoptrata* Linnaeus (1758). Ihmisten tiedetään myös levittäneen joitakin juoksujalkaislajeja uusille esiintymisalueille (Shelley ym. 2005). Juoksujalkaisiin kuuluu viimeisimmän arvion mukaan 3204 validia lajia (Bonato ym. 2016). Nykyisin elossa olevat lajit jaetaan viiteen lahkoon: Scutigermorpha, Lithobiomorpha, Craterostigmomorpha, Geophilomorpha ja Scolopendromorpha. Kuudes lahko, Devonobiomorpha, on kuvattu fossiiliaineiston perusteella ja sen ainoa tunnettu laji on sukupuuttoon kuollut *Devonobius delta* (Shear & Bonamo 1988).

Juoksujalkaislahkojen välillä on kiinnostavia anatomiaan, yksilönkehitykseen ja käyttäytymispiirteisiin liittyviä eroja. Geophilomorpha- ja Scolopendromorpha-lahkojen lajeilla on lopullinen määrä ruumiinjaokkeita heti kuoriuduttuaan, mitä kutsutaan epimorfoosiksi (Minelli & Sombke 2011). Sitä vastoin hemianamorfoosia ilmentävillä Scutigermorpha-, Lithobiomorpha- ja Craterostigmomorpha-lahkoilla ruumiinjaokkeiden määrä kasvaa ensimmäisten nahanluontien yhteydessä (Minelli & Sombke 2011). Raajaparien lukumäärä on konservoitunut Scutigermorpha-, Lithobiomorpha- ja Craterostigmomorpha-lahkojen sisällä (15 raajaparia), mutta se vaihtelee Scolopendromorpha-lahkon (21 tai 23 raajaparia) ja Geophilomorpha-lahkon (27 - 191 raajaparia) sisällä (Edgecombe & Giribet 2007). Näkökyky sekä silmien määrä ja rakenne vaihtelevat juoksujalkaislahkojen välillä, mutta myös niiden sisällä (Vahtera ym. 2012a). Vain Craterostigmomorpha-, Geophilomorpha- ja Scolopendromorpha-lahkoihin kuuluvien lajien naaraat huolehtivat munistaan ja poikasistaan (Minelli 2011a).

1.8 Scolopendromorpha-lahko

Scolopendromorpha-lahkoon kuuluvat juoksujalkaiset ovat litteitä ja väritykseltään vaihtelevia (Bonato ym. 2011). Lahkon sisällä aikuispituus on vaihteleva, 9 - 300 mm (Bonato ym. 2011), mutta suurin osa lajeista on kooltaan suuria tai suurehkoja. Elintavoiltaan lajit ovat aggressiivisiä ja nopealiikkeisiä petoja. Naarasyksilöt suojelevat muniaan ja poikasiaan kiertymällä kerälle niiden ympäri (Bonato ym. 2011; Stojanovic ym. 2015). Scolopendromorpha-lahkon esiintymisalue painottuu trooppiselta vyöhykkeeltä subtrooppiselle vyöhykkeelle (Bonato ym. 2011). Vanhimmat lahkoon luokiteltavat fossiilit ovat peräisin paleotsooiselta maailmankaudelta (Scudder 1890; Mundel 1979). Lahkoon kuuluu noin 700 lajia (Bonato ym. 2011).

Scolopendromorpha-lahkoa koskevat fylogeneettiset tutkimukset ovat viime vuosiin asti perustuneet morfologisiin tuntomerkkeihin (Edgecombe & Koch 2008; Koch ym. 2009; Vahtera ym. 2012b). Morfologia-aineistoihin perustuva näyttö ole yksinään riittänyt ratkaisemaan lahkon sisäisiä sukulaisuussuhteita, jotka ovat pysyneet pitkään epäselvinä. Scolopendromorpha-lahkon fylogeniasta on saatu viime vuosina lisäselvyyttä tutkimuksissa, jotka hyödyntävät molekyyliomenetelmiä joko yksinään (Joshi & Karanth 2011) tai yhdistettynä morfologia-aineistoon (Vahtera ym. 2012a;

Vahtera ym. 2013). Lahkon sisäiset sukulaisuussuhteet tunnetaan tällä hetkellä melko hyvin heimotasolla ja joidenkin heimojen sisällä (Siriwut ym. 2016). Seuraavana tavoitteena on selvittää heimotasoa alempien taksonien keskinäisiä sukulaisuussuhteita.

Nykyisen tieteellisen luokituksen (Bonato ym. 2016) mukaan Scolopendromorpha-lahkoon kuuluu viisi heimoa: Cryptopidae, Scolopocryptopidae, Scolopendridae, Mimopidae ja Plutoniumidae. Lahkon tieteellinen luokittelu on perinteisesti perustunut morfologisille piirteille (Attems 1930), joista tärkeimpiä ovat ruumiinjaokkeiden lukumäärä ja pistesilmien lukumäärä. Scolopocryptopidae-heimon lajeilla on 23 raajaparia ja muiden heimojen lajeilla 21 (Edgecombe & Giribet 2007). Kiinnostava poikkeus säännöstä on Brasiliasta vuonna 2010 löydetty *Scolopendropsis duplicata* -laji (Chagas-Junior ym. 2008), jolla on joko 39 tai 43 raajaparia. Scolopendromorpha-lahkon juoksujalkaisilla on joko yksi pistesilmä, neljä pistesilmää tai silmät puuttuvat kokonaan (Bonato ym. 2011). Hengityspotken aukkojen rakennetta ja sijaintia on käytetty tuntomerkkeinä lahkon systematiikan tutkimisessa (Vahtera ym. 2012b).

Scolopendridae-heimoon (Leach 1814) kuuluvilla lajeilla on 21 jalkaparia, yleensä neljä pistesilmää ja tyypillinen sukaskarvoitus tuntosarvissaan, suun alueella, myrkkyleukojen tyvessä ja jaloissa (Bonato ym. 2011). Heimoon kuuluu 21 sukua ja yli 400 lajia, joiden levinneisyys painottuu tropiikkiin (Bonato ym. 2011). Scolopendridae-heimo on todettu monofyleettiseksi molekyyliomenetelmien avulla (Edgecombe & Giribet 2004; Joshi & Karanth 2011), mutta heimon sisällä lajien ja jopa sukujen väliset sukulaisuussuhteet ovat jääneet epäselviksi riittämättömästä taksonomisesta otannasta johtuen. Scolopendridae-heimo jaetaan edelleen kahteen alaheimoon ja viiteen sukuryhmään (Bonato ym. 2011).

Alaheimoon Scolopendrinae (Leach 1814) kuuluu 12 sukua ja yli 220 lajia (Bonato ym. 2011). Alaheimo eroaa muista alaheimoista hengityspotken aukkojen rakenteen, vartalojaokkeiden vatsapuolella olevien saumojen anatomian ja lihasmahan poimuissa sijaitsevien väkästen suhteen (Bonato ym. 2011).

Scolopendra-sukuun (Linnaeus 1758) kuuluu noin 90 lajia (Bonato ym. 2011). Muista samaan heimoon kuuluvista suvuista *Scolopendra* eroaa hengityspotken aukkojen ja raajojen anatomian suhteen ja lisäksi pään sarveislevy ulottuu yleensä ensimmäisen vartalojaokkeen päälle (Lewis 2010; Bonato ym. 2011). Suvun lajeja tavataan ympäri

maailmaa trooppisilla ja subtrooppisilla alueilla (Bonato ym. 2011). Aikuispituus vaihtelee välillä 23 - 275 mm (Bonato ym. 2011). Suvun lajeista suurikokoisin on Etelä-Amerikassa elävä *Scolopendra gigantea* Linnaeus (1758), joka pyydystää ruoakseen ohitse lentäviä lepakoita luolan kattoon ripustautuneena (Molinari ym. 2005).

1.9 Scolopendra morsitans

1.9.1 Tuntomerkit, elintavat ja levinneisyys

Scolopendra morsitans (Linnaeus 1758) on sukunsa tyyppilaji, joka on antanut nimen *Scolopendra*-suvulle ja koko Scolopendromorpha-lahkolle (lat. scolopendra, monijalkainen). Laji on lahkonsa jäseneksi keskikokoinen tai suurehko – australialaisessa aineistossa pituus oli 8,5 - 12,7 cm (Koch 1983). Selkäkilven takareuna on yleensä musta (kuva 1), mutta muutoin väritys vaihtelee huomattavasti populaation sisälläkin rusehtavasta punaiseen ja tummanvihreästä violettiin (Lewis ym. 2010). Lajin ruokavalioon kuuluu niin maaselkärangattomia kuin pienikokoisia selkärangaskäsiäkin. Puremiskykynsä mukaan nimetyn lajin (lat. morsitans, pureva) purema on kivulias, mutta aiheuttaa ihmisille lähinnä paikallisoireita (Lewis ym. 2010). Laji viihtyy myös ihmisasutuksen läheisyydessä.

DNA-aineiston perusteella laji on hyvin vanhaa alkuperää ja sen alkukoti saattaa olla Intian niemimaalla (Joshi & Karanth 2011). Lajin levinneisyysalue on erittäin laaja – sitä tavataan eri puolilla Afrikan mannerta, eteläisessä Aasiassa, Oseaniassa ja Australiassa (Shelley ym. 2005). *S. morsitans* -lajia on tavattu myös Uudessa maailmassa, Karibiassa, Meksikossa, Floridassa ja Havaijilla, missä se on suurella todennäköisyydellä ihmistoiminnan mukanaan tuoma vieraslaji (Shelley ym. 2005).



Kuva 1. Suomesta löydetty *Scolopendra morsitans* -yksilö. Alkuperämaa tuntematon, todennäköisesti lemmikkikarkulainen. Kuva © Varpu Vahtera 2017.

1.9.2 Lajinmääritys

Scolopendra morsitans -lajin kuvasi tieteelle Carl von Linné (1758). Lajinkuvauksen yhteydessä Linné tallensi holotyypiksi yhden juoksujalkaisyksilön, joka on lajin ainoa tunnettu tyyppinäyte. Linnén lajikuvaus perustuu jalkojen, silmien, ruumiinjaokkeiden ja tuntosarviensa jaokkeiden määrään, jotka eivät nykyisellään riitä erottamaan *S. morsitans* -lajia lähisukulaisistaan. Viimeisimmässä Vanhan maailman *Scolopendra*-lajeja koskevassa laajassa määrittämissä (Lewis 2010) *S. morsitans* -lajin tuntomerkeiksi mainitaan raajojen tyvessä sijaitsevan lonkkakylkilevyn (engl. coxopleuron) huokosia sisältävä alue, joka ulottuu rakenteen takareunaan, sekä urosyksilöiden viimeinen raajapari, joka on selkäpuoleltaan litteä ja reunoiltaan turvonnut. Lewisin tuntomerkkien käyttöä vaikeuttaa se, että niiden tulkinta vaatii käytännössä asiantuntemusta luotettavan lajinmäärityksen varmistamiseksi.

Nykyisessä luokittelussa *Scolopendra morsitans* (Linnaeus 1758) -laji jaetaan kahteen alalajiin: *S. morsitans morsitans* (Linnaeus 1758) ja *S. morsitans coerulescens* (Cragin 1885). *S. morsitans coerulescens* -alalajista tiedetään erittäin vähän, eikä siitä tiedetä säilyneen holotyyppiä tai anatomiaa valottavaa kuvitusta (Gregory Edgecombe, henkilökohtainen tiedonanto). Tämänhetkisen tiedon valossa alalajin olemassaoloa ei voida sen enempää vahvistaa kuin kumotakaan. Shelley (2006) mukaan alalajin kuvaus

saattaa perustua nuoreen *S. morsitans morsitans* -yksilöön. Chilobase 2.0 -tietokannan (Bonato ym. 2016) mukaan kyseessä saattaa myös olla nuorempi synonyymi aiemmin kuvatuille Uuden maailman *Scolopendra*-lajeille *S. viridis* (Say 1821), *S. heros* (Girard 1853) tai *S. polymorpha* (Wood 1861). Selkeyden vuoksi *S. morsitans morsitans* -alalajista käytetään tässä tutkielmassa nimeä *S. morsitans*.

Scolopendra morsitans -lajia pidetään morfologisesti monimuotoisena. Väritys vaihtelee voimakkaasti yksilöiden välillä, minkä lisäksi vaihtelua on tuntosarvien, myrkkyleukojen, selkäkilpien ja jalkojen piirteissä, joita on aiemmin käytetty lajin tuntomerkkeinä (Siriwut ym. 2016). Lajiin on monimuotoisuuden ansiosta pitkään luokiteltu yksilöitä, jotka eivät ole sopineet muiden *Scolopendra*-lajien lajikuvauksiin. Sitten *S. morsitans* -lajiin kuuluvaksi määritettyjen näytteiden pohjalta onkin kuvattu toistuvasti uusia lajeja ja alalajeja. Chilobase 2.0 -juoksujalkaistietokanta (Bonato ym. 2016) listaa lajille yhteensä 51 synonyymia. Niistä 45 on nuorempia synonyymejä (engl. junior synonym) – lajinimiä, jotka on annettu *S. morsitans* -lajille Linnén alkuperäisen lajinkuvauksen (Linnaeus 1758) jälkeen vuosina 1840 - 1977 eri tutkijoiden toimesta. Nimeämiskäytännöissä noudatettavan ensisijaisuussäännön mukaisesti synonyymeistä vanhin, *S. morsitans*, on validi lajinimi. Loput kuusi Chilobase 2.0 -tietokannassa (Bonato ym. 2016) lueteltua synonyymia ovat *S. morsitans* -lajille kuvattuja alalajeja, jotka on myöhemmin synonymisoitu *S. morsitans morsitans* -alalajin kanssa.

Oman lisänsä *S. morsitans* -lajin nimistöongelmiin tuo Lontoossa säilytettävä holotyypin, jonka lajinmäärittäminen ja keräyspaikka ovat epäselviä (Gregory Edgecombe, henkilökohtainen tiedonanto). Holotyypin viimeisen jalkaparin tyvässä (prefemur) on alapuolella kaksi piikkiriviä (Gregory Edgecombe, henkilökohtainen tiedonanto), kun taas nykyisin tunnetuilla *S. morsitans* -lajin yksilöillä piikkirivejä on kolme (Siriwut ym. 2016). Gregory Edgecomben (henkilökohtainen tiedonanto) mukaan holotyyppi muistuttaa sen sijaan lajeja *Scolopendra dawydoffi*, *Scolopendra multidentis*, *Scolopendra cingulata* ja *Scolopendra japonica*, jotka muodostavat monofyleettisen ryhmän Kaakkois-Aasian *Scolopendra*-lajeja kartoittavassa molekyylyfylogeneettisessä tutkimuksessa (Siriwut ym. 2016). Holotyypin tutkimista vaikeuttaa sen huono kunto.

Ainoa holotyyppiin liitetty keräystieto on lajinkuvauksen yhteydessä oleva maininta lajin esiintymispaikasta: “Habitat in Indiis” (Linnaeus 1758). Fraasin on tulkittu

aiemmissä tutkimuksissa merkitsevän Intiaa (esim. Siritwut ym. 2016). 1700-luvulla käytettiin kuitenkin maantieteellisiä termejä (Etu-)Intia (nyk. Intian niemimaa), Itä-Intia (nyk. Kaakkois-Aasia) ja Länsi-Intia (nyk. Karibia), eikä ole tiedossa, mihin näistä (jos mihinkään) fraasilla viitataan. Koska holotyypin muistuttaa fenotyypiltään eniten Itä- ja Kaakkois-Aasiassa esiintyviä *Scolopendra*-lajeja, Kaakkois-Aasia saattaa olla vaihtoehtoisista keräyspaikoista todennäköisin (Gregory Edgecombe, henkilökohtainen tiedonanto).

1.9.3 Yksi laji vai lajikompleksi?

On perusteltua epäillä, että *Scolopendra morsitans* -nimen alla piilee kryptisiä lajeja, joita ei ole morfologian varassa pystytty tunnistamaan. Hypoteesin tueksi on esittänyt kolmenlaisia perusteita. Ensimmäinen peruste on lajin geneettinen monimuotoisuus, josta on saatu viitteitä kahdessa asiaa koskevassa tutkimuksessa. Intiasta kerättyjen Scolopendridae-heimon juoksujalkaisten molekyylyfylogeniassa (Joshi & Karanth 2011) kaikkien viiden *S. morsitans* -näytteen DNA-sekvenssit erosivat merkittävästi toisistaan, mikä saattaa kirjoittajien mukaan viitata siihen, että kyseessä on useista lajeista koostuva lajikompleksi. Kaakkois-Aasian *Scolopendra*-lajien DNA-sekvensseihin perustuvassa fylogeniassa (Siritwut ym. 2015a; Siritwut ym. 2016) seitsemän *S. morsitans* -yksilöä muodosti monofyleettisen ryhmän, joka jakautui edelleen kahteen maantieteellisesti erilliseen monofyleettiseen ryhmään. DNA-viivakoodauksen (Hebert ym. 2003b) mukaan yksilöiden välinen parittainen etäisyys oli 8,6 % (Siritwut ym. 2016), mitä voidaan pitää melko korkeana lajinsisäisenä muuntelun tasona. Koska laji on geneettisesti monimuotoinen ainakin kahden maantieteellisesti rajatun alueen sisällä, saattaa geneettinen monimuotoisuus koskea myös koko maailman *S. morsitans* -populaatiota.

Toiseksi, *S. morsitans* -lajin tiedetään olevan ilmiänsuhtaan hyvin monimuotoinen (Würmli 1975; Koch 1983; Lewis 2010; Siritwut ym. 2016). Suurin osa aiemmista morfologisista tutkimuksista on perustunut rajatuilta maantieteellisistä alueilta kerättyyn aineistoon. Onkin toistaiseksi epäselvää, miten morfologinen muuntelu jakautuu maantieteellisesti. Kaakkoisaasialaisessa aineistossa havaittiin kuitenkin kaksi maantieteellisesti erillistä värimuotoa, jotka muodostivat fylogeniassa kaksi monofyleettistä ryhmää (Siritwut ym. 2015a). Kirjallisuudessa kuvattua muuntelun lisäksi Christian Kronmüllerin (henkilökohtainen tiedonanto) mukaan *S. morsitans* -

lajin koko ja väritys vaihtelevat maantieteellisten alueiden välillä. Afrikassa *S. morsitans* on keskikokoinen ja tyyppilliseltä väriykseltään mustaraidallinen; pää on punainen tai tummanruskea. Trooppisessa Kaakkois-Aasiassa laji on pienikokoinen ja väriykseltään rusehtava. Pakistanin ja Intian alueella fenotyyppi on suurikokoinen, pohjaväritään keltainen ja tummaraitainen. Monimuotoinen ilmiasu ei kerro suoraan lajiutumisen aiheuttamasta lisääntymisestä, mutta voi viitata siihen, että geneettistä eriytymistä on todella tapahtunut.

Kolmas peruste epäillä *S. morsitans* -lajia lajikompleksiksi on lajin elintavat ja -ympäristö, jotka antavat teoreettiset edellytykset lajiutumislle. Juoksujalkaiset elävät tavallisesti rajatulla alueella esimerkiksi karikkeessa, lahpuussa tai kivien alla. Lisäksi juoksujalkaisten leviämiskyky on selvästi heikompi kuin lentävillä tai uivilla eläimillä. Vaikka *S. morsitans* -lajin on dokumentoitu siirtyvän ihmisten mukana elinalueelta toiselle, useimmat yksilöt eivät leviä kauas synnyinseudultaan. Tämä pitää oletettavasti geenivirran melko vähäisenä kaukana toisistaan sijaitsevien populaatioiden välillä. Lajin levinneisyysalue on laaja, mikä luo suotuisat olosuhteet populaatioiden etäisyydestä johtuvaan geneettiseen eriytymiseen (isolation by distance).

1.10 *Scolopendra amazonica* – nuorempi synonyymi vai oma lajinsa?

Scolopendra morsitans amazonica (Bücherl 1946) kuvattiin alun perin *S. morsitans* -lajin alalajina ja sen tyyppinäyte on peräisin Brasiliasta (Bonato ym. 2016). Jangi (1959) nimesi ryhmän omaksi lajikseen nimeltä *S. amazonica*. Hänen mukaansa (Jangi 1955; 1959) Intiassa esiintyy kaksi *Scolopendra*-suvun lajia, joilla on samankaltainen fenotyyppi: *S. morsitans* ja *S. amazonica*. Lajit eroavat hänen mukaansa muun muassa väriyksen ja koon suhteen. Tärkeimpänä eroavaisuutena *S. amazonica* -lajilla on Jangin mukaan taaimmaisissa raajoissaan kannukset, jotka puuttuvat *S. morsitans* -lajilta (kts. myös Lewis 2010). Würmli (1975) tutki lajien aasialaisia ja australialaisia museonäytteitä ja havaitsi, että Jangin lajien erottamisessa käyttämät tuntomerkit yhdistyivät sattumanvaraisesti, eivätkä ne korreloineen maantieteellisen sijainnin kanssa. Tämän vuoksi hän synonymisoi lajit (Würmli 1975) ja *S. amazonica* on nykyluokituksessa virallisesti *S. morsitans* -lajin nuorempi synonyymi. Intialaiset tutkijat (Jangi & Dass 1984) pitävät kuitenkin *S. amazonica* -fenotyyppiä morfologisesti erillisenä lajinaan, joka esiintyy Intiassa *S. morsitans* -lajin rinnalla (Lewis 2010).

S. amazonica -fenotyypin ja *S. morsitans* -lajin DNA-sekvenssejä on verrattu keskenään yhdessä aiemmassa tutkimuksessa (Joshi & Karanth 2011), jonka Intiasta kerätty aineisto sisälsi viisi *S. morsitans* -yksilöä ja kaksi *S. amazonica* -yksilöä. *S. amazonica* -yksilöt sijoituivat bayesiläisessä fylogeniassa toistensa lähimmiksi sukulaisiksi, mutta sukulaisuussuhteelle ei saatu tukea (bootstrap-tukiarvo < 50, posterioritodennäköisyys < 0,5). *S. amazonica* -yksilöt muodostivat myös *S. morsitans* -yksilöiden kanssa monofyleettisen ryhmän (bootstrap-tukiarvo = 92, posterioritodennäköisyys = 1), jossa yksilöiden väliset oksapituudet olivat suuria. Tämän perusteella kirjoittajat pitävät todennäköisenä, että *S. amazonica* ja *S. morsitans* kuuluvat useista kryptisistä lajeista koostuvaan lajikompleksiin.

1.11 *Scolopendra antananarivoensis* – uusi laji vai *Scolopendra morsitans*?

Kronmüller (2010) kuvasi vuonna 2010 Madagaskarilta uuden juoksujalkaislajin nimeltä *Scolopendra antananarivoensis*. Koko lajinkuvaus perustuu morfologisiin tuntomerkkeihin. Väriltään vihertävä laji muistuttaa fenotyypiltään suuresti *Scolopendra morsitans* -lajia, minkä vuoksi Kronmüller arvioi lajien olevan lähisukulaisia. Lajinkuvauksessa mainitaan *S. antananarivoensis* -lajille kolme pääasiallista diagnostista tuntomerkkiä. 1) Viimeisen vartalojoakkeen lonkkakylkilevyssä oleva kartiomainen uloke (engl. coxopleural process) on *S. antananarivoensis* -lajilla ohuempi ja pidempi kuin *S. morsitans* -lajilla. 2) *S. antananarivoensis* -lajilla viimeisen raajaparin reisien vatsapuolella sijaitsevien piikkien tyvet ovat ”turvonneen näköisiä” toisin kuin *S. morsitans* -lajilla. 3) Viimeisen vatsakilven keskellä on pitkittäissuuntainen painauma, joka puuttuu *S. morsitans* -lajilta.

Kahden ensimmäisen tuntomerkin suhteen *S. antananarivoensis* - ja *S. morsitans* -lajien välinen ero on luonteeltaan laadullinen ja siksi jossain määrin tulkinnanvarainen. Mainittujen kolmen tuntomerkin lisäksi lajinkuvauksessa on lueteltu lajien erottamiseen erilaisia kvantitatiivisia anatomisia piirteitä, jotka ovat lajeilla kuitenkin päällekkäisiä. Näyttö lajien morfologisista eroavuuksista jää siten ohueksi, mikä asettaa kyseenalaiseksi *S. amazonica* -lajin aseman validina lajina. Lajin genetiikkaa ei ole tutkittu lainkaan ennen tätä tutkimusta, joten sen asema uutena lajina perustuu ainoastaan lajinkuvauksen morfologisiin tuntomerkkeihin. Lisäksi tiedetään, että myös *S. morsitans* esiintyy Madagaskarilla (Kronmüller 2010), josta tyyppinäytteet on

kerätty. Näiden seikkojen valossa on perusteltua epäillä, että *S. antananarivoensis* on *S. morsitans* -lajin nuorempi synonyymi.

1.12 Tutkimuksen tarkoitus

Pro gradu -tutkielmani tarkoituksena oli kartoittaa *Scolopendra morsitans* -juoksujalkaislajin perimässä esiintyvää lajinsisäistä muuntelua luomalla lajille DNA-sekvenssiaineistoon pohjautuva fylogenia ja vertailemalla DNA-sekvenssien parittaisia etäisyyksiä. Tarkoitukseni oli samalla selvittää, onko *S. morsitans* erotettavissa luotettavasti lähilajeistaan DNA-viivakoodauksen avulla. Keskeinen ero aiempiin aiheesta tehtyihin tutkimuksiin oli käytössä oleva aineisto, joka sisälsi näytteitä kaikilta *S. morsitans* -lajin keskeisiltä elinalueilta: Afrikasta, Intian niemimaalta, Kaakkois-Aasiasta ja Australiasta. Molekyyliselvityksen aineisto ei ole aiemmin ollut maantieteellisesti tarpeeksi kattavaa tämänkaltaisen tutkimuksen tekoon.

Tutkimuskysymykseni olivat seuraavat: 1) Esiintyykö *S. morsitans* -lajilla lajinsisäistä geneettistä muuntelua ja kuinka merkittävää se on? 2) Miten *S. morsitans* -lajin geneettinen muuntelu jakautuu maantieteellisesti? 3) Onko havaitun geneettisen muuntelun valossa perusteltua pitää *S. morsitans* -lajia yhtenä lajina vai sisältyykö *S. morsitans* -lajinimen alle kryptisiä lajeja? 4) Ovatko *S. amazonica* ja *S. antananarivoensis* erillisiä lajeja vai tulisiko ne synonymisoida *S. morsitans* -lajin kanssa? Halusin erityisesti tarkastella *S. antananarivoensis* -lajin asemaa sekvenssiaineiston valossa. Hypoteesini oli, että kyseessä on tosiasiaa *S. morsitans* eikä erillinen laji. 5) Voidaanko *S. morsitans* -laji erottaa luotettavasti lähisukulaisistaan DNA-viivakoodauksen avulla?

