Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Molekulární fylogenéze a historická biogeografie lišajovitých rodu *Agrius* (Lepidoptera: Sphingidae)

Diplomová práce

Bc. Michal Rindoš

Školitel: RNDr. Zdeněk Faltýnek Fric, Ph.D.

České Budějovice 2017

RINDOŠ M. (2017) Molekulárna fylogenéza a historická biogeografia lišajovitých rodu Agrius (Lepidoptera: Sphingidae) [Molecular phylogeny and historical biogeography of the hawkmoth genus Agrius (Lepidoptera: Sphingidae). Mgr. Thesis, in Slovak.] – 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

I studied molecular phylogeny and historical biogeography of the hawkmoth genus *Agrius*, a group with several migratory as well as several strictly endemic species. I used sequences of one mitochondrial and one nuclear genes and in a detail also population genetic parameters of the most widespread species, *Agrius convolvuli*.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 19. 4. 2017

Poděkování:

Predovšetkým, rád by som poďakoval svojmu školiteľovi Zdenkovi Faltýnkovi Fricovi, za podporu, pomoc a korekcie môjho diplomového projektu. Ďalej by som potom rád poďakoval kolegyni Jane Marešovej za uvedenie do problematiky laboratórnej práce. Moja vďačnosť patrí aj kolegom, kurátorom a zberateľom, ktorí prispeli rôznym počtom vzoriek, a to menovite Tomášovi Melicharovi, Thomasovi Wittovi, Vadimovi Krutovovi, Tony Kingstonovi, Goeffovi Martinovi, Rajaei Hosseinovi, Androvi Truuverkovi, Markusovi Franzenovi, Robertovi Hoaremu, Danielovi Janzenovi, Vazrickovi Nazarimu, Ianovi Kitchingovi a mnohým ďalším, ktorí mi pomohli v rôznej miere so vzorky a komentármi. Veľkú vďačnosť by som chcel vyjadriť aj mojej rodine, za trpezlivosť, pomoc a podporu behom mojich štúdií.

OBSAH

1 ÚVOD 1
1.1 Systematika lišajovitých rodu *Agrius* 2
1.1.1 Lišaj pupencový (*A. convolvuli*) 3
1.1.2 Lišaj pruhovaný (*A. cingulata*) 5
1.1.3 Lišaj smútočný (*A. luctifera*), lišaj Godartov (*A. godarti*), lišaj Rothschildov (*A. rothschildi*), lišaj borákový (*A. cordiae*) 6
1.2 Fylogenéza lišajovitých (Sphingidae) 8
1.2.1 Fylogenéza rodu *Agrius* 10
1.3 Biogeografia lišajovitých (Sphingidae) 11
2 CIELE PRÁCE 13
3 METODIKA 14
3.1 Materiál 14
3.2 Izolácia DNA 14
3.3 PCR 15
3.4 Elektroforéza 16
3.5 Sekvenácia a alignment 16
3.6 Analýzy 17
3.6.1 Substitučné modely 17
3.6.2 Fylogenéza a jej kalibrácia prostredníctvom programu BEAST 17
3.6.3 BioGeoBEARS – rekonštrukcia historickej biogeografie rodu *Agrius* 17
3.6.4 Vzťahy medzi haplotypmi u lišaja pupencového *A. convolvuli* 18
3.6.5 Populačno-genetické parametre *A. convolvuli* 18
4 VÝSLEDKY 20
4.1 Molekulárna fylogenéza lišajovitých rodu *Agrius* 20
4.2 Historická biogeografia lišajovitých rodu *Agrius* 22
4.3 Vnútrodruhová diverzita u lišaja pupencového *A. convolvuli* 22
4.4 Populačno-genetické analýzy lišaja pupencového (*A. convolvuli*) 24

5 DISKUSIA 30
5.1 Molekulárna fylogenéza a historická biogeografia 30
5.2 Fylogeografická história lišaja pupencového (*A. convolvuli*) 31
6 ZÁVER 33
7 LITERATÚRA 34
8 PRÍLOHY 40