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Taksonominen otanta

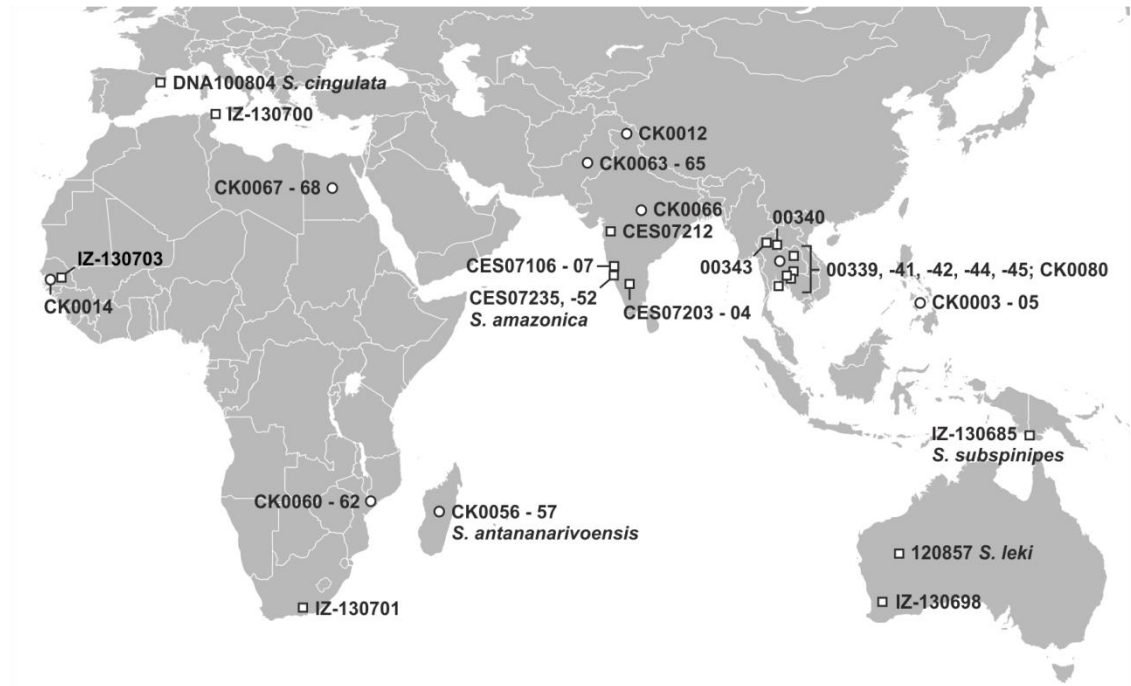
Tutkimuksessa käytetyt näytekysilöt on esitetty taulukossa 2 ja niiden keräyspaikkojen sijainnit kuvassa 2. Näytteiden tarkat keräystiedot ovat liitteissä 1 ja 2. Aineistoon sisältyi kaikkiaan 39 juoksujalkaisyksilöä, joista 31 yksilöä kuului *S. morsitans* -lajiin, kaksi yksilöä *S. amazonica* -fenotyyppiin ja kaksi yksilöä *S. antananarivoensis* -lajiin. *S. morsitans* -lajin osalta otanta kattoi lajin koko luontaisen maantieteellisen esiintymisalueen Afrikassa, Aasiassa ja Australiassa. Analyysihin liitettiin myös yksi yksilö *Scolopendra*-sukuun kuuluvilta lajeilta *S. subspinipes* (Leach 1815), *Scolopendra cingulata* (Latreille 1829) ja *S. leki* (Waldock & Edgecombe 2012). Hypoteesina oli, että nämä lajit ovat geneettisesti kaukaisempaa sukua *S. morsitans* -lajille kuin lajin yksilöt ovat keskenään. Fylogeneettisten analyysien ulkoryhmänä käytettiin Scolopendridae-heimoon, mutta Otostigminae -alaheimoon kuuluvaa lajia *Otostigmus multidentis* (Haase 1887). Ulkoryhmäksi valitaan laji, joka ei kuulu tutkittavaan ryhmään, mutta on sille läheistä sukua. Ulkoryhmä asetetaan haarautumaan fylogeniapuusta ensimmäisenä, joten se määrittelee fylogeniapuun juuren sijainnin. Tässä tutkimuksessa *O. multidentis* oli käyttökelpoinen analyysien ulkoryhmäksi, sillä se on muiden analyysissä käytettyjen lajien lähisukulainen, mutta nykyisen luokituksen mukaan selvästi kaukaisempaa sukua muille lajeille kuin ne ovat keskenään.

Noin puolet aineistosta, 18 *S. morsitans* -yksilöä ja kaksi *S. antananarivoensis* -yksilöä, oli kudoksenäytteiden muodossa. Suurin osa näistä näytteistä oli peräisin luonnosta kerätyiltä, kaupallista alkuperää olevilta yksilöiltä. Yksittäisinä näytteinä käytettiin luonnosta kerättyjen yksilöiden vankeudessa synnyttämiä jälkeläisiä. Juoksujalkaisten lajinmäärittäminen perustui morfologisiin tuntomerkkeihin (Lewis 2010) ja sen suorittivat juoksujalkaisten morfologiaan perehtyneet asiantuntijat. Juoksujalkaisilta leikattiin kudoksenäytteeksi yhdestä viiteen raajaa, jotka säilöttiin etanoliin (vol > 96 %). Toimenpiteen jälkeen juoksujalkaiset säilöttiin ns. voucher-yksilöiksi. Voucher-yksilö edustaa tietyn tutkimuksen kohteena ollutta eliölajia. Ne ovat tärkeitä biologisessa tutkimustyössä, sillä niiden avulla on mahdollista myöhemmin varmistaa ja tarvittaessa korjata tehty lajinmäärittäminen. Käytäntö lisää fylogeneettisten analyysien luotettavuutta.

Loput aineistosta koostui 19 juoksujalkaisyksilön DNA-sekvensseistä, jotka noudettiin GenBank®-tietokannasta (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Sekvenssit olivat peräisin 13 *S. morsitans* -yksilöltä, kahdelta *S. amazonica* -yksilöltä, sekä yhdeltä *S. cingulata* -, *S. subspinipes* - ja *S. leki* -yksilöltä.

Taulukko 2. Analyseissä käytetyt juoksujalkaisyksilöt. Tutkimuksessa tuotetut uudet sekvenssit on merkitty tähdellä (*). Viivalla (-) merkityt sekvenssit puuttuivat analyyseistä, koska riittävän hyvälaatuista sekvenssiä ei ollut saatavilla. *COI*- sekvenssit (n=36) merkitty vihreällä, *16S*-sekvenssit (n=32) keltaisella ja *28S*-sekvenssit (n=35) punaisella. Voucher-näytteiden säilytyspaikat: ZSM = Bavarian State Collection of Zoology (<http://www.zsm.mwn.de/e/>); Museum of Comparative Zoology, Harvard University (<http://www.mcz.harvard.edu/>); CES = Centre for Ecological Sciences, Indian Institute of Science (<http://ces.iisc.ac.in/new/>); AMNH = American Museum of Natural History (<http://www.amnh.org/>); CUMZ = University Museum of Zoology, University of Cambridge (<http://www.museum.zoo.cam.ac.uk/>); WAM = Western Australian Museum (<http://museum.wa.gov.au/>). GenBank-sekvenssien alkuperäisjulkaisut: 1 = Joshi & Karanth 2011; 2 = Vahtera ym. 2012a; 3 = Siritwut ym. 2015a; 4 = Vahtera ym. 2013; 5 = Muriene ym. 2010; 6 = Edgecombe ym. 1999. Kts. myös liitteet 1 ja 2.

Luokittelu	Laji	Lähde	Tunnus	Voucher	Maa / alue	Leveysaste	Pituusaste	COI	16S	28S
Scolopendridae, Scolopendrinae, Scolopendriini	<i>Scolopendra morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0003	ZSM	Filippiinit, Cebu	-	-	*	*	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0004	ZSM	Filippiinit, Cebu	-	-	*	*	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0005	ZSM	Filippiinit, Cebu	-	-	*	*	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0012	ZSM	Kashmir	-	-	*	*	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0014	ZSM	Gambia	-	-	*	*	-
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0060	ZSM	Mosambik	-	-	*	-	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0061	ZSM	Mosambik	-	-	*	-	-
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0062	ZSM	Mosambik	-	-	*	-	-
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0063	ZSM	Pakistan	-	-	*	*	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0064	ZSM	Pakistan	-	-	*	*	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0065	ZSM	Pakistan	-	-	*	-	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0066	ZSM	Intia	-	-	*	*	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0067	ZSM	Egypti	-	-	-	*	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0068	ZSM	Egypti	-	-	*	*	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	CK0080	ZSM	Thaimaa	-	-	*	*	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	IZ-130701	MCZ	Etelä-Afrikka	32.93333° S	24.64999° E	-	*	-
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	IZ-130700	MCZ	Tunisia	37.04999° N	10.98333° E	*	-	*
	<i>S. morsitans</i>	Kudosnäyte	IZ-130698	MCZ	Länsi-Australia	31.623422° S	117.709388° E	-	*	*
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 1	CE507106	CE5	Intia	15.409° N	74.476° E	JN004006	JN003895	JN003951
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 1	CE507107	CE5	Intia	15.409° N	74.476° E	JN004007	JN003896	JN003952
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 1	CE507203	CE5	Intia	13.038° N	77.200° E	JN004008	JN003897	JN003953
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 1	CE507204	CE5	Intia	13.038° N	77.200° E	JN004009	JN003898	JN003954
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 1	CE507212	CE5	Intia	18.419° N	73.907° E	JN004010	JN003899	JN003955
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 2	IZ-130703	AMNH LP4906	Senegal	13.80069° N	13.88141° W	HQ402533	HQ402531	HQ402537
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 3	00339	CUMZ	Thaimaa	16.83502° N	103.27555° E	KR705662	KR705600	KR705724
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 3	00340	CUMZ	Thaimaa	18.57113° N	100.78324° E	KR705661	KR705599	KR705723
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 3	00341	CUMZ	Thaimaa	12.52955° N	100.95511° E	KR705660	KR705598	KR705722
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 3	00342	CUMZ	Thaimaa	14.54816° N	103.37197° E	KR705666	KR705604	KR705728
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 3	00343	CUMZ	Thaimaa	18.84986° N	99.22122° E	KR705665	KR705603	KR705727
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 3	00344	CUMZ	Thaimaa	13.97052° N	102.266° E	KR705664	KR705602	KR705726
	<i>S. morsitans</i>	GenBank 3	00345	CUMZ	Kambodža	13.60152° N	102.95258° E	KR705663	KR705601	KR705725
	<i>Scolopendra amazonica</i>	GenBank 1	CE507235	CE5	Intia	14.436° N	74.426° E	JN004011	JN003900	JN003956
	<i>S. amazonica</i>	GenBank 1	CE507252	CE5	Intia	14.436° N	74.426° E	JN004012	JN003901	JN003957
	<i>Scolopendra antananarivoensis</i>	Kudosnäyte	CK0056	ZSM	Madagaskar	-	-	*	-	*
	<i>S. antananarivoensis</i>	Kudosnäyte	CK0057	ZSM	Madagaskar	-	-	*	-	*
	<i>Scolopendra leki</i>	GenBank 4	120857	WAM	Länsi-Australia	25.26888° S	120.63036° E	KF676524	KF676484	KF676402
	<i>Scolopendra cingulata</i>	GenBank 5, 6	IZ-131446	MCZ	Espanja, Barcelona	-	-	HM453310	HM453220	AF000782
	<i>Scolopendra subspripes</i>	GenBank 4	IZ-130685	MCZ	Papua Uusi-Guinea	8.61918° S	141.12033° E	KF676528	KF676488	KF676387
Scolopendridae, Oostigmiginae, Oostigmigini	<i>Oostigmigus multidens</i>	GenBank 4	IZ-130673	MCZ	Thaimaa	19.09500° N	100.94972° E	KF676510	KF676468	KF676366



Kuva 2. Näytteiden keräyspaikat kartalla. Näytteet, joiden keräyspaikan koordinaatit ovat tiedossa, on merkitty neliöllä. Ympyrällä merkittyjen näytteiden keräyspaikka tiedetään maan tarkkuudella. Ulkoryhmänä käytetty *Otostigmus multidens* -yksilö (ei merkitty kuvaan) on kerätty Thaimaasta.

2.2 Menetelmät

2.2.1 DNA:n eristäminen

DNA:n eristämässä käytettiin kudoksenäytteen koosta riippuen yhdestä kolmeen raajaa, jotka hienonnettiin petrimaljalla kirurginveitsenterän ja pinsettien avulla. Välineet puhdistettiin näytteiden välillä huolellisesti 99,5 % etanolilla. Genominen DNA eristettiin NucleoSpin® Tissue -eristyssarjan (MACHEREY-NAGEL GmbH) avulla valmistajan eläinkudoksille tarkoittaman ohjeen mukaisesti. Prosessin alussa näytteen proteiini- ja solukalvot hajotetaan kemiallisesti, jolloin DNA vapautuu liuokseen. Näyte sentrifugoidaan nukleiinihappoja sitovan piioksidikalvon lävitse, jolloin DNA sitoutuu kalvoon. Samalla kalvolle siirtyy näytteestä peräisin olevia epäpuhtauksia, jotka poistetaan pesemällä kalvo pesupuskureilla. Lopuksi kalvon lävitse sentrifugoidaan emäksistä eluutiopuskuriliuosta (5 mM Tris/HCl, esilämmitetty 70 °C lämpötilaan), jolloin puhdistettu DNA vapautuu puskuriin. Valmistajan suosituksen mukaisesti eluutiövaihe toistettiin kahdesti, ensin 100 µl ja sitten 50 µl puskurimäärällä, mahdollisimman suuren DNA-saaliin varmistamiseksi. Useimpien näytteiden kohdalla

eluutiopuskuria inkuboitiin piioksidikalvolla yhden minuutin ajan perusohjeen mukaisesti. Pienten kudoksenäyttemäärien kohdalla inkubaatioaika pidennettiin kolmeen minuuttiin valmistajan suositusten mukaisesti.

2.2.2 Geneettisten merkkialueiden monistaminen polymeerasiketjureaktiolla

Fylogeneettisissä analyyseissä käytettävien merkkialueiden valinnassa kiinnitettiin huomiota mutaatiotaajuuteen, joka vaihtelee geenialueiden välillä. Mutaatiotaajuuden tulee olla riittävän korkea, jotta tutkittavat näytteet erottuisivat toisistaan fylogeneettisissä analyyseissä. Liian korkea mutaatiotaajuus johtaa kuitenkin päällekkäisiin mutaatioihin samassa lokuksessa, jolloin synapomorfioiden tunnistus vaikeutuu ja sukulaisuussuhteet saattavat jäädä epäselviksi. Tässä tutkimuksessa käytettäväksi sekvensseiksi valittiin evoluutiogenetiikassa yleisesti käytetyt merkkialueet sytokromioksidaasi I (engl. cytochrome oxidase I, *COI*), 16S rRNA ja osa 28S rRNA -geenistä. *COI*-geenialue on osa mitokondriaalista DNA:ta (mtDNA) ja sen koodaama entsyymi osallistuu elektroninsiirtoketjuun, soluhengityksen viimeiseen vaiheeseen. *COI*-geeni on laajasti konservoitunut eläinkunnassa. Toisaalta sen mutaatiotiheys on niin suuri, että *COI*-sekvenssejä vertailemalla on pyritty erottamaan lähisukuisia lajeja toisistaan (vrt. DNA-viivakoodaus). 16S ja 28S koodaavat ribosomaalista RNA:ta. 16S-geenialue on osa mtDNA:ta ja se osallistuu mitokondriaalisten ribosomien koodaamiseen. 28S-geenialue sijaitsee vastaavasti tumagenomissa ja se koodaa aitotumallisilla sytoplasmisten ribosomien suuren alayksikön tiettyä rakenneosaa.

Merkkialueet monistettiin polymeerasiketjureaktiolla (engl. polymerase chain reaction, PCR), jonka avulla tutkittavaa sekvenssialuetta voidaan monistaa kerralla suuria määriä. Työvaiheessa käytetyt laboratorioprotokollat on kuvattu taulukoissa 3 - 5. Reaktioissa käytettiin MyTaq™ Red Mix -seosta (Bioline), joka sisältää tarvittavat komponentit DNA-templaattia ja alukkeita lukuun ottamatta. Reaktioseos koostuu monistettavan sekvenssin sisältävästä DNA-templaattista, DNA-polymeerasista, nukleotideistä (dNTP) sekä reaktio-olosuhteita säätelevistä ioneista ja puskuriliuoksesta. Lisäksi polymeerasiketjureaktioon tarvitaan monistettavan alueen määritteleviä forward- ja reverse-alukkeita. Ne ovat noin 20 nukleotidin mittaisia yksijuosteisia DNA-ketjuja, jotka suunnitellaan komplementaarisisiksi monistettavan DNA-sekvenssin 3'-päälle, forward-aluke sense-juosteelle ja reverse-aluke vastaavasti antisense-juosteelle.

Reaktioseos siirretään PCR-koneeseen, joka säätelee reaktioseoksen lämpötilaa. Denaturaatiovaiheessa korkea lämpötila saa templaatti-DNA:n vastinjuosteet irtoamaan toisistaan. Annealing-vaiheessa lämpötilaa lasketaan, jolloin alukkeet sitoutuvat niille komplementaarisiin alueisiin templaatti-DNA:ssa, forward-alue sense-juosteen 3'-päähen ja reverse-alue vastaavasti antisense-juosteen 3'-päähen. Annealing-lämpötila valitaan kullekin alukeparille sopivaksi. Liian korkeassa annealing-lämpötilassa alukkeet eivät kiinnity templaatti-DNA:han, eikä monistuminen pääse käynnistymään. Liian matala annealing-lämpötila puolestaan johtaa alukkeiden epäspesifiseen sitoutumiseen, jolloin PCR-tuote sisältää halutun sekvenssin lisäksi epäpuhtautena muitakin monistuneita sekvenssialueita. Annealing-vaihetta seuraavassa pidentymisvaiheessa lämpötilaa nostetaan uudelleen, jolloin alukkeiden 3'-päähen syntetisoiuu nukleotideista templaatti-DNA:lle komplementaarinen DNA-juoste DNA-polymeraasin katalysoimassa reaktiossa. Denaturaatio-, annealing- ja pidentymisvaiheen muodostamia syklejä toistettaessa monistettavan sekvenssijuosteen määrä lisääntyy reaktioseoksessa eksponentiaalisesti.

Taulukko 3. DNA:n monistamisessa käytetyt PCR-protokollat. Lukuarvot ovat tilavuuksia (µl) reaktiota kohti. Ensimmäisten näytteiden kohdalla käytettiin protokollaa 1. PCR-tuotteen määrän kasvattamiseksi siirryttiin myöhemmin käyttämään protokollaa 2. Yksittäisten vaikeasti monistuvien näytteiden kohdalla DNA-templaattia käytettiin 3 µl. Tällöin MilliQ-vettä käytettiin vastaavasti 2,75 µl tai 6,50 µl.

Reagenssi	Protokolla 1	Protokolla 2
MilliQ-vesi	3,75	7,5
MyTaq™ Red Mix	6,25	12,5
forward-alue	0,25	0,5
reverse-alue	0,25	0,5
DNA-templaatti	2	2
yht.	12,5	23

Taulukko 4. DNA:n monistamisessa käytetty PCR-ohjelma, joka on mukautettu valmistajan ohjeesta.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (s)	Toistot
Alkudenaturaatio	95	60	1
Denaturaatio	95	15	35
Annealing	vaihtelee, kts. taulukko 5	15	
Pidentyminen	72	10	

Taulukko 5. Tutkimuksessa käytetyt PCR- ja sekvensointialukkeet annealing-lämpötilooneen (°C). Forward-alukkeet on merkitty taulukkoon sinisellä ja reverse-alukkeet punaisella. LCOtail- ja HCOtail- alukkeisiin oli lisätty universaali 5'-häntä sekvensoinnin helpottamiseksi (taulukossa lihavoituna). COI-alue monistui suurimmassa osassa näytteitä 42 - 43 °C annealing-lämpötilassa. Alukkeiden lähdeviitteet: LCO1490 ja LCOtail (Folmer ym. 1994; Edgecombe ym. 2002), HCOtail (Folmer ym. 1994), HCOout (Carpenter & Wheeler 1999; Schulmeister ym. 2002), HCOoutout (Prendini ym. 2005), 16Sa (Xiong & Kocher 1991), (Edgecombe ym. 2002), 16Sb (Edgecombe ym. 2002), 28Sa ja 28Sb (Whiting ym. 1997; Edgecombe ym. 2002).

	Aluke	Sekvenssi	Annealing
COI	LCO1490	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'	42-43, 45-49
	LCOtail	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GTC AAC AAA TCA TAA AGA TAT TGG-3'	
	HCOout	5'-CCA GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC-3'	
	HCOtail	5'- ATT AAC CCT CAC TAA AGG GT AAA CTT CAG GGT GAC CAA AAA ATC A-3'	
	HCOoutout	5'-GTA AAT ATA TGR TGD GCT C-3'	
16S	16Sa	5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'	41- 43
	16Sb	5'-CTC CGG TTT GAA CTC AGA TCA-3'	
28S	28Sa	5'-GAC CCG TCT TGA AAC ACG GA-3'	50
	28Sb	5'-TCG GAA GGA ACC AGC TAC-3'	

2.2.3 DNA-elektroforeesi

Polymeraasiketjureaktion onnistuminen tarkistettiin DNA-elektroforeesilla. Elektroforeesia varten elektroforeesilaitteiston allas täytettiin TBE-puskurilla (taulukko 6) ja siihen asetettiin agarosigeelilevy (taulukko 7), jossa oleviin kaivoihin pipetoitiin 3,5 - 4,0 µl PCR-tuotetta. Elektroforeesilaitteistossa on katodi ja anodi, joihin johdetaan sähkövirta. DNA-ketjuilla on negatiivinen sähkövaraus, joten ne kulkeutuvat syntyneessä sähkökentässä negatiiviselta katodilta positiivista anodia kohti. Näytteiden annettiin ajautua geelillä 100 V jännitteellä 25 minuutin ajan.

Pitkät DNA-molekyylit liikkuvat geelissä lyhyitä hitaammin, joten elektroforeesi erottelee erimittaiset DNA-molekyylit vyöhykkeiksi. Tässä työssä agarosigeeliin lisättiin valmistusvaiheessa väriainetta (taulukko 7), joka sitoutuu DNA:han ja saa sen heijastamaan valoa LED-illuminaattorissa. Onnistuneesti monistunut, puhdas PCR-tuote muodostaa geelille yhden selkeästi erottuvan vyöhykkeen. Useampi kuin yksi vyöhyke viittaa alukkeiden epäspesifiin sitoutumiseen ja liian matalaan annealing-lämpötila. DNA:n puuttuminen viittaa liian korkeaan annealing-lämpötilaan (tai DNA-eristyksen epäonnistumiseen). Polymeraasiketjureaktio toistettiin tarvittaessa optimoidulla annealing-lämpötilalla (taulukko 5).

Taulukko 6. 0,5-kertaisen tris-boorihappo-EDTA-puskurin (TBE) valmistusohje. Puskuria käytettiin sekä agarosigeelin ainesosana että elektroforeesissa ajopuskurina.

Reagenssi	Määrä
Tris(hydroksimetyyli)aminometaani (Fisher Scientific, UK)	10,8 g
Boorihappo (Scharlab S. L., ES)	5,48 g
EDTA (Acros Organics, NJ, USA)	0,7448 g
H ₂ O	2 L

Taulukko 7. 1 % agarosigeelin valmistusohje kahdelle 50 ml geelille.

Reagenssi	Määrä
Agarosi (Bioline, UK)	1 g
0,5-kertainen TBE-puskuri (taulukko 6)	100 ml
Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics EUROPE GmbH)	5 µl

2.2.4 PCR-tuotteiden puhdistus

Sekvensointia varten PCR-tuotteet puhdistettiin niihin jääneistä dNTP-nukleotideista, alukkeista ja muista yksijuosteisista DNA-ketjuista. Puhdistuksessa käytettyjen valmisteiden toiminta perustuu kahteen entsyymiin, eksonukleaasi I ja recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP). Entsyymit lisättiin puhdistettavaan PCR-tuotteisiin, joita inkuboitiin 37 °C lämpötilassa entsyymien toiminnan käynnistämiseksi. Lopuksi entsyymit hajotettiin PCR-tuotteista inkuboimalla näytteitä 80 °C lämpötilassa. Ensimmäiset PCR-tuotteet puhdistettiin USB® ExoSAP-IT®-reagenssilla (Affymetrix, CA, USA), joka sisältää molemmat entsyymit. Reagenssi laimennettiin MilliQ-vedellä

1:3 konsentraatioon. Muilta osin puhdistus tehtiin valmistajan ohjeiden mukaan. Loput PCR-tuotteet puhdistettiin A'SAP-reagenssisarjalla (ArcticZymes, NO), joko valmistajan ohjeiden mukaan tai 1:3 konsentraatioon laimennetuilla entsyymeillä.

2.2.5 Sekvensointi

PCR-tuotteiden sekvensointi suoritettiin ostopalveluna Suomen Molekyylilääketieteen instituutissa (FIMM). Sekvensointia varten 96-kaivoiselle PCR-levylle pipetoitiin 5 µl puhdistettua PCR-tuotetta ja 1,6 µl sekvensointialuketta (5 µM). Sekvensointialukkeet olivat samoja kuin polymeraasiketjureaktiossa käytetyt alukkeet (taulukko 5). Sekvensointi tehtiin luotettavuuden lisäämiseksi sekä sense- että antisense-juosteelle, joten jokaista näytettä kohti valmistettiin kaksi reaktiota, yksi forward- ja yksi reverse-alukkeella.

2.2.6 Sekvenssien laadun tarkistus

Sekvenssitiedostot tarkistettiin Sequencher® v. 5.3 -ohjelmalla. Ohjelma vertaa vastinjuosteiden sekvenssejä keskenään ja muodostaa niiden pohjalta konsensussekvenssin. Emäkset, joista vastinjuosteet antoivat ristiriitaista tietoa, tarkistettiin yksitellen ja korjattiin konsensussekvenssiin. Mikäli sekvenssin laatu oli riittämätön tai emäs jäi muutoin epäselväksi, merkittiin emäs tuntemattomaksi (N). Tarkistetut konsensussekvenssit tulostettiin FASTA-muotoon. Sekvenssit tarkistettiin myös kontaminaatioiden varalta BLAST®-työkalulla (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), joka vertaa sekvenssejä tietokannassa oleviin sekvensseihin. Haulla varmistettiin, että sekvenssit ovat juoksujalkaisen, eivätkä esimerkiksi ihmisen, DNA:ta. Lopuksi sekvenssit yhdistettiin kolmeen .txt-tiedostoon, yksi kutakin geenialuetta varten.

2.2.7 Sekvenssien visualisointi ja rinnastus

Suurin osa fylogeniaohjelmista edellyttää toimiakseen, että käsiteltävät sekvenssit ovat samanpituisia. Toiseksi edellytetään, että rinnakkain asetettujen sekvenssien putatiivisesti homologiset emäkset asettuvat kohdakkain, mikä saavutetaan rinnastamalla (engl. multiple sequence alignment). Konsensussekvenssitiedostot visualisoitiin Se-Align v2.0a11 -ohjelmalla (Rambaut 2002) ja BioEdit Sequence

Alignment Editor v7.2.5 -ohjelmalla (Hall 1999), joissa sekvenssit asettuvat allekkain. Tuntemattomia emäksiä (N) sisältävät sekvenssien päät leikattiin. *COI*-sekvenssit, joissa ei konservoitumisen vuoksi esiinny pituusvaihtelua, tasattiin päistään samanpituisiksi (604 bp) tämän työvaiheen jälkeen. *16S*- ja *28S*-sekvenssit, joissa esiintyy insertioita ja deleetioita, rinnastettiin MUSCLE-sovelluksella (Edgar 2004; EMBL-EBI 2017) palvelimen käyttämällä oletusasetuksilla. Ohjelma asettaa homologiseksi arvioimansa emäkset kohdakkain ja sijoittaa mahdollisiin insertio- ja deleetiokohtiin aukkoja ohjelmalle annettujen parametrien mukaisesti. Tulosteena saatiin Pearson/FASTA-tiedosto, jossa luodut aukot oli merkitty tavuviivoilla. Lopuksi sekvenssit leikattiin päistään samanpituisiksi (*16S*: 488 bp, *28S*: 319 bp) BioEdit -ohjelmalla.

2.2.8 Fylogeneettiset analyysit

Sekvenssiaineistolle etsittiin sen parhaiten selittävät fylogeniapuut käyttäen optimaalisuuskriteereinä parsimoniaan ja suurimpaan uskottavuuteen (maximum likelihood) perustuvia menetelmiä. Jotta fylogeniaohjelmat pystyisivät yhdistämään kolmen merkkialueen sekvenssit tiettyyn näytteeseen, sekvenssitiedostoista tehtiin ketjutetut sekvenssitiedostot (concatenated file) SequenceMatrix 1.8 -ohjelmalla (Vaidya ym. 2011). *COI*-, *16S*- ja *28S*-sekvenssitiedostot kopioitiin ohjelmaan samanaikaisesti, jolloin merkkialueiden sekvenssit sijoituivat kolmeen sarakkeeseen siten, että saman näytteen sekvenssit olivat samalla rivillä. Ketjutettu sekvenssiaineisto tallennettiin TNT-, PHYLIP- ja NEXUS-muodoissa. TNT-muotoista sekvenssitiedostoa käytettiin tuntomerkkiaineistona parsimonia-analyysissa ja PH-tiedostoa vastaavasti suurin uskottavuus -analyysissä. NEXUS-tiedostosta poimittiin kunkin merkkialueen sijaintitiedot ketjutetussa sekvenssitiedostossa ja ne merkittiin erilliseen ositustiedostoon (taulukko 8). Ositustiedostoa käytettiin suurin uskottavuus -analyysissä karttana, jonka avulla kunkin merkkialueen sekvenssejä verrattiin ainoastaan saman merkkialueen sekvensseihin.

Taulukko 8. Ositustiedosto RAxML-analyysiä varten (.txt-muodossa). Rivin alussa on merkittynä aineistotyyppi (DNA). GTR + Γ ("GTRGAMMA") on ohjelmalle annettu sekvenssievoluutiomalli ja samalla ohjelman ainoa suurimman uskottavuuden evoluutiomalli. Sekvenssiedostojen nimet ja niiden sijainnit yhdistelmä-tiedostossa (emäspareina) ovat rivien lopussa.

DNA, GTRGAMMA, 16S_bioedit_trim_muscle_trim_NEW = 1-488
DNA, GTRGAMMA, 28S_seal_bioedit_trim_musc_trim_NEW = 489-807
DNA, GTRGAMMA, COI_seal_bioedit_trim = 808-1411

2.2.9 Parsimonia-analyysi

Sekvenssiaineistolle etsittiin sen parhaiten selittävä fylogeniapuu parsimoniaa optimaalisuus-kriteerinä käytävällä TNT-ohjelmalla (Goloboff ym. 2008). Analyysiasetukset on esitetty taulukossa 9. Uudelleenjärjestely suoritettiin tree bisection and reconnection -menetelmällä (TBR). Analyysin lopuksi optimaalisimmista puista muodostettiin tiukka konsensuspuu, jossa esiintyville haarautumiskohdille laskettiin tukiarvot käyttäen jackknife-uudelleenotantamenetelmää (Farris ym. 1996) 1000 toistolla.

Taulukko 9. Parsimonia-analyysin asetukset TNT-ohjelmassa. Oletusasetukset on merkitty tähdellä (*).

Asetus		Valinta
Settings	Memory	Max. trees = 10 000 Trees
		Display Buffer = 1000 Kbytes
	Macros	102 KBytes *
		15 Loops *
		1000 Variables *
Data format		DNA
		Read gaps as missing
Data	Outgroup taxon	O. multicens
Settings	Collapsing rules	min. length = 0
Settings		Lock trees *
		Stopwatch *
		Add trees read to groups *
Analyze	Traditional search	
	Starting trees	Wagner trees
		1 random seed
		1000 repls.
	Swapping algorithm	tree bisection reconnection (TBR) *
		trees to save per replication: 10 *
		collapse trees after the search
		replace existing trees
	Quick collapsing during searches	*
Consensus Trees	Consensus	Calculate: Strict = Nelsen
		save to RAM
		Using: all trees
		Include: all taxa

2.2.10 Suurin uskottavuus -analyysi

Suurimpaan uskottavuuteen perustuvat analyysit tehtiin CIPRES Science Gateway V. 3.3 -portaalissa (Miller ym. 2010) käyttäen RAxML-HPC2 on XSEDE -menetelmää (v. 8.2.8; Stamatakis 2014). Analyysin asetukset on esitetty taulukossa 10. Osana analyysiä konsensuspuun jokaiselle haaralle laskettiin bootstrap-tukiarvot GTR CAT - evoluutiomallilla (Stamatakis 2006; Izquierdo-Carrasco ym. 2011). GTR CAT vaatii

vähemmän muistia ja on nopeampi käyttää kuin GTR + Γ (Stamatakis 2006). RAxML -analyysin tuloksena on optimaalinen puu, eikä erillistä konsensuspuuta rakenneta.

Taulukko 10. Suurin uskottavuus -analyysin asetukset RAxML-ohjelmassa. Taulukossa ei ole esitetty valitsematta jätettyjä vaihtoehtoja ja niitä asetuksia, jotka eivät koske DNA-sekvenssiaineistoon perustuvia analyysejä.

Asetus	Valinta
Simple Parameters	
Maximum Hours to Run	3
Set a name for output files	raxml_final.out
Please select the Data Type	Nucleotide
Outgroup...	O_multidens_Thailand
Specify the number of distinct rate categories (-c)	25
Specify a random seed value for parsimony inferences (-p)	✓
Enter a random seed value for parsimony inferences...	12345
Use a mixed/partitioned model? (-q)	raxml_partitions_NEW.txt
Correct for Ascertainment bias (ASC_)	no
Estimate proportion of invariable sites (GTRGAMMA + I)	no
Advanced Parameters	
Nucleic Acid Options	
Choose model for bootstrapping phase	GTRCAT
Configure Bootstrapping	
Conduct rapid bootstrapping? (-x)	✓
Enter a random seed value for rapid bootstrapping	12345
Conduct a rapid Bootstrap analysis... (-f a)	✓
Specify an Explicit Number of Bootstraps	✓
Bootstrap iterations (-# -N)	1000

2.2.11 Lajirajojen määrittäminen suurimman uskottavuuden puulle

Suurimman uskottavuuden puusta etsittiin mahdollisia lajirajoja bPTP-analyysillä (Zhang ym. 2013), joka hyödyntää lajirajojen määrittelyssä puun oksapituuksia. Analyysissä oletetaan, että substituutioita on tapahtunut merkittävästi enemmän lajien välillä kuin lajien sisällä. Substituutioiden määrä taas heijastuu suoraan oksapituuksiin. bPTP-analyysissä lajirajat luetaan haarautumiskohtien saamista bayesiläisistä

tukiarvoista: korkea tukiarvo merkitsee korkeampaa todennäköisyyttä sille, että kyseiseen monofyleettisen ryhmään kuuluvat yksilöt kuuluvat samaan lajiin (Zhang 2013-2015). bPTP-analyysiä varten suurimman uskottavuuden puu ladattiin palvelimelle (Zhang 2013-2015). Analyysissä käytetyt asetukset on lueteltu taulukossa 11. Markov chain Monte Carlo (MCMC) -ketju oli konvergoitunut analyysin aikana, joten todennäköisyysjakaumasta tehty otos oli edustava.

Taulukko 11. bPTP-lajiraja-analyysin asetukset.

Asetus	Valinta
My tree is	Rooted
No. MCMC generations	100000
Thinning	100
Burn-in	0.1
Seed	123
Outgroup taxa names (if any)	O_multidens_Thailand
Remove outgroups (if any)	ei valintaa

2.2.12 Parittaiset etäisyydet

Sekvensseille laskettiin parittaiset etäisyydet MEGA -ohjelman versiolla 7.0.14 (Kumar ym. 2016). Rinnastetun sekvenssiaineiston jokaiselle sekvenssiparille laskettiin prosentuaalinen etäisyys, eli niiden emästen prosenttiosuus, jotka poikkeavat toisistaan. Parittaiset etäisyydet laskettiin erikseen *COI*-, *16S*- ja *28S*-sekvensseille käyttäen samoja rinnastettuja .fas-muotoisia sekvenssitiedostoja kuin fylogeneettisissä analyyseissä. Lisäksi kunkin näyteparin kokonaisetäisyys selvitettiin laskemalla parittaiset etäisyydet ketjutetulle sekvenssirinnastukselle (*COI+16S+28S*), jossa kolmen geenialueen sekvenssit asetettiin peräkkäin. Puuttuvia geenisekvenssejä merkitsevät kysymysmerkit korvattiin ketjutetussa sekvenssitiedostossa N-merkillä, sillä osasta näytteistä ei ollut käytettävissä kaikkia kolmea geenisekvenssiä. Parittaisten etäisyyksien laskemisessa käytetyt asetukset on esitetty taulukoissa 12 ja 13.

Taulukko 12. Sekvenssiaineiston tulkintaa koskevat asetukset MEGA-ohjelmassa.

Valikko	Asetus	Valinta
M7: Input Data	Data Type	Nucleotide Sequences
	Missing Data	N
	Alignment Gap	-
	Identical Symbol	.
		OK
	Protein-coding nucleotide sequence data?	Yes
M7: Select Genetic Code	Standard	OK

Taulukko 13. Parittaisten etäisyyksien laskemisessa käytetyt analyysiasetukset MEGA-ohjelmassa.

Valikko	Asetus	Valinta
Analysis	Analysis	Distance Estimation
	Scope	Pairs of taxa
Estimate Variance	Variance Estimation Method	None
Substitution Model	Substitutions Type	Nucleotide
	Model/Method	p-distance
	Substitutions to Include	d: Transitions + Transversions
Rates and Patterns	Rates among Sites	Uniform rates
	Pattern among Lineages	Same (Homogeneous)
Data Subset to Use	Gaps/Missing Data Treatment	Pairwise deletion
	Codons Included	1st+2nd+3rd+Non-Coding
No. of Sites	(aineiston emäspariluku)	
d	Estimate	

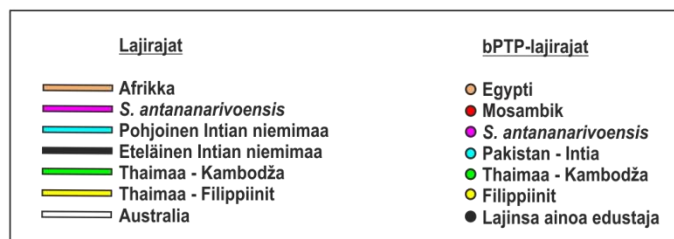
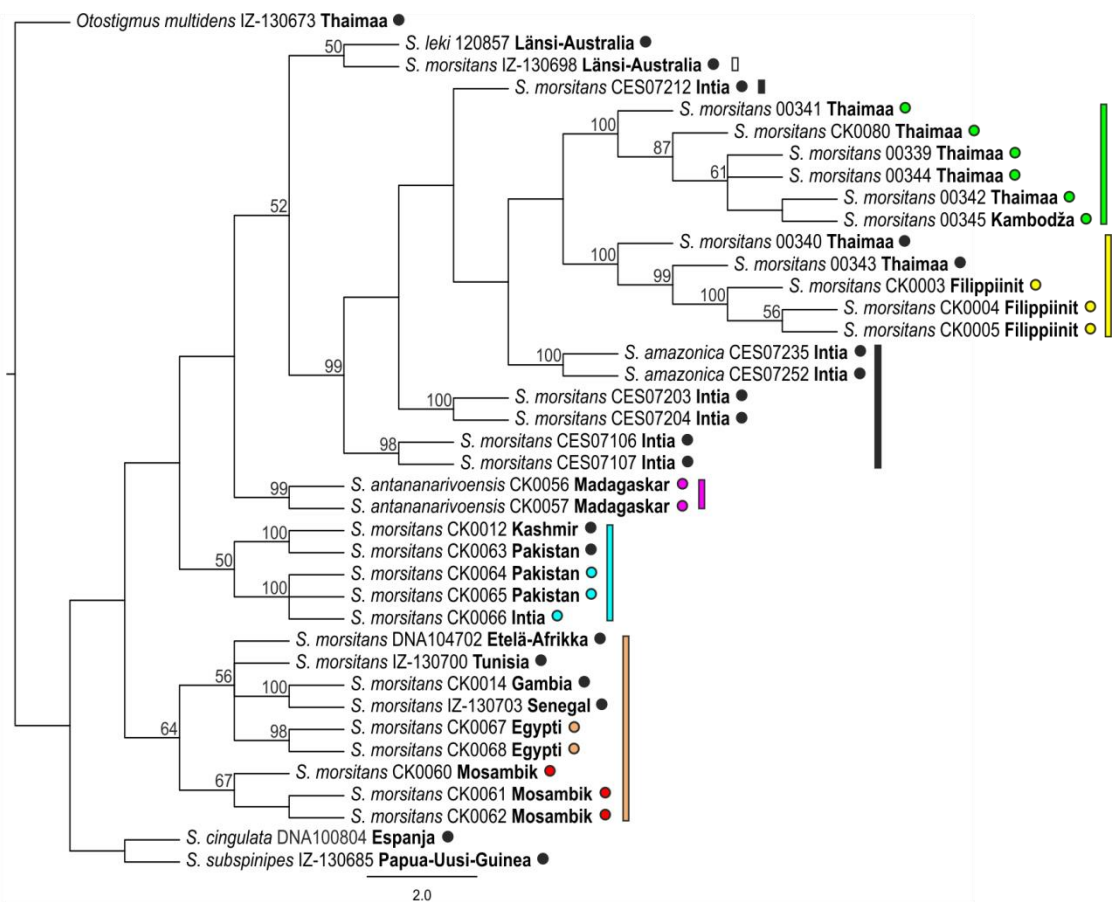
Tulosten käsittely tehtiin Excel-ohjelmalla (Microsoft Excel 2010). Parittaisista etäisyyksistä piirrettiin jakaumakuvaajat R-ohjelmalla (v. 3.2.4, R Development Core Team 2016) hist-funktiota käyttäen. *S. morsitans* -lajin etäisyysjakaumakuvaajaa jälkikäsiteltiin CorelDRAW® Graphics Suite X6 -ohjelmalla (v. 16.3.0.1114).

3. TULOKSET

3.1 *Fylogeneettiset analyysit*

TNT-ohjelmalla suoritetussa parsimonia-analyysissä löytyi kaksi yhtä parsimonista puuta, joiden pituus on 2509 askelta. Näistä muodostettu tiukka konsensuspuu (kladogrammi) on esitetty kuvassa 3. Kolmea polytomiaa lukuun ottamatta fylogenia ratkaistiin puussa kokonaan. Suurimmassa osassa terminaalisisista haarautumiskohdista oli merkitsevä tukiarvo ($JK > 50$). Sen sijaan puun tyviosat jäivät vaille merkitseviä tukiarvoja. Ulkoryhmän jälkeen puusta haarautuivat ensimmäisinä toistensa lähimmät sukulaiset *Scolopendra cingulata* ja *Scolopendra subspinipes* ($JK < 50$). *S. morsitans* -yksilöt, *Scolopendra antananarivoensis* -yksilöt ja *Scolopendra leki* -yksilö muodostivat keskenään suuren monofyleettisen ryhmän ($JK < 50$). Vastaavasti aineiston kaikki *S. morsitans* -yksilöt muodostivat fylogeniassa polyfyleettisen ryhmän.

Scolopendra morsitans -lajin geneettinen muuntelu oli fylogeniassa maantieteellisesti järjestäytyntä (kuva 3). Kaikki Manner-Afrikasta kerätyt *S. morsitans* -yksilöt muodostivat monofyleettisen ryhmän ($JK = 64$). Kaakkois-Aasiasta kerätyt *S. morsitans* -yksilöt jakautuivat kahteen vahvasti tuettuun ($JK = 100$) monofyleettiseen ryhmään, Thaimaa-Filippiinit -ryhmään ja Thaimaa-Kambodža -ryhmään. Intian niemimaalta peräisin olevat näytteet jakautuivat puussa vähemmän systemaattisesti. Pohjoisen Intian niemimaan näytteet muodostivat monofyleettisen ryhmän ($JK = 50$). Sen sijaan eteläiseltä Intian niemimaalta kerätyt *S. morsitans* - ja *Scolopendra amazonica* -näytteet muodostivat keskenään parafyleettisen ryhmän ja kaakkoisaasialaisten näytteiden kanssa monofyleettisen ryhmän ($JK = 99$). Länsi-Australiasta peräisin oleva *S. morsitans* -yksilön lähin sukulainen oli saman valtion alueelta kerätty *S. leki* ($JK = 50$). Madagaskarilaiset *S. antananarivoensis* -yksilöt olivat toistensa lähimpiä sukulaisia ($JK = 99$). *Scolopendra amazonica* -yksilöt olivat toistensa lähimpiä sukulaisia ($JK = 100$) ja ne sijoittuivat samaan parafyleettiseen ryhmään eteläintialaisten *S. morsitans* -näytteiden kanssa.



Kuva 3. Tiukka konsensuspuu TNT-analyysin tuottamasta kahdesta yhtä pitkstä (2509 askelta) puusta. Luvut ovat merkitseviä jackknife-tukiarvoja (>50). Fylogeniaan, parittaisiin etäisyyksiin ja morfologiaan perustuvat maantieteelliset lajirajat on merkitty värillisin pystyviivoin. Suurimman uskottavuuden puusta bPTP-analyysillä määritetyt lajirajat on merkitty värillisin ympyröin (kts. kuva 4). Mustalla ympyrällä merkityt yksilöt eivät muodostaneet mahdollista lajia yhdenkään toisen näytteen kanssa (PDP<0,50).

Suurimpaan uskottavuuteen perustuvassa RAxML-analyysissä tuloksena oli optimaalinen puu, jolla aineiston uskottavuus oli $\ln L = -11277,775727$ (kuva 4). Puussa ei ollut polytomioita, joten fylogenia ratkaistiin puusta kokonaan. Puun tyviosat jäivät vaille merkitseviä tukiarvoja kuten parsimoniapuussakin, mutta suurimmassa osassa fylogenian haarautumiskohdista oli merkitsevä tukiarvo (BS>50). Aineiston kaikki *S. morsitans* -yksilöt muodostivat tässäkin fylogeniassa polyfyleettisen ryhmän. Ulkoryhmän jälkeen puusta haarautuivat ensimmäisinä pohjoiselta Intian niemimaalta peräisin olevat *Scolopendra morsitans* -yksilöt (JK<50). Seuraavaksi haarautuivat

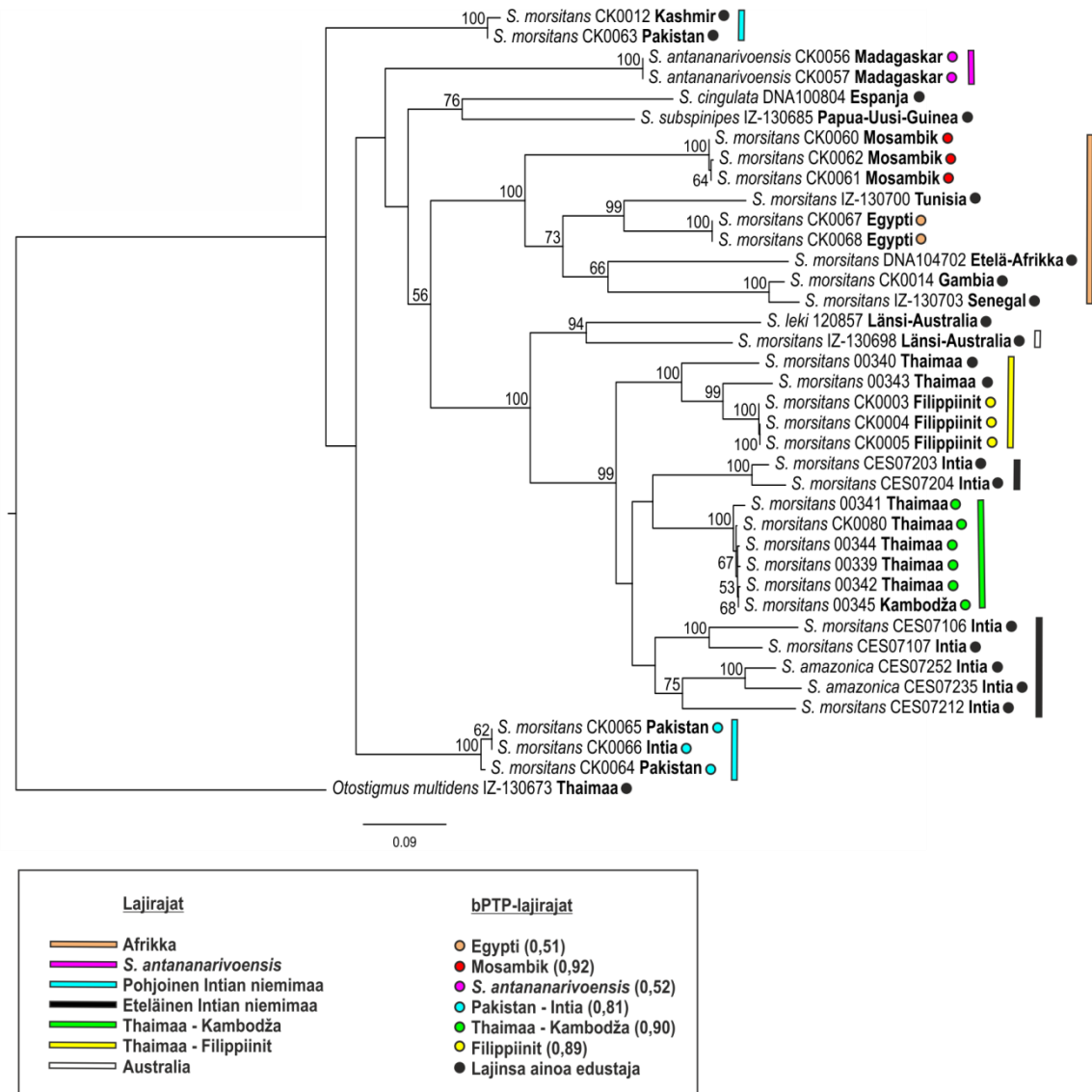
Scolopendra antananarivoensis -yksilöt sekä *Scolopendra cingulata* -yksilö ja *Scolopendra subspinipes* -yksilö (JK<50). *Scolopendra leki* asettui fylogeniaan keskelle ja sen lähin sukulainen oli suurimman uskottavuuden puussakin länsiaustralialainen *S. morsitans* -yksilö (BS=94).

Scolopendra morsitans -lajin geneettinen muuntelu oli maantieteellisesti järjestäytyneenä myös suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4), mutta ryhmien haarautumisjärjestys vaihteli jonkin verran puiden välillä. Suurimman uskottavuuden puussa oli kolme monofyleettistä *S. morsitans* -ryhmää, jotka esiintyivät myös parsimoniapuussa: Afrikka, Thaimaa-Filippiinit ja Thaimaa-Kambodža (kaikilla BS=100). Sen sijaan Intian niemimaalta peräisin olevat näytteet muodostivat neljä monofyleettistä tai kaksi parafyleettistä ryhmää. Pohjoisen Intian niemimaan *S. morsitans* -yksilöt haarautuivat juuresta heti ulkoryhmän jälkeen (BS<50), kun taas eteläisen Intian niemimaan *S. morsitans* -yksilöt (mukaan lukien kaksi *S. amazonica* -yksilöä) muodostivat monofyleettisen ryhmän Thaimaa-Kambodža -ryhmän kanssa (BS<50). *S. antananarivoensis* -yksilöt olivat toistensa lähimpiä sukulaisia (BS=100) myös suurimman uskottavuuden puussa.

bPTP-analyysin arvion mukaan suurimman uskottavuuden puussa oli 22 - 33 lajia (keskiarvo 27.05). Analyysissä tavallisesti käytetty merkitsevyyden raja on PDP-arvo (posterior delimitation probability) 0,95. Analyysi ei löytänyt yhtään useamman kuin yhden yksilön kladia, jonka kohdalla tämä merkitsevyyden raja olisi ylittynyt. Kun mahdollisina lajeina käsitellään kladeja, joissa PDP-arvo oli vähintään 0,50, todennäköisimmän lajijakauman mukaan puussa oli yhteensä 26 mahdollista lajia (kuvat 4 ja 5). 20 juoksujalkaisyksilöä oli aineistossa todennäköisiä lajinsa ainoita edustajia (PDP<50; kuva 4). Tähän lukeutuivat *Otostigmus multidens* -ulkoryhmäyksilö, *S. cingulata*, *S. subspinipes* ja *S. leki*. Lisäksi 16 *S. morsitans* -yksilöä oli analyysin mukaan aineistossa todennäköisiä lajiensa ainoita edustajia, mukaan lukien molemmat *S. amazonica* -yksilöt, kaikki eteläisen Intian niemimaan *S. morsitans* -yksilöt ja länsiaustralialainen *S. morsitans* -yksilö.

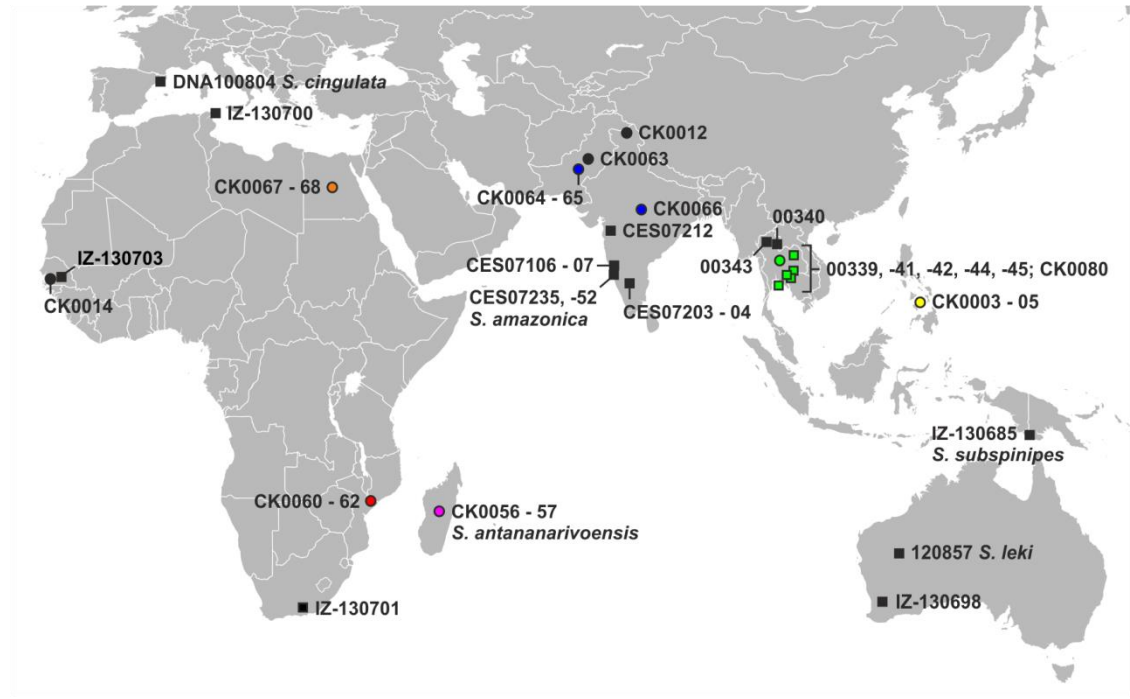
bPTP-analyysi löysi suurimman uskottavuuden puusta myös kuusi maantieteellisesti järjestäytyneenä mahdollista lajia (PDP≥50), joissa oli vähintään kaksi edustajaa (kuvat 4 ja 5). Kaikki tällaisiin ryhmiin kuuluvat yksilöt olivat peräisin samojen maantieteellisten alueiden sisältä. *S. antananarivoensis* -yksilöt muodostivat keskenään

mahdollisen lajin (PDP=0,52). Loput viisi mahdollista lajia koostuivat *S. morsitans* -yksilöistä. Afrikkalaisista *S. morsitans* -yksilöistä mahdollisesti samaan lajiin kuuluivat kaksi egyptiläistä yksilöä (PDP=0,51) ja kolme mosambikilaista yksilöä (PDP=0,92). Intian niemimaalla kaksi pakistanilaista ja yksi intialainen yksilö kuuluivat keskenään samaan mahdolliseen lajiin (PDP=0,81). Kaakkois-Aasiassa viisi thaimaalaista ja yksi kambodžalainen yksilö kuuluivat keskenään mahdollisesti samaan lajiin (PDP=0,90), samoin kolme filippiiniläistä yksilöä (PDP=0,89).



Kuva 4. Optimaalisin suurimman uskottavuuden puu ($\ln L = -11277,775727$). Luvut ovat merkitseviä bootstrap-tukiarvoja (arvo >50). Fylogeniaan, parittaisiin etäisyyksiin ja morfologiaan perustuvat maantieteelliset lajirajat on merkitty värillisin pystyviivoin. Puulle bPTP-analyysillä määritetyt mahdolliset lajirajat on merkitty värillisin ympyröin. Lajien saamat PDP-tukiarvot (merkitty sulkeisiin) vastaavat posterioritodennäköisyyksiä epäinformatiivisella priorilla ja ne kertovat osuuden analyyseistä, joissa kladin yksilöt kuuluivat keskenään samaan lajiin (kts. tarkemmin Zhang 2013-2015). Merkitsevyyden rajana käytetään yleensä PDP-arvoa

0,95. Mustalla ympyrällä merkittyjen yksilöiden PDP-arvo oli <0,50 kaikkien muiden analyysin näytteiden kanssa.