1 ÚVOD

Súčasné a predchádzajúce rozšírenie rastlín a živočíchov je výsledkom meniacich sa geologických a klimatických podmienok (Zink *et al*. 2000; Beck *et al*. 2006). Hlavné klimatické činitele, ako napríklad glaciály a postupné otepľovanie, v minulosti výrazne ovplyvňovali disperziu rastlín a živočíchov (Parmesan *et al*. 1999; Thomas *et al*. 2004; Van der Putten *et al*. 2010). Hlavným geologickým faktorom, ktorý umožňoval, resp. bránil disperzii druhov, bol pohyb litosferických dosiek a zmeny, ktoré neskôr vyvolal (Cracraft 1974; Metcalfe 2001). Jedná sa predovšetkým o zmeny hladín morí, vznik a zánik pevninských mostov a horotvornú činnosť (Lohman *et al*. 2011). Výsledkom pôsobenia týchto vplyvov bola adaptácia organizmov na nové podmienky. Mnohým druhom sa vďaka vzniku migračných ciest naskytla príležitosť osídľovať nové oblasti a možnosť k ďalšej diverzifikácii (Welton *et al*. 2014). Prvotne sa nerovnomerné rozšírenie druhov vysvetľovalo ako následok diaľkových disperzií (Udvardy 1969). S príchodom tektoniky sa však tieto javy začali vysvetľovať prostredníctvom vikariancie, ktorá je prirodzeným následkom dynamiky Zeme (Wiley 1988). Avšak vikariancia neovplyvňuje distribúciu všetkých organizmov rovnako. Relatívne mladé druhy (napr. *Homo sapiens*, atď.), ktoré sa objavili v dobách po Miocéne už boli vsadené do celkov terajšieho vzhľadu, a preto ich distribúcia nebola výrazne ovplyvnená tektonickou činnosťou. Ďalšou takou skupinou sú organizmy s dobrou schopnosťou disperzie. Príkladom sú niektoré druhy vtákov (Voelker *et al*. 2007) a motýľov (Braby & Pierce 2007; Kodandaramaiah & Wahlberg 2007) predovšetkým patriace medzi vynikajúcich letcov. Patrí tu aj mnoho druhov z čeľade lišajovitých (Sphingidae), napr. lišaj pupencový, či lišaj pruhovaný (Pittaway 1993; Tuttle 2007), ktorí sa dokonca radia, podobne ako niektoré druhy vtákov (Dor *et al*. 2010), medzi sezónnych migrantov sťahujúcich sa do vyšších zemepisných šírok. Vďaka týmto dobrým disperzným schopnostiam majú mnohé z týchto druhov veľký areál rozšírenia (*Agrius convolvuli*, *Lampides boeticus*, *Vanessa atalanta*). Veľa takýchto druhov je však považovaných za geneticky málo variabilných, čo je následkom rýchlej kolonizácie veľkého geografického areálu (Behere *et al*. 2007; Lohman *et al*. 2008; Yago *et al*. 2008). Môžeme to však považovať za zvláštnosť, že jeden, druhovo málopočetný rod motýľov, môže obsahovať svetovo najmobilnejších letcov schopných preletieť tisíce kilometrov (*A. convolvuli*), a zároveň striktných endemitov (*A. cordiae*) navyše sa vyskytujúcich na mnohých ostrovoch sympatricky. Otázne je, či aj tu platí, že endemitné druhy z rodu *Agrius* mali vysoko mobilných predkov podobne ako u babočiek rodu *Vanessa*

(Wahlberg & Rubinoff 2011), alebo či ostrovné endemity, tvoria zvlášť separovanú skupinu. Obzvlášť, keď ich môžeme považovať za podstatne náchylnejšie k extinkcii, pretože ostrovná fauna patrí v súčasnosti medzi tie najohrozenejšie (SAX & GAINES 2008). Otázne je aj to, či sú, alebo nie sú línie nemigrujúcich endemitov evolučne staršie ako tie obsahujúce mobilné široko rozšírené druhy. Tieto trendy a otázky vyskytujúce sa u mnohých rodov denných motýľov boli už v rámci niekoľko málo prác riešené (Lohman *et al*. 2008; Yago *et al*. 2008; Wahlberg & Rubinoff 2011; Smith 2014), avšak u nočných motýľov tento typ prác chýba.