Kuva 5. bPTP-analyysin mukaiset mahdolliset lajirajat kartalla. Värien selitykset on merkitty puihin (kuvat 3 ja 4). Näytteet, joiden keräyspaikan koordinaatit ovat tiedossa, on merkitty neliöllä. Ympyrällä merkittyjen näytteiden keräyspaikka tiedettiin maan tarkkuudella. Ulkoryhmänä käytetty *Otostigmus multidens* -yksilö (ei merkitty kuvaan) on kerätty Thaimaasta.

3.2 Parittaiset etäisyydet

3.2.1 *Scolopendra morsitans*

Scolopendra morsitans -aineistossa parittaisten etäisyyksien mediaani oli *COI*-sekvenssillä 17,1 %, *16S*-sekvenssillä 17,2 %, *28S*-sekvenssillä 5,4 % ja ketjutetulla sekvenssillä (*COI*+*16S*+*28S*) 13,4 % (taulukko 14). Lajinsisäiset mediaanietäisyydet olivat samassa suuruusluokassa kuin muiden aineiston *Scolopendra*-lajien ja *S. morsitans* -lajin väliset mediaanietäisyydet. Esimerkiksi *Scolopendra subspinipes* -lajin mediaanietäisyys *S. morsitans* -lajiin oli *COI*-sekvenssillä 17,9 %, *16S*-sekvenssillä 19,8 %, *28S*-sekvenssillä 5,5 % ja kolmen sekvenssin yhdistelmäsekvenssillä 16,3 %. Eri alaheimoon kuuluvan *Otostigmus multidens* -lajin mediaanietäisyys *S. morsitans* -lajiin oli tätä merkittävästi suurempi *28S*-sekvenssillä (15,3 %) ja hieman suurempi *COI*- ja *16S*-sekvensseillä (20,4 % ja 23,8 %).

Kaikilla sekvensseillä *S. morsitans* -lajin lajinsisäiset parittaiset etäisyydet vaihtelivat 0,0 % ja yli 20 % välillä (taulukko 14). Suurimmat lajinsisäiset parittaiset etäisyydet olivat samassa suuruusluokassa kuin muiden aineiston *Scolopendra*-lajien ja *S. morsitans* -lajin väliset suurimmat etäisyydet. Sen sijaan pienimmät muiden *Scolopendra*-lajien ja *S. morsitans* -lajin väliset etäisyydet olivat selvästi yli 0,0 %: *COI*-sekvenssillä 14,6 - 16,0 %, *I6S*-sekvenssillä 14,1 - 17,0 % ja *28S*-sekvenssillä 2,7 % - 4,2 %.

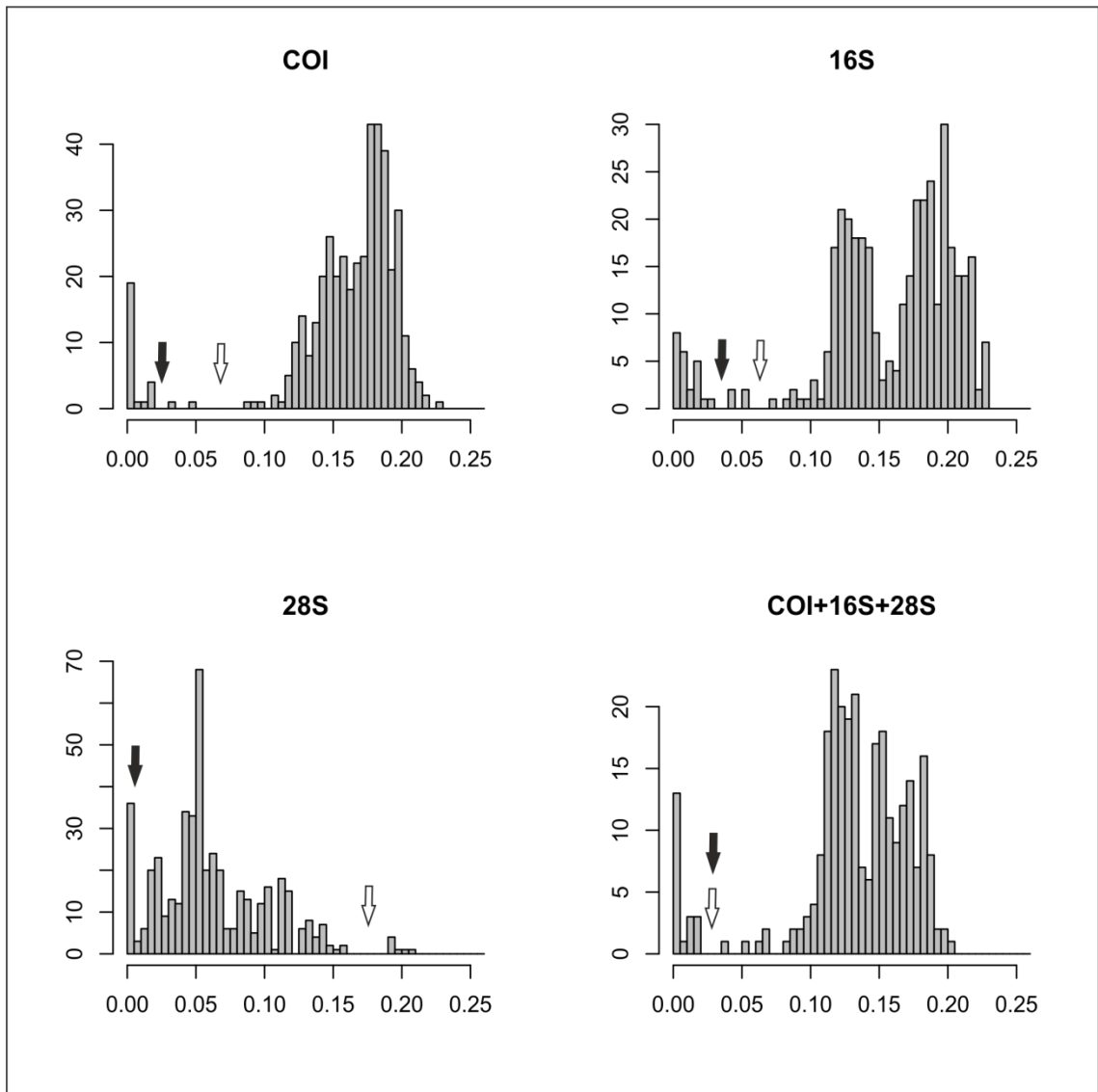
Scolopendra morsitans -lajin lajinsisäisten etäisyyksien jakaumakuvat vaihtelivat muodoltaan eri sekvenssialueilla (kuva 6). *COI*-sekvenssin etäisyysjakauma oli kaksiosainen: pienimmät etäisyydet asettuivat välille 0,0 - 4,8 %. Tämän jälkeen etäisyysarvoissa oli aineiston suurin aukko (4,2 prosenttiyksikköä; merkitty valkoisella nuolella kuvaan 6) ja loput etäisyysarvot sijoittuivat välille 9,0 - 22,9 %. *I6S*-sekvenssin etäisyysjakaumassa oli kolme huippua noin etäisyyksien 0,0 %, 12,0 % ja 19,5 % kohdalla. Suurin aukko etäisyysjakaumassa (1,9 prosenttiyksikköä) oli etäisyyksien 5,3 % ja 7,2 % välillä. *28S*-sekvenssin etäisyysjakaumassa huiput asettuvat noin etäisyyksien 0,0 % ja 5,0 % kohdalle ja suurin aukko (3,3 prosenttiyksikköä) etäisyyksien 15,8 % ja 19,1 % välille. Ketjutetun sekvenssin (*COI+I6S+28S*) etäisyysjakauma muistutti muodoltaan *I6S*-sekvenssin etäisyysjakaumaa. Jakauman suurin aukko (2,2 prosenttiyksikköä) oli kohdassa 1,7 - 3,9 %.

Koko aineiston pienimmät parittaiset etäisyydet vastasivat bPTP-analyysin suurimman uskottavuuden puusta (kuva 4) löytämiä mahdollisia lajirajoja (liite 3). *S. morsitans* -aineistosta löydetty bPTP-lajirajat ($PDP \geq 50$) on merkitty sekvenssien etäisyysjakaumiin (kuva 6) mustilla nuolilla, joiden vasemmalla puolella olevat etäisyysarvot merkitsevät lajinsisäisiä etäisyysarvoja ja vasemmalla puolella olevat lajien välisiä etäisyyksiä. *COI*-sekvenssien kohdalla bPTP-analyysin määrittämien lajinsisäisten ja lajien välisten etäisyyksien välinen aukko oli kohdassa 2,0 - 3,3 % (1,3 prosenttiyksikköä). *I6S*-sekvenssillä vastaavan aukon sijainti oli välillä 3,0 - 4,1 % (1,1 prosenttiyksikköä), *28S*-sekvenssillä välillä 0,0 - 0,3 % (0,3 prosenttiyksikköä) ja ketjutetulla sekvenssillä (*COI+I6S+28S*) välillä 1,7 - 3,9 % (2,2 prosenttiyksikköä). Ketjutetulla sekvenssillä aineiston suurin aukko ja bPTP-lajirajoihin perustuva aukko sijaitsivat samassa kohdassa jakaumaa. Muilla sekvensseillä suurin aukko sijaitsi oikealla bPTP-lajiraja-aukkoon nähden.

Fylogeniioihin, parittaisiin etäisyyksiin ja morfologiaan perustuvien maantieteellisten lajien (merkitty värillisin pystyviivoin kuviin 3 ja 4) sisäiset parittaiset etäisyydet on merkitty taulukkoon 15. Lajien Thaimaa-Kambodža ja Thaimaa-Filippiinit sisäiset etäisyydet olivat selvästi muita lajeja pienempiä. Afrikka-lajin sekä Intian niemimaan kahden lajin sisäiset etäisyydet olivat huomattavasti suurempia ja keskenään samassa suuruusluokassa. Länsiaustralialaisen *S. morsitans* -yksilön ja *S. leki* -yksilön väliset parittaiset etäisyydet olivat samassa suuruusluokassa kuin muut aineistossa havaitut *Scolopendra*-lajien väliset etäisyydet.

Taulukko 14. *S. morsitans* -yksilöiden lajinsisäiset ja lajien väliset parittaiset etäisyydet prosentteina. Ensimmäinen luku on mediaani ja sulkeissa on vaihteluväli. *S. amazonica* -fenotyypin ja *S. morsitans* -lajin parittaisissa etäisyyksissä *S. amazonica* -yksilöt on rajattu pois *S. morsitans* -yksilöiden joukosta.

<i>S. morsitans</i> vs.							
	<i>S. morsitans</i>	<i>S. amazonica</i>	<i>S. antananarivoensis</i>	<i>S. subspinipes</i>	<i>S. cingulata</i>	<i>S. leki</i>	<i>O. multidentis</i>
COI	17,1 (0,0 - 22,9)	16,1 (12,6 - 20,3)	20,9 (14,6 - 22,7)	17,9 (15,3 - 21,2)	19,4 (16,0 - 22,1)	18,7 (15,9 - 20,1)	20,4 (18,3 - 22,7)
16S	17,2 (0,0 - 22,8)	13,5 (12,0 - 21,6)	x	19,8 (16,8 - 22,4)	21,0 (17,0 - 22,7)	17,2 (14,1 - 21,1)	23,8 (22,3 - 26,9)
28S	5,4 (0,0 - 21,0)	5,4 (0,3 - 14,1)	5,6 (2,5 - 12,5)	5,5 (3,2 - 13,4)	5,6 (4,2 - 12,4)	6,5 (2,7 - 15,7)	15,3 (12,8 - 33,3)
COI+16S+28S	13,4 (0,0 - 20,1)	12,9 (10,1 - 18,5)	16,4 (11,2 - 20,3)	16,3 (13,7 - 19,0)	17,8 (14,0 - 19,3)	15,4 (14,3 - 18,6)	21,4 (19,3 - 23,7)



Kuva 6. *S. morsitans* -yksilöiden parittaisten etäisyyksien jakaumat merkialueittain. Etäisyys (asteikolla 0 - 1) on merkitty x-akselille ja etäisyysarvojen absoluuttinen lukumäärä y-akselille. Mahdolliset etäisyysjakaumissa esiintyvät viivakoodausaukot on merkitty nuolin. Suurimmat aukot etäisyysjakaumissa on merkitty valkoisella nuolella. Mustien nuolten vasemmalle puolelle jäävät etäisyysarvot ovat bPTP-lajirajojen ($PDP \geq 50$) mukaisia lajinsisäisiä etäisyyksiä ja oikealle puolelle jäävät lajien välisiä. Ketjutetun sekvenssitiedoston (*COI+16S+28S*) parittaisten etäisyyksien määrittämisessä huomioitiin ainoastaan yksilöt, joilta oli käytettävissä kolmen merkialueen sekvenssit.

Taulukko 15. Fylogeneettisissä puissa esiintyville *S. morsitans* -lajiryhmille määritetyt parittaiset etäisyydet. Ensimmäinen luku on mediaani, sulkeissa vaihteluväli. Ryhmän koostuessa kahdesta yksilöstä on ainoa ilmoitettu luku näiden välinen parittainen etäisyys. Australia-rivillä on ilmoitettu Länsi-Australiasta kerätyn *S. morsitans* -näytteen (IZ-130698) ja *S. leki* -näytteen (120857) parittaiset etäisyydet (*S. morsitans* -yksilöltä ei ollut käytettävissä *COI*-sekvenssiä). Sarakkeessa *COI+16S+28S* on otettu huomioon vain ne näytteet, joilta oli käytettävissä kaikkien kolmen merkialueen sekvenssit. Afrikka-rivillä tämän sarakkeen lukuarvo perustuu siksi vain kahden näytteen parittaiseen etäisyyteen: CK0068 (Egypti) ja IZ-130703 (Senegal).

	<i>COI</i>	<i>16S</i>	<i>28S</i>	<i>COI+16S+28S</i>
Afrikka	15,6 (0,2 - 18,4)	14,6 (0,0 - 16,3)	3,2 (0,0 - 10,9)	13,8
Pohjoinen Intian niemimaa	14,0 (0,0 - 15,3)	12,8 (1,8 - 14,4)	1,7 (0,0 - 1,7)	10,9 (1,0 - 11,9)
Eteläinen Intian niemimaa	15,8 (4,8 - 18,3)	12,2 (0,0 - 14,7)	1,7 (0,3 - 5,0)	11,4 (3,9 - 13,0)
Thaimaa-Kambodža	0,2 (0,0 - 2,0)	0,9 (0,4 - 2,0)	0,0 (0,0 - 0,0)	0,4 (0,2 - 1,7)
Thaimaa-Filippiinit	9,5 (0,0 - 12,9)	5,3 (0,0 - 9,1)	0,0 (0,0 - 0,0)	6,8 (0,0 - 10,1)
Australia	x	16,9	2,7	x

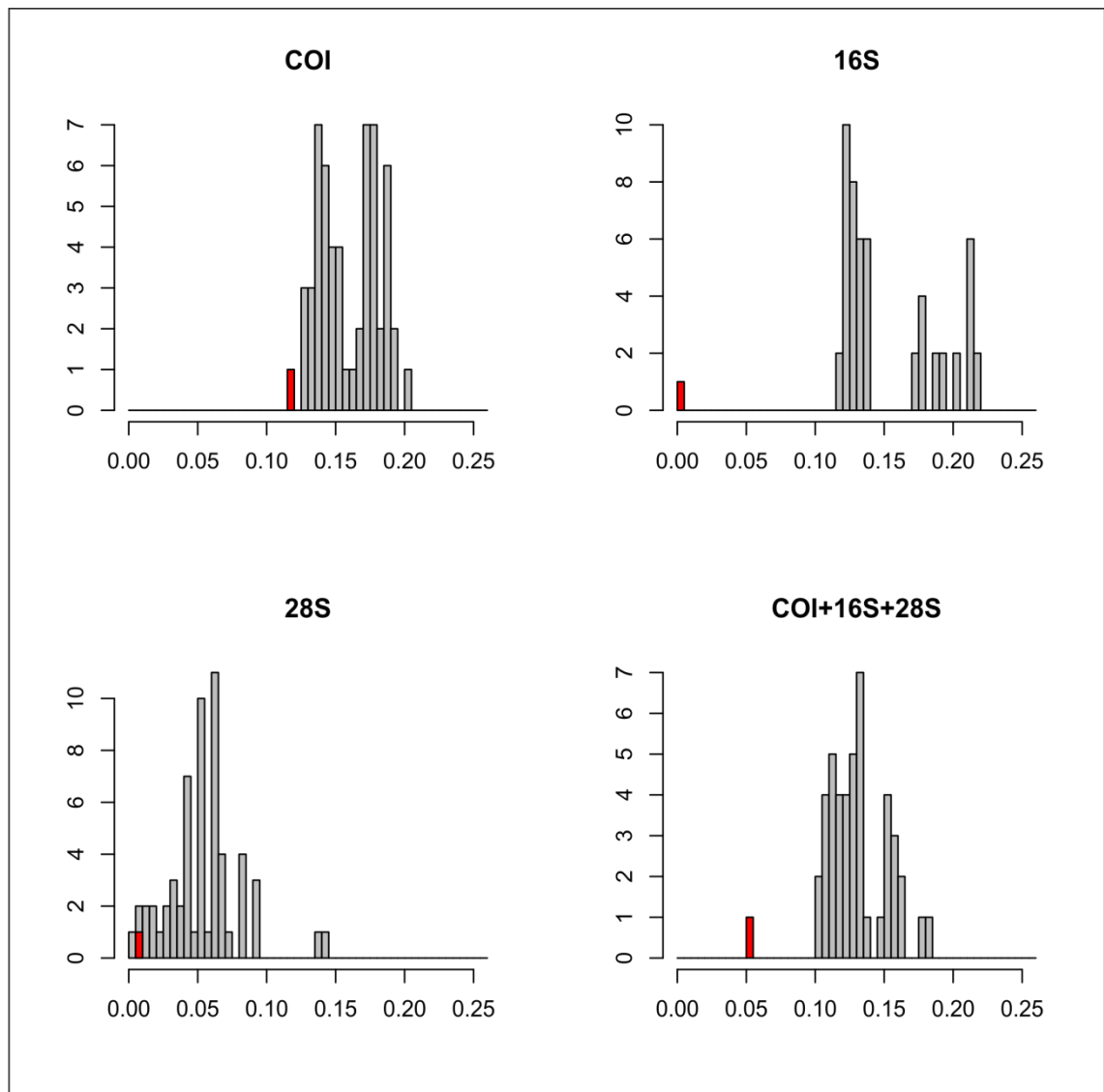
3.2.2 *Scolopendra amazonica*

Aineiston kahden *Scolopendra amazonica* -yksilön parittainen etäisyys oli *COI*-sekvenssillä 12,0 %, *16S*-sekvenssillä 0,0 %, *28S*-sekvenssillä 1,0 % ja ketjutetulla sekvenssillä (*COI+16S+28S*) 5,5 % (taulukko 16). Pienimmät *S. amazonica* -fenotyypin ja *S. morsitans* -lajin väliset etäisyydet olivat *COI*- ja *28S*-sekvensseillä samassa suuruusluokassa kuin fenotyypin sisäiset etäisyydet, mutta *16S*-sekvenssin pienin etäisyys oli selvästi suurempi, 12,0 %. *S. amazonica* -fenotyypin ja *S. morsitans* -lajin mediaanietäisyydet olivat varsinkin *16S*- ja *28S*-sekvenssien suhteen selvästi suurempia kuin *S. amazonica* -fenotyypin sisällä: *COI*-sekvenssillä 16,1 %, *16S*-sekvenssillä 13,5 %, *28S*-sekvenssillä 5,4 % ja ketjutetulla sekvenssillä (*COI+16S+28S*) 12,9 %. *S. amazonica* -lajin ja muiden aineiston *Scolopendra*-lajien väliset mediaanietäisyydet olivat hyvin lähellä *S. morsitans* -lajin vastaavia etäisyyksiä.

S. amazonica -fenotyypin ja *S. morsitans* -lajin etäisyysjakaumakuvaajassa (kuva 7) *S. amazonica* -fenotyypin sisäisen etäisyyden sekä *S. amazonica* -fenotyypin ja *S. morsitans* -lajin välisten etäisyyksien väliin jäi *COI*-sekvenssillä 0,6 prosenttiyksikön aukko välille 12,0 - 12,6 %. *16S*-sekvenssillä aukko oli 12 prosenttiyksikön laajuinen, kun taas *28S*-sekvenssillä aukkoa ei muodostunut lainkaan. Ketjutetulla sekvenssillä 4,6 prosenttiyksikön suuruinen aukko muodostui kohtaan 5,5 - 10,1 %.

Taulukko 16. *S. amazonica* -yksilöiden lajinsisäiset ja lajien väliset parittaiset etäisyydet prosentteina. Ensimmäinen luku on mediaani ja sulkeissa on vaihteluväli. *S. amazonica* -fenotyypin ja *S. morsitans* -lajin parittaisissa etäisyyksissä *S. amazonica* -yksilöt on rajattu pois *S. morsitans* -yksilöiden joukosta.

<i>S. amazonica</i> vs.							
	<i>S. amazonica</i>	<i>S. morsitans</i>	<i>S. antananarivoensis</i>	<i>S. subspinipes</i>	<i>S. cingulata</i>	<i>S. leki</i>	<i>O. multidentis</i>
COI	12,0	16,1 (12,6 - 20,3)	21,6 (21,1 - 22,0)	18,2 (17,9 - 18,4)	19,5 (18,3 - 20,7)	19,9 (19,7 - 20,1)	22,5 (22,4 - 22,6)
16S	0,0	13,5 (12,0 - 21,6)	x	19,8 (19,8 - 19,8)	21,4 (21,4 - 21,4)	16,1 (16,1 - 16,1)	25,3 (25,3 - 25,3)
28S	1,0	5,4 (0,3 - 14,1)	6,4 (6,0 - 6,7)	6,1 (5,5 - 6,6)	6,1 (5,6 - 6,6)	5,9 (5,4 - 6,4)	15,3 (15,3 - 15,3)
COI+16S+28S	5,5	12,9 (10,1 - 18,5)	16,4 (16,0 - 16,8)	16,1 (15,8 - 16,3)	17,2 (16,6 - 17,9)	15,3 (15,3 - 15,3)	21,8 (21,8 - 21,9)



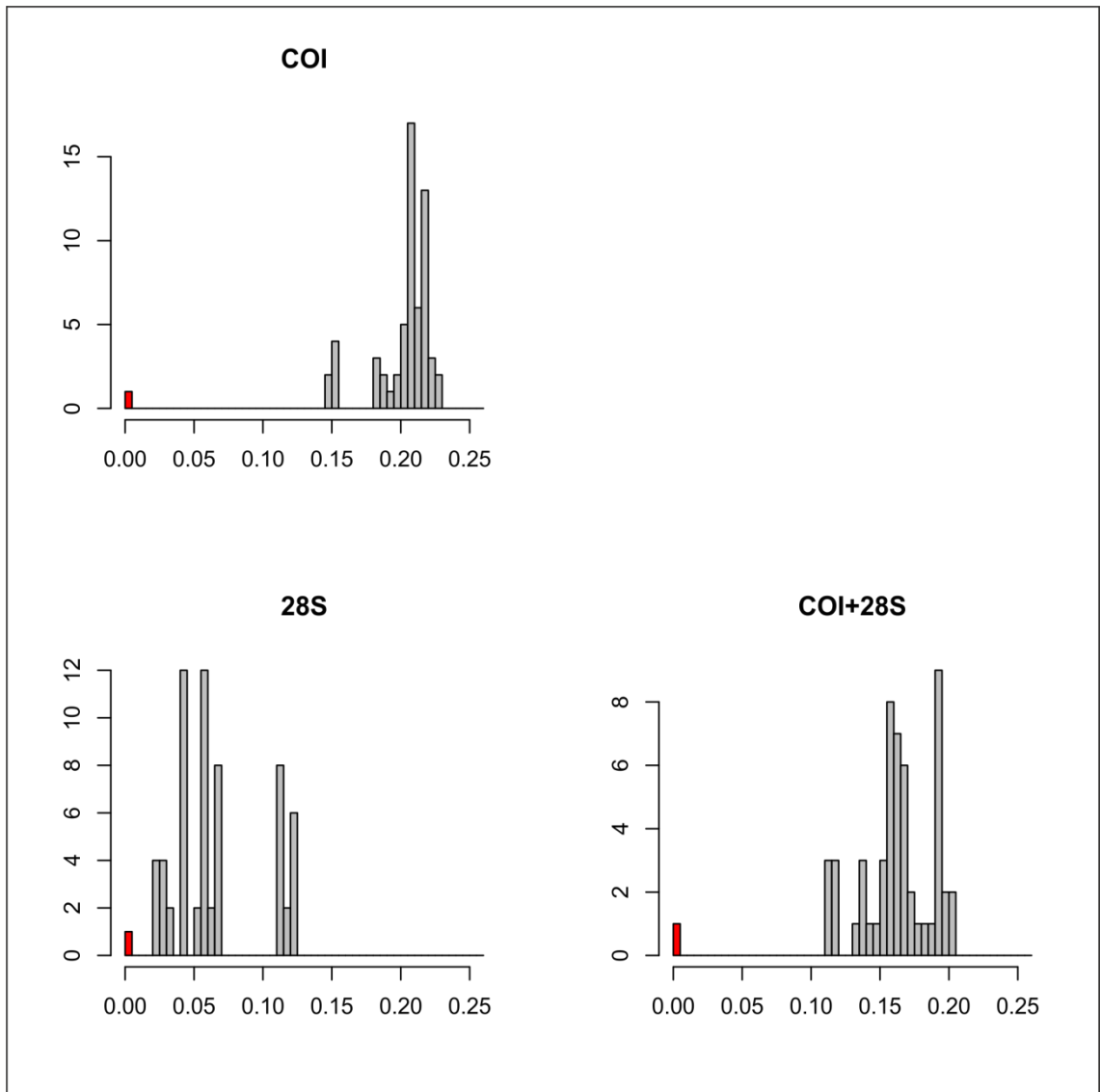
Kuva 7. *S. amazonica* -yksilöiden parittaiset etäisyydet *S. morsitans* -yksilöihin merkkialueittain. Etäisyys (asteikolla 0-1) on merkitty x-akselille ja etäisyysarvojen absoluuttinen lukumäärä y-akselille. *S. amazonica* -fenotyypin sisäiset parittaiset etäisyydet on merkitty punaisella. Ketjutetun sekvenssitiedoston (COI+16S+28S) parittaisten etäisyyksien määrittämisessä huomioitiin ainoastaan yksilöt, joilta oli käytettävissä kolmen merkkialueen sekvenssit.

3.2.3 *Scolopendra antananarivoensis*

Scolopendra antananarivoensis -yksilöiden parittainen etäisyys oli 0,0 % *COI*-sekvenssillä, *28S*-sekvenssillä ja ketjutetulla sekvenssillä (*COI+28S*; taulukko 17); lajilta ei saatu sekvensoitua *16S*-sekvenssiä. *S. antananarivoensis* -lajin ja muiden *Scolopendra*-lajien, mukaan lukien *S. morsitans* -lajin, mediaanietäisyydet olivat vastaavasti *COI*-sekvenssillä noin 20 %, *28S*-sekvenssillä noin 5 % ja ketjutetulla sekvenssillä noin 15 %. Lajinsisäisen etäisyysmitan ja pienimmän *S. morsitans* -lajin ja *S. antananarivoensis* -lajin etäisyyden ero oli *COI*-sekvenssillä 14,6 prosenttiyksikköä, *28S*-sekvenssillä 2,5 prosenttiyksikköä ja ketjutetulla sekvenssillä 11,2 prosenttiyksikköä (taulukko 17, kuva 8).

Taulukko 17. *S. antananarivoensis* -yksilöiden lajinsisäiset ja lajien väliset parittaiset etäisyydet prosentteina. Ensimmäinen luku on mediaani ja sulkeissa on vaihteluväli.

		<i>S. antananarivoensis</i> vs.					
	<i>S. antananarivoensis</i>	<i>S. morsitans</i>	<i>S. amazonica</i>	<i>S. subspinipes</i>	<i>S. cingulata</i>	<i>S. leki</i>	<i>O. multidens</i>
<i>COI</i>	0,0	20,9 (14,6 - 22,7)	21,6 (21,1 - 22,0)	20,3 (20,2 - 20,4)	19,5 (19,4 - 19,6)	17,7 (17,7 - 17,8)	22,6 (22,6 - 22,6)
<i>28S</i>	0,0	5,6 (2,5 - 12,5)	6,4 (6,0 - 6,7)	3,5 (3,5 - 3,5)	4,2 (4,2 - 4,2)	6,5 (6,5 - 6,5)	15,3 (15,3 - 15,3)
<i>COI+28S</i>	0,0	16,4 (11,2 - 20,3)	16,4 (16,0 - 16,8)	14,8 (14,7 - 14,9)	14,5 (14,5 - 14,6)	13,8 (13,7 - 13,8)	20,1 (20,1 - 20,2)



Kuva 8. *S. antananarivoensis* -yksilöiden (näytteet CK0056 ja CK0057) parittaiset etäisyydet *S. morsitans* -yksilöihin merkkialueittain. Etäisyys (asteikolla 0-1) on merkitty x-akselille ja etäisyysarvojen absoluuttinen lukumäärä y-akselille. *S. antananarivoensis* -näytteiden parittainen etäisyys on merkitty punaisella. Ketjutetun sekvenssitiedoston (COI+28S) parittaisten etäisyyksien määrittämisessä jätettiin huomioimatta *S. morsitans* -yksilöt, joilta puuttui COI- tai 28S-sekvenssi. 16S-etäisyyksiä ei voitu laskea, sillä *S. antananarivoensis* -näytteistä ei saatu monistettua 16S-sekvenssiä.

4. POHDINTA

4.1 Lajinsisäinen ja lajien välinen geneettinen muuntelu

Molekyylisystematiikan keskeinen kysymys on, miten keskenään samaan lajiin kuuluvat yksilöt erotetaan eri lajeihin kuuluvista. Fylogenioiden kohdalla periaatteena on, että samaan lajiin kuuluvat yksilöt muodostavat keskenään monofyleettisen ryhmän. Lisäksi oksapituudet vaikuttavat lajirajojen asettamiseen, sillä ne kertovat yksilöiden välillä tapahtuneen evoluution määrästä. Lajin sisällä oksapituudet ovat teoriassa lyhyempiä kuin lajien välillä, mihin perustuu myös tässä tutkimuksessa käytetty bPTP-lajiraja-analyysi. Fylogenioiden lisäksi lajeja voidaan erottaa toisistaan DNA-viivakoodauksella, jossa lajirajat määritetään *COI*-sekvenssin parittaisilla etäisyyksillä. Lajin sisällä parittaiset etäisyydet ovat teoriassa pienempiä kuin lajien välillä. Tarkastelen seuraavaksi, täytyvätkö *Scolopendra morsitans* -laji, *Scolopendra amazonica* -fenotyyppi ja *S. antananarivoensis* -laji nämä lajille tyypilliset piirteet tämän tutkimuksen tulosten valossa. Koska juoksujalkaisten levintä on rajoittunutta, on odotettavaa, että *Scolopendra*-suvun sisällä sukulaisuussuhteet ovat maantieteellisesti järjestyneitä niin lajien sisällä kuin niiden välilläkin.

Tässä tutkimuksessa *Scolopendra morsitans* (mukaan lukien kaksi *Scolopendra amazonica* -fenotyypin yksilöä) ja *Scolopendra antananarivoensis* olivat ainoita lajeja, joihin kuuluvia yksilöitä sisältyi aineistoon enemmän kuin yksi. Mikäli molemmat lajit muodostaisivat todellisessa fylogeniassa oman monofyleettisen ryhmän, näiden lajien nykyinen luokittelutapa olisi pätevä. *S. morsitans* -yksilöt muodostivat kuitenkin molemmissa puissa polyfyleettisen ryhmän (kuvat 3 ja 4). Syynä tähän voi olla alhainen tuki puun tyviosissa tai se, että kyse lajikompleksista, mitä on käsitelty edempänä. *S. amazonica* -fenotyypin yksilöt ja *S. antananarivoensis* -yksilöt muodostivat monofyleettisen ryhmän molemmissa puissa (kuvat 3 ja 4). Puisse oli myös kaksi monofyleettistä ryhmää, joihin kuului eri lajien edustajia. *Scolopendra subspinipes* ja *Scolopendra cingulata* muodostivat monofyleettisen ryhmän sekä parsimoniapuussa (kuva 3; JK<50) että suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4; BS=76), minkä perusteella ne ovat aineistossa toistensa lähimmät sukulaiset. Myös *Scolopendra leki* ja länsiaustralialainen *S. morsitans* -yksilö muodostivat monofyleettisen ryhmän parsimoniapuussa (kuva 3; JK<50) ja suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4;

BS=94). Kyseiset yksilöt ovat ainoat Australian mannerta edustavat näytteet, mikä selittää niiden läheisen sukulaisuussuhteen.

Oksapituuksiin perustuvan bPTP-analyysin mukaan aineistosta ei löytynyt yhtään vähintään kahden juoksujalkaisyksilön muodostamaa lajia, jonka saama tuki olisi ylittänyt merkitsevyyden rajan (PDP=0,95). Tämän tiukan kriteerin mukaan kaikki aineiston 39 juoksujalkaisyksilöä, mukaan lukien 31 *S. morsitans* -yksilöä, kuuluivat keskenään eri lajeihin. Mikäli mahdollisen lajin kriteeriä väljennetään rajaan $PDP \geq 0,50$, *S. morsitans* -yksilöt kuuluivat yhteensä 21 mahdolliseen lajiin, joista 16 sisälsi yhden yksilön ja viisi useamman kuin yhden yksilön (kuvat 3 ja 4). Myös *S. amazonica* -fenotyypin yksilöt kuuluivat kriteerin mukaan keskenään eri lajeihin. Sen sijaan *S. antananarivoensis* -yksilöt kuuluivat analyysin mukaan keskenään mahdollisesti samaan lajiin (kuvat 3 ja 4). Yhdessäkään bPTP-analyysin löytämässä mahdollisessa lajissa ei ollut yksilöitä, jotka kuuluisivat nykyisessä tieteellisessä luokittelussa eri lajeihin.

DNA-viivakoodausta ja parittaisia etäisyysmittoja on käytetty juoksujalkaisilla toistaiseksi hyvin vähän, eikä ryhmän tyypillistä lajinsisäistä *COI*-, *16S*- ja *28S*-geenien muuntelutasoa tiedetä. Myöskään tässä tutkimuksessa mukana olleet viisi *Scolopendra*-lajia ja *Scolopendra amazonica* -fenotyyppi eivät muodosta edustavaa otosta koko *Scolopendra*-suvusta, johon kuuluu noin 90 lajia (Bonato ym. 2011). Tutkimuksen tulokset antavat kuitenkin alustavaa osviittaa siitä, millaisia lajien välisiä ja lajinsisäisiä parittaisia etäisyyksiä *Scolopendra*-suvun sisällä esiintyy. Tutkimuksessa mukana olleiden *Scolopendra*-lajien välinen *COI*-etäisyys oli 14,6 % - 22,7 %, *16S*-etäisyys 14,1 % - 22,7 % ja *28S*-etäisyys 2,5 % - 15,7 % (taulukot 14, 16 ja 17). Parittaiset etäisyydet olivat merkittäviä kaikkien eri lajeihin kuuluvien yksilöiden välillä. Yllättäen merkittäviä etäisyyksiä löytyi myös lajien sisältä; *S. morsitans* -lajilla *COI*-etäisyyksien mediaaniarvo oli 17,1 %, *16S*-etäisyyksien 17,2 % ja *28S*-etäisyyksien 5,4 %. Geneettisesti toisiaan eniten muistuttavat yksilöt olivat sekvensseiltään lähes identtisiä, kun taas suurimmat etäisyysluvut olivat samaa kokoluokkaa kuin lajien väliset parittaiset etäisyydet. *S. amazonica* -yksilöiden *16S*-sekvenssit olivat identtisiä keskenään (taulukko 16) ja *28S*-etäisyyskin oli pieni (1,0 %). Sen sijaan *COI*-etäisyys oli yllättävän suuri samaan lajiin kuuluville yksilöille (12,0 %). *S. antananarivoensis* -yksilöiden *COI*- ja *28S*-sekvenssit (16-sekvenssiaineistoa ei ollut käytettävissä) olivat identtisiä keskenään (taulukko 17), mikä on odotettava tulos saman lajin sisällä.

Havainnot asettavat kyseenalaiseksi *S. morsitans* -lajin aseman lajina. *S. amazonica* -fenotyypin ja *S. antananarivoensis* -lajin osalta tulokset sen sijaan tukevat nykyisessä luokittelussa pitäytymistä. Seuraavissa kappaleissa käsitellään tarkemmin tulosten merkitystä *S. morsitans* -lajin, *S. amazonica* -fenotyypin ja *S. antananarivoensis* -lajin taksonomisen aseman kannalta.

4.2 Onko *Scolopendra morsitans* laji vai lajikompleksi?

Scolopendra morsitans -lajin geneettinen muuntelu on sekä maantieteellisesti järjestäytyneitä että paljon odotettua suurempaa kaikilla analyysimenetelmillä arvioituna. Tuloksista nousee esille kolme seikkaa, jotka haastavat erityisesti *Scolopendra morsitans* -lajin aseman lajina. Ensiksi, *S. morsitans* -laji osoittautui kummassakin puussa polyfyleettiseksi ja suurimman uskottavuuden puussa oli suuria oksapituuksia näytteiden välillä tapahtuneen evoluution merkkinä. Toiseksi, *S. morsitans* -yksilöt jakautuvat vähintään 21 mahdolliseen lajiin bPTP-analyysissä. Kolmanneksi, *S. morsitans* -lajin parittaisten etäisyyksien vaihteluväli on huomattavan suuri. Tulosten perusteella nykyisen luokittelun mukainen *S. morsitans* -laji on tosiasiaa useista kryptisistä lajeista koostuva lajikompleksi, jonka revisio on aiheellinen.

Scolopendra morsitans -lajin polyfyleettisyydelle (kuvat 3 ja 4) on kaksi mahdollista selitystä. Ensimmäinen vaihtoehto on, että kyseessä on lajikompleksi, johon kuuluvat lajit muodostavat monofyleettisen ryhmän muiden *Scolopendra*-lajien kanssa, mutta keskenään ainoastaan polyfyleettisen ryhmän. Toinen vaihtoehto on, että laji on monofyleettinen ja puut eivät vastaa lajin todellista evoluutiohistoriaa. Jälkimmäistä vaihtoehtoa tukee se, että puiden tyviosat jäivät vaille tukea. Toisaalta fylogeniati, myös niiden tyviosat, oli ratkaistu molemmissa puissa lähes kokonaan. Tyviosien puuttuva tuki taas on selitettävissä suurella geneettisen muuntelun asteella. Näin ollen todennäköisempänä vaihtoehtona voidaan pitää sitä, että *S. morsitans* on polyfyleettinen lajikompleksi.

Myös bPTP-lajiraja-analyysin tulokset (kuvat 3 ja 4) sopivat yhteen lajikompleksihypoteesin kanssa. Kaikki analyysin löytämät mahdolliset lajit ovat maantieteellisesti järjestäytyneitä, sillä lajien esiintymisalueet rajoittuivat yhden maan

tai naapurimaiden sisälle. bPTP-analyysin tulosten uskottavuutta lisää se, että ne korreloivat parittaisten etäisyyksien kanssa (liite 3): samaan lajiin kuuluvilla yksilöillä oli myös pienimmät parittaiset etäisyydet. Toistaiseksi on kuitenkin epäselvää, kuinka luotettava lajirajojen määrittämismenetelmä bPTP-analyysi on. Eräässä tutkimuksessa menetelmän asettamat lajirajat poikkesivat muiden vastaavien menetelmien ja perinteisesti käytetyn morfologisen tuntomerkin mukaisista lajirajoista (Wei ym. 2016). Lisäksi kaikkien puuhun sisältyvien näytteiden sukulaisuuden aste ja ulkoryhmän valinta näyttävät vaikuttavan siihen, pitääkö analyysimenetelmä tiettyä näyteparia samaan lajiin kuuluvana (Varpu Vahtera, henkilökohtainen tiedonanto). Analyysin antama informaatio pitää näin ollen suhteuttaa muihin tuloksiin, eikä bPTP-lajirajoja tule pitää sitovana tietona aineiston todellisista lajirajoista.

Fylogeneettisten puiden ohella vahvin todiste siitä, että *S. morsitans* on lajikompleksi, löytyy lajinsisäisistä parittaisista etäisyysmitoista, joissa on poikkeuksellisen suurta hajontaa (kuva 6, taulukko 14). Tulosten uskottavuutta lisää se, että toisiaan eniten muistuttavat yksilöt on poikkeuksetta kerätty samoilta maantieteellisiltä alueilta ja eri geenialueiden parittaiset etäisyydet korreloivat keskenään (liite 3). Suurimmat lajinsisäiset parittaiset etäisyydet, yli 20 %, olivat samassa suuruusluokassa kuin havaitut *Scelopendra*-suvun lajien väliset etäisyydet. Todennäköinen selitys asialle on, että vain osa etäisyysmitoista edustaa todellisia lajinsisäisiä etäisyyksiä ja loput ovat lajikompleksiin sisältyvien kryptisten lajien välisiä etäisyyksiä. Ongelmana on näiden välisen rajan määrittely. Perinteinen tapa olisi valita viivakoodausaukoksi etäisyysjakauman suurin aukko (kuva 6, valkoiset nuolet). Ainakin 28S-sekvenssin jakaumassa suurin aukko sijaitsee epärealistisen oikealla viivakoodausaukoksi, eikä suurin aukko ole itsestään selvästi sopiva lajien erottamiseen varsinkaan pienehköllä aineistolla. Toinen vaihtoehto on bPTP-lajirajojen osoittama viivakoodausaukko (kuva 6, mustat nuolet), joka sijaitsee vasemmalla suurimpiin aukkoihin verrattuna *COI*-, *16S*- ja *28S*-sekvensseillä. Ketjutetulla sekvenssillä suurin aukko ja bPTP-viivakoodausaukko sijaitsevat samassa kohdassa, mutta jakauman otos on muita pienempi puuttuvien sekvenssien vuoksi. *S. morsitans* -aineiston parittaisista etäisyyksistä ei täten voida määrittää lajirajoja yksiselitteisellä tavalla.

Koska nykyluokituksen mukainen *S. morsitans* -laji osoittautui tässä tutkimuksessa lajikompleksiksi, sille on syytä suorittaa revisio, jossa laji jaetaan. Eri menetelmillä saadut tulokset ovat yhteneviä sen suhteen, että lajikompleksin geneettinen muuntelu on

maantieteellisesti järjestäytyntä. Lisäksi samat yksilöt muistuttavat toisiaan eri menetelmillä mitattuna. Tulokset eivät kuitenkaan ole täysin yksiselitteisiä sen suhteen, mihin lajirajat tulisi asettaa *S. morsitans* -lajikompleksin sisällä. Mikäli lajirajat määritettäisiin suurimman *COI*-etäisyysjakaumassa olevan aukon tai bPTP-analyysin perusteella, *S. morsitans* -lajikompleksi jakautuisi noin 20 lajiin. Tällöin putatiivisten lajien morfologiset erot olisivat tuntemattomia. Kun eri lajeja esiintyisi myös samojen maantieteellisten alueiden sisällä, lajinmäärittämisestä tulisi hyvin vaikeaa. Käytännössä lajinmäärittäminen perustuisi yksinomaan sekvenssieroihin, eikä tällaisten lajien kuvaaminen ole mielekästä. Vaikka parittaiset etäisyydet vahvistavat *S. morsitans* -lajin lajikompleksiksi, niitä ei voi tässä tapauksessa suoraan käyttää lajirajojen määrittämiseen. Tämän vuoksi lajirajojen määrittämisessä on nojattava ensi sijassa fylogenieoihin ja tiedossa oleviin fenotyypisiin eroihin.

Kun tuloksia tarkastellaan kokonaisuutena, parhaiten perusteltavissa oleva ratkaisu on käsitellä *S. morsitans* -lajikompleksia kuutena maantieteellisesti jakautuneena ryhmänä: Afrikka, Pohjoinen Intian niemimaa, Eteläinen Intian niemimaa, Thaimaa-Kambodža, Thaimaa-Filippiinit ja Australia (kuvat 3 ja 4, taulukko 15). On toistaiseksi epäselvää, edustavatko ryhmät biologisen lajikäsityksen (BSC) mukaisia lajeja vai esimerkiksi sukuja, mutta käsitelen niitä tässä tutkimuksessa putatiivisin lajeina. Neljä ryhmää, Afrikka, Thaimaa-Kambodža ja Thaimaa-Filippiinit ja Australia, täyttää fylogeneettisen lajikäsityksen (PSC) mukaisen määritelmän lajille, sillä ne ovat monofyleettisiä molemmissa puissa. Sen sijaan Intian niemimaalle sijoittuvat kaksi ryhmää esiintyvät puissa polyfyleettisinä, eivätkä ne siten vastaa PSC-lajikäsitystä. Sekvenssierojen lisäksi ainakin osa ryhmistä on mahdollisesti erotettavissa toisistaan morfologian perusteella, sillä *S. morsitans* -lajilla on omat fenotyypinsä Afrikassa, Intian niemimaalla ja Kaakkois-Aasiassa (Christian Kronmüller, henkilökohtainen tiedonanto). Useimmissa ryhmistä sisältyy suurta geneettistä muuntelua (taulukko 15), minkä valossa on mahdollista, että ryhmiin itseensä sisältyy kryptisiä lajeja. Asian selvittäminen vaatii kuitenkin lisätutkimuksia suuremmalla aineistolla. Nykytiedon valossa parhaiten perusteltavissa oleva ratkaisu on korottaa ainakin osa ryhmistä lajin asemaan. Seuraavissa kappaleissa käsitellään näitä *S. morsitans* -lajikompleksiin sisältyviä putatiivisia kryptisiä lajeja. Lajien haarautumisjärjestys jää osin avoimeksi puiden tyvien tuen puuttuessa.

4.2.1 Afrikka

Manner-Afrikasta kerätyt yhdeksän *Scolopendra morsitans* -näytettä muodostavat monofyleettisen ryhmän sekä parsimoniapuussa (kuva 3) että suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4). Suurimman uskottavuuden puussa ryhmä on hyvin tuettu (BS=100) ja parsimoniapuussa kohtalaisesti tuettu (JK=64), joten tulosta voidaan pitää luotettavana. Afrikkalaisen *S. morsitans* -ryhmän sisällä geneettinen muuntelu on maantieteellisesti järjestäytyntä. Kummassakin puussa ryhmästä erkanevat ensimmäisenä kolmen mosambikilaisen yksilön muodostama monofyleettinen ryhmä (JK=67, BS=100). Kaksi egyptiläistä yksilöä ovat toistensa lähimmät sukulaiset molemmissa puissa (JK=98, BS=100), samoin läntisestä Afrikasta peräisin olevat gambialainen ja senegalilainen yksilö (JK=100, BS=100). Suurimman uskottavuuden puussa tunisialainen yksilö muodostaa monofyleettisen ryhmän egyptiläisen näyteparin kanssa (BS=99), samoin eteläafrikkalainen yksilö gambialaisen ja senegalilaisen yksilön kanssa (BS=66). Sen sijaan parsimoniapuussa tunisialaisen ja eteläafrikkalaisen yksilön keskinäinen lajiutumisyhteisyys jää ratkaisematta kladissa, johon kuuluvat kaikki afrikkalaiset *S. morsitans* -yksilöt mosambikilaisia yksilöitä lukuun ottamatta (JK=56).

bPTP-analyysin (kuvat 3 ja 4) mukaan mosambikilaiset yksilöt kuuluvat keskenään samaan mahdollisen lajiin (PDP=0,92), samoin egyptiläiset näytteet, joiden saama tuki oli tosin heikko (PDP=0,51). Loput afrikkalaiset näytteet ovat analyysin mukaan lajiensa ainoita edustajia. Afrikka-ryhmän sisällä parittaiset etäisyydet (taulukko 15) ovat keskimäärin korkeita: *COI*- ja *16S*-sekvensseillä mediaanietäisyys on noin 15 % ja *28S*-sekvensseilläkin noin 3 %. Toisiaan eniten muistuttavat sekvenssit ovat lähes identtisiä ja suurimmat etäisyydet ovat samaa kokoluokkaa kuin aineistossa havaitut lajien väliset etäisyydet.

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella afrikkalainen *S. morsitans* -ryhmä jakautuu pohjoiseen (Egypti ja Tunisia), läntiseen (Gambia, Senegal ja Etelä-Afrikka) ja kaakkoiseen (Mosambik) genotyyppiin. Eteläafrikkalainen yksilö on yllättävän kaukaista sukua mosambikilaisille yksilöille maantieteelliseen etäisyyteen nähden. Vastaavasti mosambikilaiset *S. morsitans* -näytteet ovat kaukaista sukua madagaskarilaisille *S. antananarivoensis* -näytteille, mikä selittyy näytteiden välisellä lajirajalla. Lisäksi havainto sopii yhteen sen kanssa, että Madagaskar on eliömaantieteellisesti muusta Afrikasta erillistä aluetta.

Tulosten perusteella afrikkalainen *S. morsitans* -genotyyppi erottuu muusta *S. morsitans* -aineistosta ennen kaikkea monofyleettisyytensä perusteella. Monofyleettisyys tukee myös afrikkalaisen *S. morsitans* -tyypin korottamista lajin asemaan. Christian Kronmüllerin (henkilökohtainen tiedonanto) mukaan afrikkalaisilla *S. morsitans* -yksilöillä on myös omanlaisensa fenotyyppi, mitä on käsitelty edellä johdannossa. Tietävästi afrikkalaisten *S. morsitans* -yksilöiden fenotyyppiä ei kuitenkaan ole aiemmissa tutkimuksissa verrattu muilta mantereilta kerättyihin yksilöihin. On myös mahdollista, että *S. morsitans* -lajikompleksiin kuuluu useita kryptisiä afrikkalaisia lajeja, sillä afrikkalaisen *S. morsitans* -ryhmän sisäiset parittaiset etäisyydet ja suurimman uskottavuuden puun oksapituudet olivat keskimäärin suuria. Ajatuksen kanssa sopii yhteen se, että afrikkalainen *S. morsitans* on aiemmassa tutkimuksessa todettu fenotyypiltään hyvin vaihtelevaksi ja tämä muuntelu on ollut maantieteellisesti järjestäytyntä (Lewis 1969). Tämänhetkinen tutkimusnäyttö ei kuitenkaan kerro, miten jakolinjat tulisi asettaa afrikkalaisen *S. morsitans* -ryhmän sisällä. Suurimman uskottavuuden puussa esiintyvät pohjoinen, läntinen ja kaakkoinen genotyyppi saattavat edustaa lajeja, mutta ainakin pohjoisen ja läntisen ryhmän sisälle jäisi silti huomattavaa geneettistä muuntelua. Monofyleettisyyden perusteella afrikkalainen *S. morsitans* on joka tapauksessa geneettisesti erillinen ja siten validi taksoni, joten nykytiedon valossa perustelluin vaihtoehto on afrikkalaisen genotyypin kohottaminen lajin tai lajikompleksin asemaan kokonaisuudessaan.

4.2.2 Pohjoinen ja eteläinen Intian niemimaa

Tutkimuksessa *Scolopendra morsitans* -lajikompleksin geneettinen muuntelu oli suurinta Intian niemimaalla. Puiden perusteella alueelta kerätyt yksilöt voidaan jakaa kahteen ryhmään, pohjoiseen ja eteläiseen (kuvat 3 ja 4). Kumpikaan ryhmistä ei ole monofyleettinen molemmissa puissa, joten näyttö ei riitä niiden pitämiseen esimerkiksi erillisinä lajeina. Jakolinja pohjoisen ja eteläisen ryhmän välillä on kuitenkin perusteltu, sillä ryhmien jäsenet esiintyvät molemmissa puissa erillään toisistaan.

Pohjoisen ryhmän muodostavat kashmirilainen yksilö, kolme pakistanilaista yksilöä ja yksi intialainen yksilö, jonka tarkempi keräyspaikka ei ole tiedossa. Parsimoniapuussa (kuva 3) ryhmä on monofyleettinen heikolla tuella (JK=50). Suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4) ryhmä on parafyleettinen sijoittuen puun tyvelle ja muodostaen

monofyleettisen ryhmän kaikkien analyysin *Scolopendra*-yksilöiden kanssa (BS<50). Ryhmä jakautuu kummassakin puussa kahteen monofyleettiseen ryhmään, joista toiseen kuuluvat kaksi pakistanilaista yksilöä ja intialainen yksilö (JK=100, BS=100) ja toiseen kashmirilainen yksilö ja yksi pakistanilaisista yksilöistä (JK=100, BS=100).

Eteläinen ryhmä muodostuu neljästä eteläintialaisesta ja yhden länsi-intialaisesta *S. morsitans* -yksilöstä sekä kahdesta Etelä-Intiasta kerätystä *Scolopendra amazonica* -yksilöstä. Ryhmä on parafyleettinen kummassakin puussa. Parsimoniapuussa (kuva 3) ryhmä muodostaa monofyleettisen ryhmän Thaimaasta, Kambodžasta ja Filippiineiltä kerättyjen kanssa yksilöiden kanssa (JK=99). Suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4) ryhmä muodostaa vastaavasti monofyleettisen ryhmän Thaimaasta ja Kambodžasta kerättyjen yksilöiden kanssa heikolla tuella (BS<50). Ryhmän kaikkien jäsenten tarkat keräyspaikat tunnetaan. Eteläisestä Intiasta kerätyt kuusi yksilöä jakautuvat molemmissa puissa kolmeen monofyleettiseen ryhmään siten, että samasta paikasta kerätyt näytteet muodostavat parin (JK=98-100, BS=100). Läntisestä Intiasta kerätty yksilö esiintyy parsimoniapuussa omana haaranaan (JK<50) ja muodostaa suurimman uskottavuuden puussa monofyleettisen ryhmän *S. amazonica* -yksilöiden kanssa (BS=75).

bPTP-lajiraja-analyysin (kuvat 3 ja 4) mukaan vain kolme Intian niemimaalta peräisin olevaa yksilöä, kaksi pakistanilaista ja yksi intialainen yksilö, kuuluvat mahdollisesti keskenään samaan lajiin (PDP=0,81). Näiden näytteiden väliset parittaiset etäisyydet olivat myös aineiston pienimpien parittaisten etäisyyksien joukossa (liite 3). Kuten Afrikan kohdalla, myös Intian niemimaalla parittaisissa etäisyyksissä oli suurta hajontaa (taulukko 15). Pohjoisen ja eteläisen ryhmän sisällä mediaanietäisyydet olivat *COI*-sekvenssillä noin 14 - 16 %, mikä vastaa tutkimuksessa mukana olleiden *Scolopendra*-lajien välistä keskimääräistä etäisyyttä. Pohjoisessa ryhmässä pienin *COI*-etäisyys oli 0 %, mutta eteläisessä ryhmässä melkein 5 %. *16S*-sekvenssillä mediaanietäisyys oli molemmissa ryhmissä korkea, noin 12 - 13 %, ja *28S*-sekvenssilläkin melko korkea (1,7 %).

Intian niemimaalta kerätyssä *S. morsitans* -aineistossa geneettinen muuntelu on erityisen suurta kaikilla käytössä olleilla mittareilla arvioituna. Alueelta peräisin olevat yksilöt jakautuivat eri osiin puita, varsinkin *COI*- ja *16S*-sekvenssien parittaiset etäisyydet olivat suuria ja bPTP-analyysin mukaan suurin osa yksilöistä ei kuulunut keskenään

samaan lajiin. Tämän valossa on todennäköistä, että *S. morsitans* -lajikompleksi koostuu Intian niemimaalla useasta lajista. Päätelmää tukee myös vaihteleva fenotyyppi (Jangi 1955; Jangi 1959), joka on johtanut muun muassa kiistaan *S. amazonica* -fenotyypin asemasta lajina. Tämän tutkimuksen tulokset eivät kuitenkaan riitä kertomaan, miten lajikompleksi tulisi jakaa Intian niemimaalla. Puiden perusteella pohjoinen ja eteläinen genotyyppi eroavat toisistaan, mutta kumpikaan näistä kahdesta ryhmästä ei täytä fylogeneettistä lajikäsitystä. Pohjoinen Intian niemimaa oli parsimoniapuussa monofyleettinen hyvin heikolla tuella, mutta tulosta ei voi pitää täysin luotettavana, koska se on ristiriidassa suurimman uskottavuuden puun kanssa. Christian Kronmüllerin mukaan *S. morsitans* -lajilla on oma fenotyyppi Intian niemimaalla (henkilökohtainen tiedonanto, kts. johdanto), mutta tiedossa ei ole morfologisia seikkoja, jotka erottaisivat pohjoisen ja eteläisen ryhmän toisistaan. Nykyisen näytön valossa pohjoista ja eteläistä genotyyppiä ei siis voida nostaa lajin asemaan. Myöskään monofyleettisiä ryhmiä ei ole mielekäästä käyttää uusien lajien kuvaamisessa, sillä Intian niemimaan kaikki vahvasti tuetut monofyleettiset ryhmät koostuvat 2-3 yksilöstä, joiden fenotyypistä ei ole tarkempaa tietoa *S. amazonica* -yksilöitä lukuun ottamatta.

Tämän tutkimuksen tulosten valossa on todennäköistä, että *S. morsitans* -lajikompleksi koostuu Intian niemimaalla useasta lajista. Geneettinen muuntelu oli alueella erityisen suurta, mikä tukee aiemmin esitettyä hypoteesia (Joshi & Karanth 2011) Intian niemimaasta *Scolopendra*-suvun lajeihin jakautumisen tapahtumapaikkana. Alueelta kerätyn aineiston lajirajoja ei kuitenkaan voida määrittää ennen jatkotutkimuksia. Konservatiivisemmän geenialueen lisääminen sekvenssiaineistoon saattaa lisätä puiden tyviosien tukea ja selventää, onko Intian niemimaalta kerätyn aineiston parafyleettisyys fylogenian todellinen ominaisuus vai johtuuko se suuren muuntelun aiheuttamasta näytön puutteesta.

4.2.3 Thaimaa-Kambodža ja Thaimaa-Filippiinit

Kaakkoisaasialaiset *Scolopendra morsitans* -yksilöt jakautuvat puissa kahteen ryhmään, joita kutsutaan tässä nimillä Thaimaa-Kambodža ja Thaimaa-Filippiinit. Thaimaa-Kambodža -ryhmän kuuluu yksi kambodžalainen ja viisi thaimaalaista *S. morsitans* -yksilöä, jotka muodostavat hyvin tuetun monofyleettisen ryhmän sekä parsimoniapuussa (kuva 3, JK=100) että suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4, BS=100). Ryhmän sisällä haarautumisjärjestys on samanlainen molemmissa puissa ja se

on melko yhteneväinen keräyspaikkojen maantieteellisten etäisyyksien kanssa. Suurimman uskottavuuden puussa ryhmän sisäiset oksapituudet ovat erittäin lyhyitä (kuva 4). bPTP-lajiraja-analyysin mukaan kaikki ryhmän jäsenet kuuluvat keskenään samaan mahdolliseen lajiin melko vahvalla tuella (kuvat 3 ja 4, PDP=0,90). Ryhmän sisällä parittaisten etäisyyksien maksimiarvo on *COI*- ja *16S*-sekvensseillä 2 % ja *28S*-sekvensseillä 0 % (taulukko 15), mikä vastaa niveljalkaisilla havaittua lajinsisäistä (*COI*-sekvenssin) muuntelun tasoa.

Thaimaa-Filippiinit -ryhmään kuuluu kolme *S. morsitans* -yksilöä Filippiineihin kuuluvalla Cebun saarelta ja kaksi Luoteis-Thaimaasta kerättyä yksilöä, jotka muodostavat hyvin tuetun monofyleettisen ryhmän sekä parsimoniapuussa (kuva 3, JK=100) että suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4, BS=100). Haarautumisjärjestys on sama kummassakin puussa ja kaikissa haarautumiskohdissa on merkitsevä tukiarvo. Ryhmästä haarautuvat ensimmäisinä thaimaalaiset yksilöt. Filippiiniläiset yksilöt muodostavat keskenään monofyleettisen ryhmän molemmissa puussa. Suurimman uskottavuuden puussa filippiiniläisten yksilöiden keskinäiset oksapituudet ovat lyhyitä ja bPTP-lajiraja-analyysi erottaa filippiiniläiset yksilöt omaksi mahdolliseksi lajiksi melko korkealla tuella (kuvat 3 ja 4, PDP=0,89). Ryhmän sisällä parittainen mediaanietäisyys on *COI*-sekvenssillä noin 10 %, *16S*-sekvenssillä noin 5 % ja *28S*-sekvenssillä 0 % (taulukko 15).

Maantieteelliset etäisyydet selittävät thaimaalaisten yksilöiden jakautumisen kahteen fylogeneettisesti erilliseen ryhmään (kuva 5). Osaa tässä tutkimuksessa käytetyistä kaakkoisaasialaisista *S. morsitans* -näytteistä, kuutta thaimaalaista ja yhtä kambodžalaista, on tutkittu jo aiemmin. Yksilöt jakautuivat fylogeneettisessä analyysissä kahteen ryhmään samalla tavalla kuin tässäkin tutkimuksessa (Siriwut ym. 2015a). Lisäksi kahden ryhmän välillä havaittiin myös morfologinen eroavaisuus. Värimuodolla 1 (vastaa Thaimaa-Kambodža -ryhmää) tuntosarvet, pää, ensimmäinen ja kaksi viimeistä selkakilpeä sekä viimeinen raajapari ovat väriltään oransseja, kun taas värimuodolla 2 (vastaa Thaimaa-Filippiinit -ryhmää) samat rakenteet ovat tummia (Siriwut ym. 2015a).

Sekä Thaimaa-Kambodža -ryhmä että Thaimaa-Filippiinit -ryhmä täyttävät fylogeneettisen lajikäsityksen kriteerit. Lisäksi Thaimaa-Kambodža -ryhmän jäsenet kuuluvat kiistatta keskenään samaan lajiin parittaisilla etäisyyksillä mitattuna ja

mahdollisesti myös bPTP-analyysillä mitattuna. Myös Thaimaa-Filippiinit -ryhmän kohdalla parittaiset etäisyydet ovat keskimäärin odotettavalla lajinsisäisellä tasolla ainakin 16S- ja 28S-sekvenssien suhteen, joskin suurimmat COI- ja 16S-sekvenssien etäisyydet lähestyvät lajien välistä tasoa (taulukko 15). Tässäkin ryhmässä geneettisen muuntelun määrä on kuitenkin selvästi pienempi kuin tutkimuksen *S. morsitans* -aineistossa keskimäärin. Kun otetaan lisäksi huomioon ryhmien välinen värierio, sekä geneettiset että morfologiset tekijät tukevat näiden kahden ryhmän korottamista lajin asemaan.

4.2.4 Australia

Aineiston kaksi Australian mantereelta peräisin olevaa juoksujalkaisyksilöä, länsiaustralialaiset *Scolopendra morsitans* ja *Scolopendra leki* muodostivat kummassakin puussa monofyleettisen ryhmän. Parsimoniapuussa (kuva 3) ryhmän saama tuki oli merkitsevyyden rajalla (JK=50) ja suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4) ryhmä oli vahvasti tuettu (BS=94). Australialaiset yksilöt muodostivat monofyleettisen ryhmän Eteläinen Intian niemimaa -, Thaimaa-Kambodža - ja Thaimaa-Filippiinit -ryhmien kanssa sekä parsimoniapuussa (JK=52) että suurimman uskottavuuden puussa (BS=100).

Australialaisen *S. morsitans* -yksilön ryhmittäminen *S. leki* -yksilön kanssa ei ole yllättävää, sillä kummatkin näytteet ovat peräisin alueelta, joka on hyvin kaukana muista keräyspaikoista. Yksilöitä ei kuitenkaan ole syytä epäillä saman lajin edustajiksi. *S. morsitans* -lajin lisäksi Australiassa tavataan kolmea *Scolopendra*-suvun lajia (Colloff ym. 2005): *Scolopendra subspinipes*, *Scolopendra leki* ja *Scolopendra laeta* Haase (1887). Yksinomaan Australiassa esiintyvät *S. leki* ja *S. laeta* muistuttavat fenotyypiltään suuresti *S. morsitans* -lajia, mutta aiempien tutkimusten perusteella kyse ei ole samasta lajista (Waldock & Edgecombe 2012; Vahtera ym. 2013). Myös tämän tutkimuksen tulokset tukevat lajien erillisyyttä. Suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4) ryhmän sisäiset oksapituudet ovat samassa suuruusluokassa kuin *Scolopendra cingulata* - ja *S. subspinipes* -yksilöiden muodostaman ryhmän sisällä. Vastaavasti bPTP-analyysi ei määrittele yksilöitä saman lajin edustajiksi. Lisäksi näytteiden väliset parittaiset etäisyydet ovat tyypillisellä lajien välisellä tasolla (taulukko 15). *S. morsitans* -yksilöltä ei saatu monistettua COI-sekvenssiä, joten kaikki tulokset perustuvat sen osalta 16S- ja 28S-sekvensseihin.

Australialainen *S. morsitans* -yksilö oli tässä tutkimuksessa lähempää sukua *S. leki* -yksilön kuin aasialaisen ja afrikkalaisen *S. morsitans* -aineiston kanssa. Tulosten perusteella australialainen *S. morsitans* -tyyppi eroaa muista *S. morsitans* -populaatioista siinä määrin, että sen jakaminen omaksi lajikseen on perusteltua. Koch (1983) tutki australialaisista *S. morsitans* -yksilöistä kahdeksaa morfologista tuntomerkkiä, joissa ilmeni runsaasti muuntelua populaatioiden sisällä mutta vähän niiden välillä. Morfologisista seikoista lajijakoa tukee se, että australialaiselle populaatiolle on tyyppillistä raidallinen väritys (Gregory Edgecombe, henkilökohtainen tiedonanto), joskin värityksessä on myös huomattavaa vaihtelua (Koch 1983).

Tämän tutkimuksen aineistoon kuului ainoastaan yksi australialainen *S. morsitans* -yksilö. Tarkemman kuvan saaminen australialaisesta *S. morsitans* -populaatiosta vaatii molekyyliSYSTEMAATTISIA lisätutkimuksia useammalla näyteyksilöllä. Erityisen kiinnostavaa olisi tutkia lajinsisäistä geneettistä muuntelua australialaisen populaation sisällä. *S. morsitans* -laji on 1900-luvun aikana levittäytynyt koko Manner-Australiaan ilmeisesti vieraslajina (Koch 1983). Mikäli vieraslajioletus pitää paikkansa, on odotettavaa, että australialaisen *S. morsitans* -populaation geneettinen muuntelu on melko vähäistä. Toisaalta tämän tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että *S. leki* -lajin ja australialaisen *S. morsitans* -populaation välillä on ollut geenivirtaa jossakin kohdassa niiden yhteistä historiaa Australian mantereella.

4.3 Onko *Scolopendra amazonica* oma lajinsa?

Scolopendra morsitans -lajin morfologinen monimuotoisuus on johtanut lukuisiin yrityksiin kuvata lajin yksilöitä uusina lajeina ja myös jakaa laji alalajeihin. Ennen tätä tutkimusta pyrkimykset eivät kuitenkaan ole johtaneet tyydyttävien taksonomisten jakolinjojen syntyyn, sillä tiedossa olevat morfologiset tuntomerkit eivät ole muodostaneet riittävää näyttöä siitä, miten laji tulisi jakaa. Myöskään *Scolopendra amazonica* -fenotyypillä ei ole ollut lajin asemaa viimeisimmän synonymisoinnin (Würmli 1975) jälkeen. Käsitys *S. amazonica* -fenotyypistä Intian niemimaalla elävänä erillisenä lajina kuitenkin elää edelleen (Lewis 2010; Joshi & Karanth 2011), minkä vuoksi asiaan palaaminen on mielekästä. Jotta *S. amazonica* -fenotyypin asemaa voidaan arvioida, on ensimmäiseksi selvitettävä, kuuluvatko *S. amazonica* -fenotyypin yksilöt keskenään samaan lajiin sekvenssiaineiston perusteella. Toiseksi on selvitettävä,

eroavatko *S. amazonica* -yksilöt sekvenssien perusteella aineiston *S. morsitans* -yksilöistä siinä määrin, että yksilöitä on perusteltua pitää eri lajeihin kuuluvina.

Aineiston *S. amazonica* -yksilöiden välillä on suhteellisen paljon geneettistä muuntelua. Yksilöt ovat vahvalla tuella toistensa lähimpiä sukulaisia sekä parsimoniapuussa (kuva 3, JK=100) että suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4, BS=100). Fenotyypin sisällä *COI*-sekvenssien parittainen etäisyys (12,0 %) lähestyy aineistossa havaittuja lajien välisiä etäisyyksiä (taulukko 16). Sen sijaan *16S*-sekvenssien etäisyys on selvästi tyypillistä lajinsisäistä tasoa (0,0 %) ja *28S*-sekvenssienkin etäisyys on melko pieni (1,0 %). Kokonaisuutena tulokset kallistuvat puoltamaan sitä, että *S. amazonica* -fenotyypin yksilöt tulisi luokitella keskenään samaan lajiin kuuluviksi. Ristiriita *COI*- ja *16S*-sekvenssien parittaisten etäisyyksien välillä on kiinnostava ja lisätutkimukset useammalla *S. amazonica* -fenotyypin yksilöllä olisivat hyödyllisiä.

Fylogenioiden (kuvat 3 ja 4) mukaan aasialaiset *S. morsitans* -yksilöt ovat *S. amazonica* -yksilöiden lähimpiä sukulaisia, sillä *S. amazonica* -yksilöt muodostavat molemmissa puissa monofyleettisen ryhmän Etelä-Intiasta ja Kaakkois-Aasiasta kerättyjen *S. morsitans* -yksilöiden kanssa (JK=99, BS=99). Lisäksi *S. amazonica* -yksilöt ja osa eteläintialaisista *S. morsitans* -yksilöistä muodostavat suurimman uskottavuuden puussa monofyleettiseen ryhmän (kuva 4, BS<50). Sijainti intialaisten *S. morsitans* -yksilöiden keskellä viittaa siihen, että *S. amazonica* -fenotyypin yksilöillä on ollut geenivirtaa paikallisen *S. morsitans* -populaation kanssa sen jälkeen, kun *S. amazonica* -fenotyyppi ja *S. morsitans* erkanivat muista *Scolopendra*-lajeista. Tämä tukee ajatusta siitä, että *S. amazonica* -fenotyyppi kuuluu osaksi *S. morsitans* -lajikompleksia, eikä sitä pitäisi kohdella lähimmistä intialaisista sukulaisistaan erillisenä lajina. Suurin osa parittaisista etäisyysmitoista viittaa samaan johtopäätökseen. Parittaisten etäisyyksien (taulukko 16) mediaaniarvojen perusteella *S. amazonica* on läheisempää sukua *S. morsitans* -lajille kuin muille aineiston *Scolopendra*-lajeille. Vaikka suurimmat *S. amazonica* -fenotyypin ja *S. morsitans* -lajikompleksin väliset parittaiset etäisyydet ovat lajien välisellä tasolla, *COI*- ja *28S*-sekvenssien kohdalla pienimmät *S. amazonica* -fenotyypin ja *S. morsitans* -lajikompleksin väliset ovat lähellä *S. amazonica* -yksilöiden välisiä parittaisia etäisyyksiä (kuva 7).

16S-sekvenssien parittaisista etäisyyksistä saadaan tämän tutkimuksen ainoa tuki ajatukselle, että *S. amazonica* olisi *S. morsitans* -lajista erillinen laji. Pieninkin *S.*

amazonica -fenotyypin ja *S. morsitans* -lajikompleksin välinen 16S-sekvenssien etäisyys (12,0 %) lähestyi lajien välistä suuruusluokkaa, vaikka *S. amazonica* -yksilöiden välinen etäisyys oli 0,0 % (kuva 7). Eri geenien sekvenssit ovat siten ristiriidassa sen suhteen, miten läheistä sukua *S. amazonica* -fenotyyppi on *S. morsitans* -lajikompleksille. Ilmiön mahdollinen selitys on käynnissä oleva lajiutumisosprosessi, jossa kaikki alleelit eivät ole vielä fiksoituneet.

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella *S. amazonica* -fenotyyppi ei eroa eteläintialaisista *S. morsitans* -yksilöistä siinä määrin, että fenotyyppiä voisi pitää omana lajinaan. Alueelta kerätyt *S. morsitans* - ja *S. amazonica* -yksilöt osoittautuivat geneettisesti hyvin monimuotoisiksi, mitä kuvaa osaltaan se, että bPTP-analyysin mukaan ne kaikki kuuluvat keskenään eri lajeihin (kuvat 3 ja 4). Tulokset vahvistivat aiempaa epäilyä siitä, että alueella esiintyy useita kryptisiä *Scolopendra*-lajeja (Joshi & Karanth 2011), mutta tällä hetkellä näyttö ei kuitenkaan riitä näiden lajien tunnistamiseen ja kuvaamiseen, mitä on käsitelty edellä (kappale 4.2.2). Asian tutkiminen vaatisi suuremman paikallisen otannan, uusien geenialueiden sekvenssejä ja lisätietoa fenotyypin muuntelusta. On mahdollista, että lisätutkimusten myötä *S. amazonica* osoittautuu validiksi lajiksi.

4.4 Onko *Scolopendra antananarivoensis* oma lajinsa?

Kronmüller (2010) kuvasi *Scolopendra antananarivoensis* -lajin morfologian perusteella, eikä lajin perimästä tiedetty mitään ennen tätä tutkimusta. Hypoteesinani oli, kyseessä on tosiasiaassa *Scolopendra morsitans* -lajin madagaskarilainen populaatio. Näyttö ei mielestäni riittänyt perusteeksi kuvata *S. antananarivoensis* erillisenä lajina, sillä lähes kaikki lajien erottamisessa käytetyt tuntomerkit olivat lajinkuvauksen perusteella ilmenemismuodoiltaan tulkinnanvaraisia tai päällekkäisiä. Tämä tutkimuksen yhtenä tavoitteena oli tarkastella *S. antananarivoensis* -lajin asemaa sekvenssiaineiston valossa ensimmäistä kertaa.

Aineistoon kuuluvat kaksi *S. antananarivoensis* -näytettä asettuivat toistensa lähimmiksi sukulaisiksi sekä parsimoniapuussa (kuva 3, JK=99) että suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4, BS=100). Suurimman uskottavuuden puuhun perustuva bPTP-analyysi erotti *S. antananarivoensis* -näytteet omaksi mahdolliseksi lajiryhmäkseen heikolla tukiarvolla (PDP=0,52). Näytteiden parittainen etäisyys oli 0,0

% sekä *COI*- että *28S*-sekvenssien suhteen. Tutkimustulokset tukevat siten käsitystä siitä, että aineiston kaksi *S. antananarivoensis* -yksilöä kuuluvat keskenään samaan lajiin.

Parsimoniapuussa (kuva 3) *S. antananarivoensis* -yksilöt sijoittuvat puun keskelle, haarautuen puusta Afrikan ja pohjoisen Intian niemimaan *S. morsitans* -ryhmien jälkeen ja ennen eteläisen Intian, Australian ja Kaakkois-Aasian *S. morsitans* -yksilöitä (JK<50). Suurimman uskottavuuden puussa (kuva 4) *S. antananarivoensis* -yksilöt haarautuivat puusta pohjoisen Intian niemimaan *S. morsitans* -yksilöiden jälkeen ennen *Scolopendra cingulata* - ja *Scolopendra subspinipes* -yksilöitä (BS<50). *S. antananarivoensis* -yksilöt eivät muodostaneet *S. morsitans* -yksilöiden kanssa monofyleettistä ryhmää kummassakaan puussa. *S. antananarivoensis* -ryhmän sijoittuminen keskelle *S. morsitans* -yksilöitä selittyy uskottavasti *S. morsitans* -lajikompleksin polyfyleettisyydellä. Ryhmän erilainen sijainti kahdessa puussa johtuu todennäköisesti näytön puutteesta, jonka vuoksi puiden tyvihaarat eivät saaneet tukea. Suurimman uskottavuuden puussa ryhmän sijainti vertautuu *Scolopendra cingulata* - ja *Scolopendra subspinipes* -yksilöihin, jotka ovat varmuudella *S. morsitans* -lajista erillisiä lajeja. Fylogenioiden perusteella *S. antananarivoensis* voisi yhtä uskottavasti kuulua *S. morsitans* -lajikompleksiin tai olla siitä erillinen laji.

S. antananarivoensis -yksilöiden ja *S. morsitans* -aineiston parittainen mediaanietäisyys (taulukko 17, kuva 8) oli *COI*-sekvenssillä 20,9 % ja *28S*-sekvenssillä 5,6 %, mikä vastaa havaittua lajien välistä etäisyyttä. Myös pienimmät etäisyysarvot olivat suuruusluokaltaan lajien välistä tasoa. Vastaavasti *S. antananarivoensis* -yksilöiden etäisyys *S. morsitans* -yksilöihin oli molempien sekvenssialueiden kohdalla samassa suuruusluokassa kuin etäisyys muihin *Scolopendra*-suvun lajeihin (taulukko 17). Parittaiset etäisyydet viittaavat vahvasti siihen, että *S. antananarivoensis* on *S. morsitans* -lajikompleksista erillinen laji, mikä sopii yhteen myös fylogenioiden kanssa. Hypoteesini siitä, että *S. antananarivoensis* olisi *S. morsitans* -lajin nuorempi synonyymi, on näin ollen kumottu.

Tämän tutkimuksen puitteissa *S. antananarivoensis* -näytteistä ei saatu tuotettua *16S*-sekvenssejä, joten kaikki lajia koskevat tulokset perustuvat *COI*- ja *28S*-sekvensseihin. *16S*-sekvenssit toisivat todennäköisesti lisänäyttöä lajin sukulaisuussuhteista, minkä vuoksi jatkotutkimuksissa niiden sekvensointia tulisi yrittää uudestaan. Koska *S.*

antananarivoensis -lajin asema erillisenä lajina on saanut tässä tutkimuksessa molekyyligeneettistä tukea, olisi lajille syytä etsiä tulevissa tutkimuksissa sellaisia morfologisia tuntomerkkejä, joiden perusteella se on yksiselitteisesti erotettavissa *S. morsitans* -lajista.

4.5 Toimiiko DNA-viivakoodaus juoksujalkaisilla?

DNA-viivakoodauksen tärkeimpinä sovelluksina voidaan pitää lajinmäärittystä ja lajikompleksien tunnistamista. DNA-viivakoodauksen avulla eläinyksilön *COI*-sekvenssi tunnistetaan kuuluvaksi tieteellisen luokittelun mukaiseen lajiin, mikäli se muistuttaa riittävästi kyseiselle lajille määritettyä ”mallisekvenssiä” (Hebert ym. 2003a; Hebert ym. 2003b). Lajinmäärittys perustuu nykyiseen tieteelliseen luokitteluun, eikä sen yhteydessä oteta kantaa luokittelun mielekkyyteen. Sen sijaan lajikompleksien tunnistamisen yhteydessä DNA-viivakoodausta käytetään luokittelun muokkaamisen ohjenuorana, sillä tavoitteena on kryptisten lajien kohottaminen lajin asemaan. DNA-viivakoodauksen näkökulmasta lajikompleksin muodostavat fenotyypiltään samankaltaiset yksilöt, joiden *COI*-sekvenssien etäisyydet ovat lajienvälisellä tasolla. Vastaavasti kryptisen lajin muodostavat lajikompleksiin kuuluvat yksilöt, joiden *COI*-etäisyys on lajinsisäisellä tasolla. Seuraavassa otetaan kantaa tämän tutkimuksen valossa siihen, miten toimiva menetelmä DNA-viivakoodaus on lajinmäärittämisessä ja kryptisten lajien tunnistamisessa juoksujalkaisten kohdalla. DNA-viivakoodauksen sovellettavuutta pohditaan myös *16S*- ja *28S* -sekvenssien parittaisten etäisyyksien pohjalta. Kyseisiä geenejä ei virallisesti käytetä DNA-viivakoodauksessa, mutta niiden parittaisia etäisyyksiä on käsitelty yksittäisissä juoksujalkaisten systematiikkaa koskevissa tutkimuksissa (Siriwut ym. 2015a; Siriwut ym. 2016) samaan tapaan kuin *COI*-sekvenssejä.

DNA-viivakoodauksessa lajien tunnistaminen perustuu viivakoodausaukkoon, joka erottaa etäisyysarvojen jakaumassa lajinsisäiset etäisyysarvot lajien välisistä. Ongelmana on, ettei lajinsisäiselle ja lajien väliselle *COI*-geenin etäisyydelle ole olemassa universaalia raja-arvoa. Aiemmista samalla taksonilla tehdyistä tutkimuksista voidaan saada osviittaa viivakoodausaukon sijainnista, mutta käytännössä se määritellään erikseen jokaiselle aineistolle. Tässä tutkimuksessa viivakoodausaukko määritettiin *Scolopendra morsitans* -aineistosta kahdella tavalla: etsimällä etäisyysjakauman suurin aukko ja määrittämällä lajinsisäiset etäisyysarvot bPTP-

analyysin antamien mahdollisten lajirajojen mukaan (kuva 6). *COI*- ja *16S*-sekvenssien kohdalla menetelmien tuottamat viivakoodausaukot sijaitsivat lähellä toisiaan, mutta *28S*-sekvenssin kohdalla viivakoodausaukkojen sijainnissa oli huomattava ero. Kaikkien kolmen geenin kohdalla bPTP-analyysin mukainen viivakoodausaukko sijaitsee vasemmalla suurimpaan aukkoon nähden (bPTP-analyysissä on jokaisen näyteparin vertailussa huomioitu kaikki muut näytteet ja kaikki kolme geeniä). Ketjutetun sekvenssin kohdalla eri menetelmillä määritettyjen viivakoodausaukkojen sijainti oli identtinen. Kun otetaan huomioon aineiston lajinsisäiset ja lajien väliset parittaiset etäisyydet (taulukot 14, 16 ja 17) ja eri geenien parittaisten etäisyyksien korrelointi (liite 3), *COI*- ja *16S*-sekvenssien kohdalla kumpikin menetelmä tuottaa lajirajojen määrittämisen kannalta yhtä loogisen viivakoodausaukon. *28S*-sekvenssin kohdalla etäisyysjakauman suurin aukko (kohdassa 15,8 - 19,1 %) sijaitsee kuitenkin niin oikealla, että se ei voi toimia merkinä lajirajasta. Toisaalta bPTP-analyysin mukaan raja mahdollisten lajinsisäisten ja lajien välisten *28S*-etäisyyksien välillä sijaitsee kohdassa 0,0 - 0,0 %, jolloin jakaumakuvaan ei muodostu käyttökelpoista viivakoodausaukkoa. On mahdollista, etteivät *28S*-geenin parittaiset etäisyydet sovellu lajirajojen määrittämiseen, mutta ongelma voi olla myös aineiston pienessä koossa, jolloin sattuman merkitys korostuu.

Lajikompleksien ja lähisukuisten lajien *COI*-etäisyyksiä on tutkittu niveljalkaisista erityisesti hyönteisillä ja näissä tutkimuksissa lajinsisäisen *COI*-etäisyyden rajaksi on määritetty noin 0 - 4 % (Hebert ym. 2004; Ball ym. 2005; Hajibabaei ym. 2006; Footit ym. 2008; Dinsdale ym. 2010). Useimmissa näistä tutkimuksista parittaisten etäisyyksien laskemisessa on käytetty Kimuran kaksiparametristä (K2P) evoluutiomallia (Kimura 1980), joka sallii erisuuret todennäköisyydet transitoille ja transversioille (ns. korjattu etäisyys). Korjaustoimenpiteen vaikutus etäisyysmitan numeeriseen arvoon on vähäinen (Srivathsan & Meier 2012), joten tämän tutkimuksen korjaamattomat etäisyysmitat ovat verrannollisia kirjallisuudesta löytyviin etäisyysmittoihin riippumatta siitä, kummalla tavalla etäisyydet on laskettu. Korjaamattomien etäisyyksien käyttöä puoltaa myös se, ettei korjaustoimenpiteelle ole tieteellistä perustetta (Srivathsan & Meier 2012).

Juoksujalkaisten DNA-viivakoodausta ja sekvenssien parittaisia etäisyyksiä on käsitelty muutamissa viime vuosina ilmestyneissä tutkimusartikkeleissa (Oeyen ym. 2014; Siritwut ym. 2015a; Siritwut ym. 2015b; Siritwut ym. 2016; Wesener ym. 2015; Wesener

ym. 2016). Niissä juoksujalkaisten lajinsisäisten etäisyyksien hajonta on ollut selvästi suurempaa kuin hyönteisillä. Useimmissa tutkimuksissa raportoidut *COI*-sekvenssin lajinsisäiset parittaiset etäisyydet ovat sijainneet välillä 0 - 11 % ja vastaavasti lajien väliset etäisyydet välillä 13 - 28 % (Oeyen ym. 2014; Siritwut ym. 2015a; Siritwut ym. 2015b; Siritwut ym. 2016; Wesener ym. 2016). Yhdessä tutkimuksessa (Wesener ym. 2015) *Geophilomorpha*-lahkoon kuuluvien juoksujalkaisten lajinsisäiset parittaiset *COI*-etäisyydet (0 - 17 %) olivat osin päällekkäisiä lajien välisten etäisyyksien (16 - 22 %) kanssa. *16S*-geenin parittaiset etäisyydet ovat olleet samaa suuruusluokkaa kuin *COI*-geenillä: lajien sisällä 1 - 11 % ja lajien välillä 8 - 34 % (Siritwut ym. 2015a; Siritwut ym. 2016). Ainoassa *28S*-geenin parittaisia etäisyyksiä koskevassa tutkimuksessa lajinsisäinen etäisyys oli 0 - 1 % (Siritwut ym. 2015a). Tässä tutkimuksessa havaitut parittaiset etäisyydet ovat siten kaikkien kolmen geenin suhteen samassa suuruusluokassa kuin kirjallisuudessa raportoidut. Juoksujalkaisia on tutkittu eliöryhmänä vähemmän kuin monia hyönteisryhmiä ja parittaisten etäisyyksien suuri lajinsisäinen hajonta saattaa osassa tapauksista selittyä tunnistamattomilla lajikomplekseilla (esim. Wesener ym. 2016). Toisaalta juoksujalkaisten leviämiskyky on heikompi kuin lentävillä hyönteisillä, mikä saattaa johtaa populaatioiden geneettiseen eriytymiseen. Onkin mahdollista, että suuri lajinsisäinen parittaisten etäisyyksien hajonta on ainakin jossain määrin ominaista juoksujalkaisille. Kolmas mahdollinen selitys ilmiölle on *Wolbachia*-infektion aiheuttama nopeutunut lajiutumisen, mitä on käsitelty alla (kappale 4.6.3).

Oli selitys lajinsisäisten parittaisten etäisyyksien suureen hajontaan mikä hyvänsä, ilmiö heikentää DNA-viivakoodauksen toimivuutta juoksujalkaisten lajinmäärittämisessä ensisijaisesti siksi, että suuret lajinsisäiset etäisyydet voivat erehdyttää pitämään saman lajin yksilöitä eri lajeihin kuuluvina. Lisäksi *COI*-geenin suuri lajinsisäinen muuntelu saattaa tehdä mahdottomaksi löytää lajille yhtä vertailusekvenssiä, jonka perusteella lajinmäärittäminen tulisi tehdä. DNA-viivakoodaus näyttää kuitenkin toimivan suuntaa antavana lajinmäärittämenetelmänä myös juoksujalkaisilla, mikäli lajinsisäiset etäisyydet ovat pieniä tai mikäli yksilöt kuuluvat fenotyyppejensä perusteella selkeästi eri lajeihin keskenään. Alle 4 % *COI*-etäisyydet ovat poikkeuksetta lajinsisäisiä niin tässä tutkimuksessa (taulukot 14 ja 17) kuin aiemmissakin juoksujalkaistutkimuksissa.

Lajikompleksien tunnistamisessa on aiemmin hyödynnetty ensisijaisesti fylogeneettisiä menetelmiä, joista DNA-viivakoodaus eroaa erityisesti laskutavan ja

tuntomerkkiaineiston koon suhteen. Parittaisia etäisyyksiä laskettaessa sekvenssiparin sisältämä informaatio tiivistetään yhteen kokonaissamankaltaisuutta kuvaavaan prosenttilukuun. Tällöin kaikkia lokuksia käsitellään samanarvoisina tiedonlähteinä ja suuri osa sekvensseihin sisältyvästä informaatiosta häviää. Menetelmä ei täytä kladistiikan periaatetta, jonka mukaan vain synapomorfiat kertovat eliöiden sukulaisuussuhteista. Tämän tutkimuksen perusteella parittaiset etäisyydet voivat kuitenkin tuoda lisäarvoa lajikompleksien tunnistamiseen juoksujalkaisten kohdalla. Fylogenioiden perusteella *Scolopendra antananarivoensis* olisi saattanut olla *S. morsitans* -lajikompleksiin kuuluva kryptinen laji (kuvat 3 ja 4), mutta parittaisten etäisyyksien perusteella kyseessä on selkeästi lajikompleksiin kuulumaton laji (taulukko 17). DNA-viivakoodauksen aineistona käytetään säännönmukaisesti yhtä geenisekvenssiä. Fylogenioiden pohjana pyritään sen sijaan käyttämään useampaa kuin yhtä geenialuetta, sillä eri geenien evoluutiohistoriat voivat vaihdella. Useamman kuin yhden geenin parittaisten etäisyyksien käytölle lajikompleksien tunnistamisessa ei ole periaatteellista estettä. Tässä tutkimuksessa kolmen geenin parittaiset etäisyysmitat täydensivät toisiaan: *COI*- ja *16S*-geenien parittaiset etäisyydet antoivat ristiriitaista tietoa *Scolopendra amazonica* -fenotyypin kuulumisesta *S. morsitans* -lajikompleksiin (taulukko 16), mikä olisi jäänyt huomaamatta rutiininomaisella DNA-viivakoodauksella. Parittaisten etäisyyksien laskeminen kaikille fylogenioissa käytettäville sekvensseille saattaakin tuoda lisähyötyä pienellä panoksella.

Tämänhetkisen tutkimustiedon valossa DNA-viivakoodaus ei ole luotettava lajinmäärittäminen menetelmä juoksujalkaisilla, joilla lajinsisäiset parittaiset etäisyydet ovat suuria. Tilanne saattaa kuitenkin muuttua, kun ymmärrys juoksujalkaisten genetiikasta lisääntyy ja kryptisiä lajeja on tunnistettu nykyistä enemmän. DNA-sekvenssien parittaiset etäisyydet voivat olla hyödyksi lajikompleksien tunnistamisessa myös juoksujalkaisilla fylogenioita täydentävänä työkaluna.

4.6 Tulosten luotettavuus

4.6.1 Aineiston riittävyys

Aineiston maantieteellinen otanta kattoi koko *Scolopendra morsitans* -lajin luontaisen levinneisyysalueen, joten aineisto on tältä osin riittävän kattava tutkimuskysymyksiä ajatellen. Otantaan ei sisällynyt yksilöitä Uudesta maailmasta, sillä laji on levinnyt Etelä- ja Pohjois-Amerikkaan ilmeisesti satunnaisina vieraslajipopulaatioina (Shelley ym. 2005), eikä otannan ulottaminen alueelle olisi todennäköisesti tuonut lisäarvoa tutkimuskysymysten ratkaisuun. Populaatioiden alkuperää olisi kuitenkin voitu tutkia selvittämällä Uudesta maailmasta kerättyjen *S. morsitans* -näytteiden sukulaisuusaste muualta kerättyihin näytteisiin, mikä kannattaa pitää mielessä jatkotutkimuksia ajatellen.

Biologisessa tutkimuksessa tulosten luotettavuus on yleisesti ottaen suoraan verrannollinen otoskoko, sillä sattuman merkitys korostuu aineistoissa, joiden otoskoko on liian pieni tutkimuskysymykseen nähden. Tämän tutkimuksen aineiston näytemäärä oli melko pieni, mutta tuloksia voidaan pitää luotettavina maantieteellisen otannan riittävyyden vuoksi. Suurempi näytemäärä olisi kuitenkin saattanut auttaa fylogenioiden ratkaisussa, sillä aiemmissa juoksujalkaisia koskevista tutkimuksista taksonomisen otannan laajentaminen on vahvistanut fylogeneettistä signaalia (Vahtera ym. 2012a; Vahtera ym. 2013). Jatkotutkimuksissa otostusta tulisi lisätä erityisesti aineistossa aliedustettujen Afrikan ja Australian suhteen.

Laboratoriotyövaiheessa osasta DNA-näytteistä ei saatu monistettua PCR-tuotetta. Lisäksi osa sekvensseistä jäi niin heikkolaatuisiksi, että ne oli jätettävä pois aineistosta epäluotettavuuden vuoksi. DNA:n fragmentoituminen ei selitä ongelmia yksittäisiä näytteitä lukuun ottamatta, sillä suurin osa näytteistä oli tuoreita, optimaalisesti säilöttyjä ja kudosp materiaaliltaan riittäviä. PCR:ää optimoitiin säätelemällä annealing-lämpötilaa sekä alukkeiden ja DNA:n määrää reaktiossa. Osa näytteistä myös sekvenssoitiin toistuvasti sekvenssien laadun parantamiseksi. Yksittäisistä kudospnäytteistä myös eristettiin DNA uudelleen. Tästä huolimatta kaikista näytteistä ei saatu käyttökelpoisia sekvenssejä. Syynä ovat todennäköisesti universaalialukkeet, jotka eivät toimineet optimaalisesti näillä näytteillä.

Aineistoon valittiin aiemmista julkaisuista 19 näyteyksilöä, joilta saatiin käyttöön kaikki sekvenssit kolmelta merkkialueelta. Sen sijaan osasta kudoksenäytteistä ei onnistuttu tuottamaan käyttökelpoisia sekvenssejä kaikilta kolmelta geenialueelta (taulukko 2). Kaikista analyyseissä mukana olleista kudoksenäytteistä (20 kpl) kolme merkkialuetta saatiin sekvensoitua onnistuneesti yhdeksästä näytteestä, kaksi merkkialuetta kahdeksasta näytteestä ja yksi merkkialue kolmesta näytteestä (kahdella näistä *COI* ja yhdellä *16S*). Puuttuva aineisto vähentää vääjäämättä näyttöä, jonka pohjalle fylogenia rakennetaan. Se myös heikentää vertailtavuutta näytteiden välillä, sillä näytteitä voidaan vertailla vain niille yhteisten sekvenssien pohjalta. Tämän vuoksi tavoitteena oli, että kaikista aineiston näytteistä saataisiin käyttöön vähintään kaksi sekvenssiä. Tavoite saavutettiin koko aineiston kohdalla kolmea näytettä lukuun ottamatta. Puuttuvan aineistosta aiheutuvien ongelmien voidaan katsoa koskevan lähinnä näitä kolmea näytettä, sillä niiden sijainnit fylogenioissa ja parittaiset etäisyydet on määritetty ainoastaan yhden geenin perusteella. Jatkotutkimuksissa tulisi pyrkiä sekvensoimaan onnistuneesti kaikki kolme geenialuetta jokaiselta näytteeltä. Spesifien alukkeiden suunnitteleminen juoksujalkaisille saattaa olla vaivan arvoista, vaikka se tarkoittaisi universaalialukkeiden käytön eduista luopumista.

4.6.2 Geenialueiden valinta

Jotta molekyyliSYSTEMAATTINEN analyysi olisi mielekäs, sekvenssiaineistolta vaaditaan kolme ominaisuutta. Ensinnäkin sekvenssiaineistolla on oltava riittävästi pituutta, jotta siihen voisi sisältyä riittävästi muuntelua. Koska jokainen emäs vastaa yhtä tuntomerkkiä, sekvenssiaineiston pituuden lisääminen lisää myös informaatioisisältöä olettaen, että muuntelun aste on tarkoituksenmukainen. Tähän tutkimukseen valittujen sekvenssien yhteenlaskettu pituus oli 1411 bp. Tämä vastaa fylogeneettisissä tutkimuksissa nykyään yleisesti käytettävää tuntomerkkien määrää, joten aineisto on tältä osin riittävä. Toiseksi analyyseihin tarvitaan geenialueita eri osista genomia, sillä eri geneeillä saattaa olla erilainen evoluutiohistoria. Tässä tutkimuksessa käytettiin kahta mitokondriaalista geeniä (*COI* ja *16S*) ja yhtä tumagenomiin kuuluvaa geeniä (*28S*), joten tämäkin vaatimus on täytetty.

Kolmanneksi, käytettävien geenialueiden tulee olla sellaisia, että niihin sisältyy sopiva määrä muuntelua eliöryhmään ja tutkimuskysymykseen nähden. Mikäli näytteiden välillä on liian vähän muuntelua, näytteet eivät eroa riittävästi toisistaan ja fylogenia jää

ratkaisematta. Jos taas muuntelua on liikaa, sukulaisuussuhteet peittyvät päällekkäisten mutaatioiden alle. Koodaavissa geenialueissa muuntelua on vähemmän, koska luonnonvalinta vaikuttaa niihin. Kaikki tässä tutkimuksessa käytetyt geenialueet olivat koodaavia geenejä, joilla on tärkeitä funktioita. *COI* osallistuu soluhengitykseen, kun taas *16S* ja *28S* koodaavat ribosomaalista RNA:ta. Tätä taustaa vasten *COI*- ja *16S*-sekvenssien suuri lajinsisäinen muuntelu oli yllättävää, vaikka ilmiö on havaittu useissa viime vuosina ilmestyneissä juoksujalkaistutkimuksissa (kts. tarkemmin kappale 4.5). *28S*-sekvenssin huomattavasti pienempi muuntelun aste selittyy ainakin osittain sillä, että *COI* ja *16S* periytyvät eukaryooteilla mtDNA:ssa, kun taas *28S* kuuluu tumagenomiin. Äitilinjassa tapahtuvan periytymisen vuoksi mtDNA:n efektiivinen populaatiokoko on pienempi kuin tumagenomilla (Hurst & Jiggins 2005), jolloin alleelien fiksaatio tapahtuu teoriassa nopeammin. Lisäksi mtDNA:ssa ei tapahdu juurikaan rekombinaatiota (Hurst & Jiggins 2005), mikä myös nopeuttaa alleelien fiksaatiota.

COI- ja *16S*-geenien suuri muuntelun aste on todennäköisin selitys sille, että fylogeneettisten puiden tyviosat jäivät vaille tukea (kuvat 3 ja 4). Vaikka geenialueiden antamaa fylogeneettistä informaatiota voidaan pitää luotettavana, jatkossa sekvenssiaineistoon tulee lisätä *COI*- ja *16S*-geenejä konservatiivisempi geeni. Hyvä ehdokas on ribosomaalista RNA:ta koodaava *18S*, jota on käytetty aiemminkin *Scolopendromorpha*-lahkoa ja muita juoksujalkaisia koskevissa fylogeneettisissä tutkimuksissa (Edgecombe & Giribet 2004; Vahtera ym. 2012a; Vahtera ym. 2013). *18S* kuuluu aiotumallisilla samaan autosomaaliseen operoniin kuin *28S*, joten geeni on todennäköisesti kehittynyt *Scolopendra*-lajeilla mitokondriaalisia geenejä hitaammin.

4.6.3 *Wolbachia* – mahdollinen virhelähde?

Solunsisäisen *Wolbachia*-bakteerin (Hertig & Wolbach 1924; Hertig 1936) aiheuttamaa infektiota tavataan monilla selkärangattomilla taksoneilla (Hurst & Jiggins 2005). Yksi infektion vaikutuksista on, että eri bakteerikannoilla infektoituneet yksilöt eivät kykene lisääntymään keskenään soluliman yhteensopimattomuuden vuoksi (Werren ym. 2008). Äitilinjassa leviävä infektio ”periytyy” samalla tavalla kuin mtDNA, mikä johtaa kytKentäepätasapainoon infektion ja mtDNA:n välillä (Hurst & Jiggins 2005). Onkin esitetty, että mitokondriaaliset geenit eivät kerro luotettavasti *Wolbachia*-bakteerilla infektoituneiden populaatioiden evoluutiohistoriasta (Hurst & Jiggins 2005).

Tietävästi *Wolbachia*-infektiota ei ole kuvattu juoksujalkaisilla, mutta asiaa on tutkittu toistaiseksi vähän (Werren & Windsor 2000). *Wolbachia*-infektion vaikutusta *S. morsitans* -lajikompleksin syntyyn ei voi näytön puutteessa sulkea pois. Infektion mahdollisuutta tukee aineistossa havaittu mtDNA:han painottuva geneettinen monimuotoisuus, jolle voi löytyä myös muita selityksiä. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin todeta, että *S. morsitans* todella on lajikompleksi, eikä kysymys ole esimerkiksi epäluotettavien tulosten aiheuttamasta illuusiosta. Sekä fylogeniati (kuvat 3 ja 4) että parittaiset etäisyydet (liite 3) olivat maantieteellisesti järjestäytyneitä. Lisäksi tumagenomiin kuuluvan 28S-geenin parittaiset etäisyydet korreloivat *COI*- ja *16S* -geenien parittaisten etäisyyksien kanssa (liite 3). Myös 28S-geenin muuntelu tukee ajatusta siitä, että *S. morsitans* on lajikompleksi, sillä *S. morsitans* -aineistossa havaittiin 28S-geenille tyypillisiä lajien välisiä etäisyyksiä (taulukko 14). Vaikka *Wolbachia* ei todennäköisesti muodosta tämän tutkimuksen kohdalla virhelähdettä, jatkossa olisi tärkeää selvittää perusteellisesti, esiintyykö infektiota juoksujalkaisilla. Tumagenomiin kuuluvien geenien käyttö yhdessä mtDNA:n kanssa lisää molekyyliSYSTEMAATTISTEN tutkimusten luotettavuutta tässäkin suhteessa.

4.7 Jatkotutkimukset

Tämän tutkimuksen tärkein löydös on, että *Scolopendra morsitans* -laji on geneettisesti monimuotoinen lajikompleksi, joka koostuu useista kryptisistä lajeista. Tulokset tukevat *S. morsitans* -lajikompleksin jakamista useaan maantieteellisesti erillään esiintyvään lajiin. Koska fylogeneettisissä puissa (kuvat 3 ja 4) esiintyvät *S. morsitans* -ryhmät Afrikka, Thaimaa-Kambodža, Thaimaa-Filippiinit sekä Australia täyttävät fylogeneettisen lajikäsityksen määritelmän, näyttö riittää nykyisellään niiden kohottamiseksi lajin asemaan, joskin Afrikan kohdalla kyseessä voi olla myös lajikompleksi. Intian niemimaalla esiintyvien *S. morsitans* -populaatioiden asema voidaan sen sijaan ratkaista vasta lisätutkimusten myötä. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella *Scolopendra amazonica* -fenotyyppi kuuluu *S. morsitans* -lajikompleksiin ja sen asema putatiivisena lajina vaatii jatkotutkimuksia. Sen sijaan tulokset tukevat *Scolopendra antananarivoensis* -lajin asemaa nykyluokituksen mukaisesti erillisenä lajina.

Jotta puuttuvan aineiston vaikutus tuloksiin vähenisi, seuraavassa työvaiheessa monistetaan aineistosta puuttuvat *COI*-, *16S*- ja *28S*-sekvenssit käyttäen aiempaa herkempää laboratoriomenetelmää. Lisäksi DNA-näytteistä sekvensoidaan *18S*-geeni ainakin osittain, millä pyritään vahvistamaan fylogeneettistä signaalia erityisesti puiden tyviosissa. Tämän jälkeen aineistosta erottuville kryptisille lajeille etsitään validit nimet ja *S. morsitans* -lajikompleksille tehdään revisio. On todennäköistä, että uusien lajien validit nimet löytyvät *S. morsitans* -lajin nuorempien synonyymien joukosta. Samassa yhteydessä on tarkasteltava myös *S. morsitans* -lajin holotyyppejä. Mikäli sen havaitaan edustavan eri lajia kuin moderni *S. morsitans*, asia on huomioitava revision yhteydessä. Revision jälkeen uusille lajeille tulisi etsiä voucher-näytteistä niiden jäseniä yhdistäviä morfologisia tuntomerkkien ilmenemismuotoja. Mikäli tällaisia tuntomerkkejä löydetään, ne lisätään aineistoksi fylogeneettisiin analyyseihin ja lopulta määrityskaavioihin. Parittaisilla etäisyyksillä mitattu *S. morsitans* -lajikompleksin geneettinen monimuotoisuus oli tässä tutkimuksessa yllättävän suurta, eikä nykyisen aineiston pohjalta tehtävä revisio välttämättä kykene ratkaisemaan asiaa kokonaan. Tämän muuntelun tarkempi kartoittaminen edellyttää tulevaisuudessa aineiston kartuttamista uusilla näytteillä. Erityisen kiinnostavia alueita ovat nykyisessä aineistossa niukasti edustetut Afrikka ja Australia sekä monimuotoisuuden keskittymänä toimiva Intian niemimaa.

Juoksujalkaiset ovat kiinnostava ja monimuotoinen eliöryhmä, jonka evoluutiohistoriaa on tutkittu toistaiseksi vähän. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli omalta osaltaan korjata tätä puutetta. On toivottavaa, että tulevien tutkimusten myötä myös käsitys juoksujalkaisten elintavoista ja roolista eliöyhteisön jäsenenä tarkentuu.

KIITOKSET

Tahdon kiittää ohjaajaani Varpu Vahteraa, joka johdatti minut molekyyli-systematiikan ja juoksujalkaisten maailmaan. Kiitän Christian Kronmülleriä, jonka keräämästä juoksujalkaiskokoelmasta suurin osa tutkimuksessa käytetyistä kudosnäytteistä on peräisin. Kiitän myös Gregory Edgecombea taksonomisesta asiantuntemuksesta. Lopuksi tahdon kiittää puolisoani Tapani Hopkinsia opastuksesta R-ohjelman käyttöön ja tuesta pro gradu -projektini aikana.

KIRJALLISUUS

- Amato A, Kooistra W, Ghiron JHL, Mann DG, Proschold T, Montresor M. 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158: 193-207.
- Arndt NT, Nisbet EG. 2012. Processes on the young Earth and the habitats of early life. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 40: 521-549.
- Attems G. 1930. Myriapoda 2. Scolopendromorpha. Teoksessa Schulze FE & Kükenthal W, toim. *Das Tierreich*. 1-306. Walter de Gruyter, Berliini & Leipzig.
- Ball SL, Hebert PDN, Burian SK, Webb JM. 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society* 24: 508-524.
- Bonato L, Chagas Junior A, Edgecombe GD, Lewis JGE, Minelli A, Pereira LA, Shelley RM, Stoev P, Zapparoli M. 2016. ChiloBase 2.0 - A World Catalogue of Centipedes (Chilopoda). <<http://chilobase.biologia.unipd.it>> Luettu 13.2.2017.
- Bonato L, Edgecombe GD, Zapparoli M. 2011. Chilopoda - Taxonomic overview. Teoksessa Minelli A, toim. *The Myriapoda*. Volume 1. [Treatise on Zoology Anatomy Taxonomy Biology]. 363-443. Brill, Leiden.
- Bonato L, Zapparoli M. 2011. Chilopoda - Geographical distribution. Teoksessa Minelli A, toim. *The Myriapoda*. Volume 1. [Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology]. 327-337. Brill, Leiden.
- Bücherl W. 1946. Novidades systematicos no ordem Scolopendromorpha. *Memórias de Instituto Butantan* 19: 135-158.
- Carpenter JM, Wheeler WC. 1999. Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. *Zoologica Scripta* 28: 251-260.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. 1967. Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19: 233-257.
- Chagas-Junior A, Edgecombe GD, Minelli A. 2008. Variability in trunk segmentation in the centipede order Scolopendromorpha: a remarkable new species of *Scolopendropsis* Brandt (Chilopoda: Scolopendridae) from Brazil. *Zootaxa* 1888: 36-46.
- Colloff MJ, Hastings AM, Spier F, Devonshire J. 2005. Centipedes of Australia. CSIRO Entomology and Australian Biological Resources Study, Canberra. <<http://www.ento.csiro.au/biology/centipedes/centipedeKey.html>> Luettu 10.10.2016.
- Cragin FW. 1885. First contribution to a knowledge of the Myriapoda of Kansas. *Bulletin of the Washburn College, Laboratory of Natural History* 4: 143-145.
- Darwin C. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray, Lontoo. 1. painos.
- Dinsdale A, Cook L, Riginos C, Buckley YM, De Barro P. 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America* 103: 196-208.
- Dornburg A, Federman S, Eytan RI, Near TJ. 2016. Cryptic species diversity in sub-Antarctic islands: A case study of *Lepidonotothen*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 104: 32-43.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32: 1792-1797.
- Edgecombe GD. 2011. Phylogenetic relationships of Myriapoda. Teoksessa Minelli A, toim. *The Myriapoda*. Volume 1. [Treatise on Zoology Anatomy Taxonomy Biology]. 1-20. Brill, Leiden.
- Edgecombe GD, Giribet G. 2004. Adding mitochondrial sequence data (16S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I) to the phylogeny of centipedes (Myriapoda: Chilopoda): an analysis of morphology and four molecular loci. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 42: 89-134.

- Edgecombe GD, Giribet G. 2007. Evolutionary biology of centipedes (Myriapoda: Chilopoda). *Annual Review of Entomology* 52: 151-170.
- Edgecombe GD, Giribet G, Wheeler WC. 1999. Phylogeny of Chilopoda: Combining 18S and 28S rRNA sequences and morphology. *Teoksessa Melic A ym., toim. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 26: 293-331.
- Edgecombe GD, Giribet G, Wheeler WC. 2002. Phylogeny of Henicopidae (Chilopoda: Lithobiomorpha): a combined analysis of morphology and five molecular loci. *Systematic Entomology* 27: 31-64.
- Edgecombe GD, Koch M. 2008. Phylogeny of scolopendromorph centipedes (Chilopoda): morphological analysis featuring characters from the peristomatic area. *Cladistics* 24: 872-901.
- Edwards AWF, Cavalli-Sforza LL. 1963. The reconstruction of evolution. *Annals of Human Genetics* 27: 104-105.
- Edwards AWF, Cavalli-Sforza LL. 1964. Reconstruction of evolutionary trees. *Teoksessa Heywood VH & McNeill J, toim. Phenetic and Phylogenetic Classification*. 67-76. Systematics Association Publ. No. 6, Lontoo.
- Efron B. 1979. Bootstrap methods: Another look at the jackknife. *Annals of Statistics* 7: 1-26.
- ElMaraghy H, AlGeddawy T, Azab A. 2008. Modelling evolution in manufacturing: A biological analogy. *CIRP Annals - Manufacturing Technology* 57: 467-472.
- EMBL-EBI. 2017. MUSCLE. Multiple Sequence Alignment. Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK. <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>> Luettu 10.2.2017.
- Farris JS. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology* 19: 83-92.
- Farris JS, Albert VA, Kallersjo M, Lipscomb D, Kluge AG. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Felsenstein J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* 27: 401-410.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA-sequences: a maximum-likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Felsenstein J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA USA.
- Fisher RA. 1912. On an absolute criterion for fitting frequency curves. *Messenger of Mathematics* 41: 155-160.
- Fisher RA. 1921. On the "probable error" of a coefficient of correlation deduced from a small sample. *Metron* 1: 3-32.
- Fisher RA. 1922. On the mathematical foundations of theoretical statistics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, A* 222: 309-368.
- Fitch WM. 1971. Toward defining the course of of evolution: Minimum change for a specified tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*: 294-299.
- Footitt RG, Maw HEL, Von Dohlen CD, Hebert PDN. 2008. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources* 8: 1189-1201.
- Fortnow L. 2009. The status of the P versus NP problem. *Communications of the ACM* 52: 78-86.
- Futuyma DJ. 2013. *Evolution, Third Edition*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA USA. Kts. s. 461.
- Girard C. 1853. Myriapods. *Teoksessa Marcy RB & Brinton G, toim. Report on exploration of the Red River of Louisiana expedition in 1852*. 272-275. R. Armstrong, Washington.
- Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.

- Graham RL, Foulds LR. 1982. Unlikelihood that minimal phylogenies for a realistic biological study can be constructed in reasonable computational time. *Mathematical Biosciences* 60: 133-142.
- Haase E. 1887. Die Indisch-Australischen Myriapoden. 1. Chilopoden. *Abhandlungen und Berichte des Königlichen zoologischen und anthropologisch-ethnographischen Museum zu Dresden* No. 5: 1-118, taulut I-VI.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 968-971.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41: 95-98.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313-321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812-14817.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: S96-S99.
- Hennig W. 1950. *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik*. Deutscher Zentralverlag, Berlin.
- Hennig W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
- Hertig M. 1936. The rickettsia, *Wolbachia pipiens* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* 28: 453-486.
- Hertig M, Wolbach SB. 1924. Studies on rickettsia-like micro-organisms in insects. *The Journal of Medical Research* 44: 329-374, taulut XXVII-XXX.
- Hurst GDD, Jiggins FM. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272: 1525-1534.
- Izquierdo-Carrasco F, Smith SA, Stamatakis A. 2011. Algorithms, data structures, and numerics for likelihood-based phylogenetic inference of huge trees. *BMC Bioinformatics* 12: 470.
- Jangi BS. 1955. LXXI.—Some aspects of the morphology of the centipede *Scolopendra morsitans* Linn. (Scolopendridae). *Annals and Magazine of Natural History* 8: 597-607.
- Jangi BS. 1959. Further notes on the taxonomy of the centipede *Scolopendra morsitans* Linnaeus (Scolopendridae). *Entomological News* 70: 253-257.
- Jangi BS, Dass CMS. 1984. Scolopendridae of the Deccan. *Journal of Scientific & Industrial Research* 43: 27-54.
- Joshi J, Karanth KP. 2011. Cretaceous-Tertiary diversification among select Scolopendrid centipedes of South India. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 287-294.
- Kettle C, Arthur W, Jowett T, Minelli A. 1999. Homeotic transformation in a centipede. *Trends in Genetics* 15: 393-393.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kluge AG, Farris JS. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18: 1-32.
- Koch LE. 1983. Morphological characters of Australian scolopendrid centipedes, and the taxonomy and distribution of *Scolopendra morsitans* L. (Chilopoda: Scolopendridae: Scolopendrinae). *Australian Journal of Zoology* 31: 79-91.
- Koch M. 2003. Monophyly of the Myriapoda? Reliability of current arguments. *African Invertebrates* 44: 137-153.
- Koch M, Paerschke S, Edgecombe GD. 2009. Phylogenetic implications of gizzard morphology in scolopendromorph centipedes (Chilopoda). *Zoologica Scripta* 38: 269-288.

- Kronmüller C. 2010. *Scolopendra antananarivoensis* spec. nov. - a new species of *Scolopendra* Linnaeus, 1758 related to *Scolopendra morsitans* Linnaeus, 1758 from Madagascar. *Spixiana* 33: 281-288.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Lanave C, Preparata G, Saccone C, Serio G. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution* 20: 86-93.
- Latreille. 1829. Teoksessa Cuvier G, toim. *Le Règne Animal*. 2. painos. Bonato ym. 2016 mukaan. Luettu 15.2.2017.
- Leach WE. 1814. Crustaceology. Teoksessa Brewster D, toim. *The Edinburgh Encyclopaedia*. 383-437.
- Leach WE. 1815. A tabular view of the external characters of four classes of animals, which Linné arranged under Insecta; with the distribution of the genera composing three of these classes into orders, &c. and descriptions of several new genera and species. *Transactions of the Linnean Society of London* 11: 306-400.
- Leach WE. 1817. The zoological miscellany; being the descriptions of new or interesting animals. III. XII. The characters of the genera of the class Myriapoda, with descriptions of some species. 31-45. Taylor R & Taylor A, Lontoo.
- Legg DA, Sutton MD, Edgecombe GD. 2013. Arthropod fossil data increase congruence of morphological and molecular phylogenies. *Nature Communications* 4: 2485.
- Lewis JGE. 1969. The variation of the centipede *Scolopendra amazonica* in Africa. *Zoological Journal of the Linnean Society* 48: 49-57.
- Lewis JGE. 1981. *The biology of centipedes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lewis JGE. 2010. A key and annotated list of the *Scolopendra* species of the Old World with a reappraisal of *Arthrorhabdus* (Chilopoda: Scolopendromorpha: Scolopendridae). *International Journal of Myriapodology* 3: 83-122.
- Lewis JGE, Daszak P, Jones CG, Cottingham JD, Wenman E, Maljkovic A. 2010. Field observations on three scolopendrid centipedes from Mauritius and Rodrigues (Indian Ocean) (Chilopoda: Scolopendromorpha). *International Journal of Myriapodology* 3: 123-137.
- Linnaeus C. 1753. *Species plantarum*. Laurentius Salvius, Tukholma. 1. painos.
- Linnaeus C. 1758. *Systema naturae*. Laurentius Salvius, Tukholma. 10. painos.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia University Press, New York.
- Mayr E, Ashlock PD. 1991. *Principles of systematic zoology*. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. 1-8. New Orleans.
- Minelli A. 2011a. Chilopoda – Reproduction. Teoksessa Minelli A, toim. *The Myriapoda*. Volume 1. [Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology]. 279-294. Brill, Leiden.
- Minelli A. 2011b. Chilopoda – Introduction. Teoksessa Minelli A, toim. *The Myriapoda*. Volume 1. [Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology]. 21-42. Brill, Leiden.
- Minelli A, Sombke A. 2011. Chilopoda – Development. Teoksessa Minelli A, toim. *The Myriapoda*. Volume 1. [Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology]. 295-308. Brill, Leiden.
- Molinari J, Gutierrez EE, De Ascencao AA, Nassar JM, Arends A, Marquez RJ. 2005. Predation by giant centipedes, *Scolopendra gigantea*, on three species of bats in a Venezuelan cave. *Caribbean Journal of Science* 41: 340-346.
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B. 2011. How many species are there on Earth and in the ocean? *Plos Biology* 9: e1001127.
- Mundel P. 1979. The centipedes (Chilopoda) of the Mazon Creek. Teoksessa Nitecki MH, toim. *Mazon Creek Fossils*. 361-378. Academic Press, New York.

- Murienne J, Edgecombe GD, Giribet G. 2010. Including secondary structure, fossils and molecular dating in the centipede tree of life. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 301-313.
- Oeyen JP, Funke S, Bohme W, Wesener T. 2014. The evolutionary history of the rediscovered Austrian population of the giant centipede *Scolopendra cingulata* Latreille 1829 (Chilopoda, Scolopendromorpha). *PLoS ONE* 9: e108650.
- Prendini L, Weygoldt P, Wheeler WC. 2005. Systematics of the *Damon variegatus* group of African whip spiders (Chelicerata : Amblypygi): Evidence from behaviour, morphology and DNA. *Organisms Diversity & Evolution* 5: 203-236.
- Quenouille MH. 1949. Problems in plane sampling. *The Annals of Mathematical Statistics* 20: 355-375.
- Quenouille MH. 1956. Notes on bias in estimation. *Biometrika* 43: 353-360.
- R Development Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.r-project.org>> Luettu 13.2.2017.
- Rambaut A. 2002. Se-AL v2.0a11. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>>. Luettu 15.2.2017.
- Regier JC, Shultz JW, Zwick A, Hussey A, Ball B, Wetzer R, Martin JW, Cunningham CW. 2010. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature* 463: 1079-1083.
- Rota-Stabelli O, Campbell L, Brinkmann H, Edgecombe GD, Longhorn SJ, Peterson KJ, Pisani D, Philippe H, Telford MJ. 2011. A congruent solution to arthropod phylogeny: phylogenomics, microRNAs and morphology support monophyletic Mandibulata. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 298-306.
- Say T. 1821. Description of the Myriapoda of the United States (1822). *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 3. Bonato ym. 2016 mukaan. Luettu 15.2.2017.
- Schuh RT. 2000. *Biological systematics: principles and applications*. Cornell University Press, Ithaca.
- Schulmeister S, Wheeler WC, Carpenter JM. 2002. Simultaneous analysis of the basal lineages of Hymenoptera (Insecta) using sensitivity analysis. *Cladistics* 18: 455-484.
- Scudder SH. 1890. New Carboniferous Myriapoda from Illinois. *Boston Society of Natural History Memoirs* 4: 417-442.
- Shear W, Bonamo P. 1988. Devonobiomorpha, a new order of centipeds (Chilopoda) from the middle Devonian of Gilboa, New York State, USA, and the phylogeny of centipede orders. *American Museum Novitates* 2927: 1-30.
- Shear WA, Edgecombe GD. 2010. The geological record and phylogeny of the Myriapoda. *Arthropod Structure & Development* 39: 174-190.
- Shear WA, Jeram AJ, Selden P. 1998. Centipede legs (Arthropoda, Chilopoda, Scutigleromorpha) from the Silurian and Devonian of Britain and the Devonian of North America. *American Museum Novitates* 3231: 1-16.
- Shelley RM. 2006. A chronological catalog of the New World species of *Scolopendra* L., 1758 (Chilopoda: Scolopendromorpha: Scolopendridae). *Zootaxa* 1253: 1-50.
- Shelley RM, Edwards GB, Chagas A. 2005. Introduction of the centipede *Scolopendra morsitans* L., 1758, into northeastern Florida, the first authentic North American record, and a review of its global occurrences (Scolopendromorpha: Scolopendridae: Scolopendrinae). *Entomological News* 116: 39-58.
- Simpson GG. 1961. *Principles of animal taxonomy*. Columbia University Press, New York.
- Siriwut W, Edgecombe GD, Sutcharit C, Panha S. 2015a. The centipede genus *Scolopendra* in mainland Southeast Asia: molecular phylogenetics, geometric morphometrics and external morphology as tools for species delimitation. *PLoS ONE* 10: e0135355.
- Siriwut W, Edgecombe GD, Sutcharit C, Tongkerd P, Panha S. 2015b. First record of the African-Indian centipede genus *Digitipes* Attems, 1930 (Scolopendromorpha: Otostigminae) from Myanmar, and the systematic position of a new species based on molecular phylogenetics. *Zootaxa* 3931: 71-87.

- Siriwut W, Edgecombe GD, Sutcharit C, Tongkerd P, Panha S. 2016. A taxonomic review of the centipede genus *Scolopendra* Linnaeus, 1758 (Scolopendromorpha, Scolopendridae) in mainland Southeast Asia, with description of a new species from Laos. *Zookeys* 590: 1-124.
- Sokal RR, Sneath PHA. 1963. Principles of numerical taxonomy. WH Freeman & Co, San Francisco.
- Sombke A, Edgecombe GD. 2014. Morphology and evolution of Myriapoda. *Arthropod Structure & Development* 43: 3-4.
- Spelda J, Reip HS, Oliveira-Biener U, Melzer RR. 2011. Barcoding Fauna Bavarica: Myriapoda – a contribution to DNA sequence-based identifications of centipedes and millipedes (Chilopoda, Diplopoda). *Zookeys* 156: 123-139.
- Srivathsan A, Meier R. 2012. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics* 28: 190-194.
- Stamatakis A. 2006. Phylogenetic models of rate heterogeneity: a high performance computing perspective. 20th IEEE International Parallel & Distributed Processing Symposium. IEEE, Ródos.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313.
- Stojanovic DZ, Lucic LR, Lukovic JBD, Mircic DL, Zivic NV, Makarov SE, Mitic BM. 2015. Life under the mother's hug: Harmonization of the developmental schedules of epimorphs based on early development of the scolopendromorph centipede *Cryptops parisi* Brolemann, 1920 (Chilopoda: Scolopendromorpha: Cryptopidae). *Russian Journal of Developmental Biology* 46: 342-355.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Tuimala J. 2005. Bioinformatiikan perusteet. CSC – Tieteellinen laskenta Oy. 1. painos.
- Vahtera V, Edgecombe GD, Giribet G. 2012a. Evolution of blindness in scolopendromorph centipedes (Chilopoda: Scolopendromorpha): insight from an expanded sampling of molecular data. *Cladistics* 28: 4-20.
- Vahtera V, Edgecombe GD, Giribet G. 2012b. Spiracle structure in scolopendromorph centipedes (Chilopoda: Scolopendromorpha) and its contribution to phylogenetics. *Zoomorphology* 131: 225-248.
- Vahtera V, Edgecombe GD, Giribet G. 2013. Phylogenetics of scolopendromorph centipedes: can denser taxon sampling improve an artificial classification? *Invertebrate Systematics* 27: 578-602.
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R. 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27: 171-180.
- Vandamme A-M. 2009. Basic concepts of molecular evolution. Teoksessa Lemey P, Salemi M & Vandamme A-M, toim. The phylogenetic handbook, second edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Voigtländer K. 2011. Chilopoda - Ecology. Teoksessa Minelli A, toim. The Myriapoda. Volume 1. [Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology]. 309-325. Brill, Leiden.
- Waldock J, Edgecombe GD. 2012. A new genus of scolopendrid centipede (Chilopoda: Scolopendromorpha: Scolopendridini) from the central Australian deserts. *Zootaxa* 3321: 22-36.
- Wang L, Jiang T. 1994. On the complexity of multiple sequence alignment. *Journal of Computational Biology* 1: 337-348.
- Wei X, McCune B, Lumbsch HT, Li H, Leavitt S, Yamamoto Y, Tchabanenko S, Wei J. 2016. Limitations of species delimitation based on phylogenetic analyses: a case study in the *Hypogymnia hypotrypa* group (Parmeliaceae, Ascomycota). *PLoS ONE* 11: e0163664.

- Weiss MC, Sousa FL, Mrnjavac N, Neukirchen S, Roettger M, Nelson-Sathi S, Martin WF. 2016. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nature Microbiology* 1: 16116.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6: 741-751.
- Werren JH, Windsor DM. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 267: 1277-1285.
- Wesener T, Voigtländer K, Decker P, Oeyen JP, Spelda J. 2016. Barcoding of Central European *Cryptops* centipedes reveals large interspecific distances with ghost lineages and new species records from Germany and Austria (Chilopoda, Scolopendromorpha). *Zookeys* 564: 21-46.
- Wesener T, Voigtländer K, Decker P, Oeyen JP, Spelda J, Lindner N. 2015. First results of the German Barcode of Life (GBOL) – Myriapoda project: Cryptic lineages in German *Stenotaenia linearis* (Koch, 1835) (Chilopoda, Geophilomorpha). *Zookeys* 510: 15-29.
- Whiting MF, Carpenter JC, Wheeler QD, Wheeler WC. 1997. The Strepsiptera problem: Phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Systematic Biology* 46: 1-68.
- Wilson HM. 2006. Juliformian millipedes from the Lower Devonian of Euramerica: Implications for the timing of millipede cladogenesis in the Paleozoic. *Journal of Paleontology* 80: 638-649.
- Wilson HM, Anderson LI. 2004. Morphology and taxonomy of Paleozoic millipedes (Diplopoda: Chilognatha: Archipolypoda) from Scotland. *Journal of Paleontology* 78: 169-184.
- Winston JE. 1999. *Describing Species. Practical Taxonomic Procedure for Biologists*. Columbia University Press, New York.
- Wood HC, Jr. 1861. Description of new species of *Scolopendra* in the collection of the Academy. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* [1861]: 10-15. Bonato ym. 2016 mukaan. *Luettu* 15.2.2017.
- Würlmi M. 1975. Systematische Kriterien in der Gruppe von *Scolopendra morsitans* Linné, 1758 (Chilopoda, Scolopendridae). *Deutsche Entomologische Zeitschrift* 22: 201-206.
- Xiong B, Kocher TD. 1991. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome* 34: 306-311.
- Zhang J. 2013-2015. bPTP server: a Bayesian implementation of the PTP model for species delimitation. <<http://species.h-its.org/>> *Luettu* 30.1.2017.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29: 2869-2876.

LIITTEET

Liite 1. Tutkimuksessa uusina sekvensoitujen näytteiden voucher-tiedot. ZSM-näytteiden tiedot Christian Kronmüller ja Varpu Vahtera (henkilökohtainen tiedonanto), MCZ-näytteiden tiedot MCZBASE-tietokanta (<http://mczbase.mcz.harvard.edu/SpecimenSearch.cfm>). Koordinaatit on esitetty desimaalimuodossa.

Scolopendra antananarivoensis Kronmüller, 2010 – Madagascar; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0056.

Scolopendra antananarivoensis Kronmüller, 2010 – Madagascar; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0057.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Philippines: Cebu; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0003.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Philippines: Cebu; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0004.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Philippines: Cebu; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0005.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Kashmir; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0012.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Gambia; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0014.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Mozambique; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0060.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Mozambique; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0061.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Mozambique; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0062.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Pakistan; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0063.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Pakistan; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0064.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Pakistan; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0065.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – India; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0066.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Egypt; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0067.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Egypt; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0068.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – Thailand; commercial pet trade; purchased before x.2014; ZSM CK0080.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 32.93333° S 24.64999° E; South Africa: Eastern Cape: Jansenville District: Jansenville, hill with radio and cell phone towers, overlooking town, 444 m; 15.i.2008; L. Prendini, M. Cooper; MCZ IZ-130701; DNA 104702.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 37.04999° N 10.98333° E; Tunisia: Cap Bon Peninsula: Nabeul District: El Haouaria, the ancient Roman quarry and surroundings, slope facing the sea, under stones, 51 m; 24.iii.2008; P. Stoev, N. Akkari; MCZ IZ-130700; DNA 104641.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 31.623422° S 117.709388° E; Australia: Western Australia: Kellerberrin Hill, 273 m; 26.i.2006; G. D. Edgecombe, G. Giribet; MCZ IZ-130698; DNA 103952.

Liite 2. GenBank-tietokannasta noudettujen sekvenssien voucher-tiedot. CES-näytteiden tiedot Jahnvi Joshi (henkilökohtainen tiedonanto), CUMZ-näytteiden tiedot Warut Siritwut (henkilökohtainen tiedonanto), näytteiden WAM 120857 ja MCZ IZ-130685 tiedot (Vahtera ym. 2013), muiden MCZ-näytteiden tiedot MCZBASE-tietokanta (<http://mczbase.mcz.harvard.edu/SpecimenSearch.cfm>). Koordinaatit on esitetty desimaalimuodossa.

Scolopendra amazonica Bücherl, 1946 – 14.436° N 74.426° E; India: Kumata: Karnataka State, close to west coast, degraded lowland forests, collected in open/exposed farms; vi.-iv.2007; J. Joshi; CES 07235.

Scolopendra amazonica Bücherl, 1946 – 14.436° N 74.426° E; India: Kumata: Karnataka State, close to west coast, degraded lowland forests, collected in open/exposed farms; vi.-iv.2007; J. Joshi; CES 07252.

Scolopendra cingulata Latreille, 1829 – Spain: Barcelona: Barcelona; no verbatim date data (1.i.1970 - 1.i.2000); C. Ribera; MCZ IZ-131446; DNA 100804.

Scolopendra leki Waldock & Edgecombe, 2012 – 25.26888° S 120.63036° E; Australia: Western Australia: Southern Carnarvon Range, interdune sand flat, open *Acacia* shrubland over *Triodia*; 8.viii.2012; N.A. Guthrie, J. Pieterse; WAM 120857; MCZ DNA120857.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 15.409° N 74.476° E; India: Ramnagar: Karnataka State, dry scrub forest; vi.-iv.2007; J. Joshi; CES 07106.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 15.409° N 74.476° E; India: Ramnagar: Karnataka State, dry scrub forest; vi.-iv.2007; J. Joshi; CES 07107.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 13.038° N 77.200° E; India: Deverayandurga: Karnataka State, dry scrub forest; vi.-iv.2007; J. Joshi; CES 07203.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 13.038° N 77.200° E; India: Deverayandurga: Karnataka State, dry scrub forest; vi.-iv.2007; J. Joshi; CES 07204.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 18.419° N 73.907° E; India: Bapdev ghat: Maharashtra State, dry scrub forest; vi.-iv.2007; J. Joshi; CES 07212.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 13.80069° N 13.88141° W; Senegal, just E of Sntiou Malem, scrub savannah with recent flooding, 25 m; 28.vi.2005; J. Huff, V. Vignoli; MCZ IZ-130703; DNA 104707.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 16.83502° N 103.27555° E; Thailand: Ban Dan Chang: Ta Kantho: Khonkaen; 208 m; 14.vi.2013; Animal Systematic Research Unit; CUMZ 00339.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 18.57113° N 100.78324° E; Thailand: Lainan: Weing Sa: Nan; 223 m; 21.x.2014; Animal Systematic Research Unit; CUMZ 00340.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 12.52955° N 100.95511° E; Thailand: Juang Island: Sattahip: Chonburi; 4 m; 4.vi.2012; Animal Systematic Research Unit; CUMZ 00341.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 14.54816° N 103.37197° E; Thailand: Ban Khok Pho: Prasat: Surin; 160 m; 26.ix.2014; Animal Systematic Research Unit; CUMZ 00342.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 18.84986° N 99.22122° E; Thailand: Hui Hong Khrai: Chiangmai; 420 m; 19.v.2014; N. Likhitrakarn; CUMZ 00343.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 13.97052° N 102.266° E; Thailand: Tha Kra Bak Reservoir: Srakao; 79 m; 26.vi.2014; Animal Systematic Research Unit; CUMZ 00344.

Scolopendra morsitans Linnaeus, 1758 – 13.60152° N 102.95258° E; Cambodia: Wat Phanombak: Srisophon; 32 m; 6.ii.2014; Animal Systematic Research Unit; CUMZ 00345.

Scolopendra subspinipes Leach, 1815 – 8.61918° S 141.12033° E; Papua New Guinea: Western Province: Weam; 2010; M. Janda, T. Pius; MCZ IZ-130685; DNA 106501.

Otostigmus multidentis Haase, 1887 – 19.09500° N 100.94972° E; Thailand: Nan Province: Pua District, at Slaphet waterfall, 417 m; 10.xii.2009; H. Enghoff; MCZ IZ-130673; DNA 106512.

Liite 3. Aineiston pienimmät parittaiset etäisyydet merkkialueittain pienimmästä suurimpaan. Värit vastaavat bPTP-analyysin mukaisia mahdollisia lajirajoja (kuvat 3 - 5; mahdolliset lajiensa ainoat edustajat (PDP<0,50) on merkitty mustalla). Listat on rajattu niin, että niihin sisältyvät kaikki bPTP-lajirajojen (kuva 4) mukaan keskenään mahdollisesti samoihin lajeihin kuuluvat näyteparit (PDP≥0,50) ja etäisyysarvoltaan niiden väliin jäävät näyteparit. *COI+16S+28S* -listalla on esitetty ainoastaan näytteet, joilta oli käytettävissä kaikkien kolmen merkkialueen sekvenssit.

COI			16S			28S			COI+16S+28S		
Näyte 1	Näyte 2	%	Näyte 1	Näyte 2	%	Näyte 1	Näyte 2	%	Näyte 1	Näyte 2	%
00342 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,0	CES07235 Intia	CES07252 Intia	0,0	CK0056 Madagaskar	CK0057 Madagaskar	0,0	CK0004 Filippiinit	CK0005 Filippiinit	0,0
00342 Thaimaa	00345 Kambodža	0,0	CK0004 Filippiinit	CK0005 Filippiinit	0,0	00339 Thaimaa	00342 Thaimaa	0,0	CK0003 Filippiinit	CK0004 Filippiinit	0,1
CK0003 Filippiinit	CK0004 Filippiinit	0,0	CK0067 Egypti	CK0068 Egypti	0,0	00339 Thaimaa	00341 Thaimaa	0,0	CK0003 Filippiinit	CK0005 Filippiinit	0,1
CK0003 Filippiinit	CK0005 Filippiinit	0,0	CK0004 Filippiinit	CK0003 Filippiinit	0,2	00339 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,0	00342 Thaimaa	00345 Kambodža	0,2
CK0004 Filippiinit	CK0005 Filippiinit	0,0	CK0005 Filippiinit	CK0003 Filippiinit	0,2	00339 Thaimaa	00345 Kambodža	0,0	CK0080 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,2
CK0064 Pakistan	CK0065 Pakistan	0,0	00342 Thaimaa	00345 Kambodža	0,4	00342 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,0	CK0080 Thaimaa	00345 Kambodža	0,2
CK0056 Madagaskar	CK0057 Madagaskar	0,0	CK0080 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,5	00342 Thaimaa	00345 Kambodža	0,0	00344 Thaimaa	00345 Kambodža	0,3
CK0065 Pakistan	CK0066 Intia	0,0	CK0080 Thaimaa	00345 Kambodža	0,5	CK0003 Filippiinit	CK0004 Filippiinit	0,0	00342 Thaimaa	CK0080 Thaimaa	0,3
CK0080 Thaimaa	00342 Thaimaa	0,0	00339 Thaimaa	00345 Kambodža	0,7	CK0003 Filippiinit	CK0005 Filippiinit	0,0	00339 Thaimaa	00345 Kambodža	0,3
CK0080 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,0	00344 Thaimaa	00345 Kambodža	0,7	CK0003 Filippiinit	00343 Thaimaa	0,0	00342 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,4
CK0080 Thaimaa	00345 Kambodža	0,0	00339 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,9	CK0003 Filippiinit	00340 Thaimaa	0,0	00339 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,4
00344 Thaimaa	00345 Kambodža	0,0	CK0080 Thaimaa	00339 Thaimaa	0,9	CK0004 Filippiinit	CK0005 Filippiinit	0,0	00339 Thaimaa	CK0080 Thaimaa	0,4
00339 Thaimaa	00342 Thaimaa	0,2	CK0080 Thaimaa	00342 Thaimaa	0,9	CK0004 Filippiinit	00343 Thaimaa	0,0	00339 Thaimaa	00342 Thaimaa	0,5
00339 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,2	CK0080 Thaimaa	00341 Thaimaa	0,9	CK0004 Filippiinit	00340 Thaimaa	0,0	CK0012 Kashmir	CK0063 Pakistan	1,0
00339 Thaimaa	00345 Kambodža	0,2	00339 Thaimaa	00342 Thaimaa	1,1	CK0005 Filippiinit	00343 Thaimaa	0,0	CK0064 Pakistan	CK0066 Intia	1,1
CK0080 Thaimaa	00339 Thaimaa	0,2	00344 Thaimaa	00342 Thaimaa	1,1	CK0005 Filippiinit	00340 Thaimaa	0,0	CK0080 Thaimaa	00341 Thaimaa	1,1
CK0064 Pakistan	CK0066 Intia	0,2	00341 Thaimaa	00345 Kambodža	1,6	CK0012 Kashmir	CK0063 Pakistan	0,0	00341 Thaimaa	00345 Kambodža	1,5
CK0060 Mosambik	CK0061 Mosambik	0,2	00341 Thaimaa	00339 Thaimaa	1,8	CK0060 Mosambik	CK0061 Mosambik	0,0	00341 Thaimaa	00344 Thaimaa	1,6
CK0061 Mosambik	CK0062 Mosambik	0,2	00341 Thaimaa	00344 Thaimaa	1,8	CK0060 Mosambik	CK0062 Mosambik	0,0	00342 Thaimaa	00341 Thaimaa	1,7
CK0060 Mosambik	CK0062 Mosambik	0,4	CK0012 Kashmir	CK0063 Pakistan	1,8	CK0061 Mosambik	CK0062 Mosambik	0,0	00339 Thaimaa	00341 Thaimaa	1,7
CK0012 Kashmir	CK0063 Pakistan	1,0	00341 Thaimaa	00342 Thaimaa	2,0	CK0064 Pakistan	CK0065 Pakistan	0,0	00339 Thaimaa	00341 Thaimaa	%
CK0080 Thaimaa	00341 Thaimaa	1,5	CES07203 Intia	CES07204 Intia	2,2	CK0064 Pakistan	CK0066 Intia	0,0			
00341 Thaimaa	00342 Thaimaa	1,8	CK0064 Pakistan	CK0066 Intia	3,0	CK0065 Pakistan	CK0066 Intia	0,0			
00341 Thaimaa	00344 Thaimaa	1,8				CK0067 Egypti	CK0068 Egypti	0,0			
00341 Thaimaa	00345 Kambodža	1,8				CK0080 Thaimaa	00339 Thaimaa	0,0			
00339 Thaimaa	00341 Thaimaa	2,0				CK0080 Thaimaa	00342 Thaimaa	0,0			
		%				CK0080 Thaimaa	00341 Thaimaa	0,0			
						CK0080 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,0			
						CK0080 Thaimaa	00345 Kambodža	0,0			
						00343 Thaimaa	00340 Thaimaa	0,0			
						00341 Thaimaa	00342 Thaimaa	0,0			
						00341 Thaimaa	00344 Thaimaa	0,0			
						00341 Thaimaa	00345 Kambodža	0,0			
						00344 Thaimaa	00345 Kambodža	0,0			
								%			