1.1 Systematika lišajovitých rodu *Agrius*

Lišaje z rodu *Agrius* Hübner, 1819 boli hlavne v 20. storočí súčasťou rôznych štúdií. Diskutovaná bola bionómia druhov (Harbich 1980; Common 1990; Tuttle 2007) a samozrejme ich taxonomické zaradenie (Linnaeus 1758; Oken 1815; Hübner 1819). Práve v rámci taxonómie panovala dlhodobo neistota, nakoľko lišaj pupencový a lišaj pruhovaný boli pôvodne popísané v rámci rodu *Sphinx* Linnaeus, 1758. V roku 1815 boli oba tieto druhy preradené do nového rodu *Herse* Oken 1815 (typový druh *S. convolvuli*). Rod *Agrius* (typový druh *S. cingulata*) bol vytvorený Hübnerom až v roku 1819 a oba vtedy existujúce druhy (*A. cingulata*, *A. convolvuli*) boli znovu preradené. Dlho však bol považovaný za mladšie subjektívne synonymum, a preto sa v literatúre počas celého 20. storočia stretávame hlavne s rodovým názvom *Herse*. Avšak v roku 1956 komisia ICZN rozhodla, že Oken nedodržal platné pravidlá binomickej nomenklatúry, a preto teda platí najstaršie platné subjektívne synonymum, ktorým je názov *Agrius* (Schreiber 1978). Podobne, Tutt v roku 1904 na základe deskripcie *A. convolvuli* vytvoril nový tríbus Agriidi, ktorý niesol názov po rode *Agrius*. Tento *de novo* vytvorený tríbus bol však neskôr uznaný za mladšie subjektívne synonymum už popísaného tríbu Acherontiini (Pittaway & Kitching 2000).

Čeľad: Sphingidae Latreille, 1802

Podčeľad: Sphinginae Latreille, 1802

Tribus: Acherontiini Boisduval, 1875 [= Agriidi Tutt, 1904]

Rod: *Agrius* Hübner, 1819

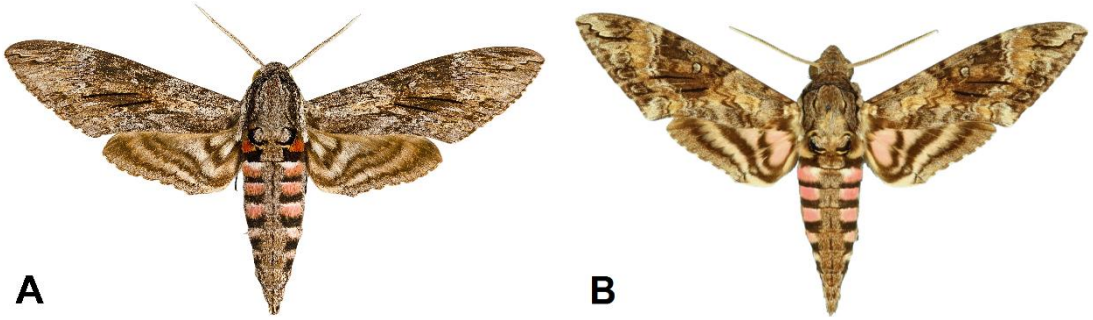
1.1.1 Lišaj pupencový (*A. convolvuli*)

Lišaj pupencový (Obrázok 1-A) bol popísaný v roku 1758 Linném ako *Sphinx convolvuli*. V roku 1815 sa stal typovým druhom pre rod *Herse* a v roku 1819 bol *Herse convolvuli* preradený Hübnerom do rodu *Agrius*. Ten však bol dlhé roky považovaný za mladšie subjektívne synonymum, a preto vo väčšine literatúry 20. storočia figuruje, spolu s ostatnými druhmi tohto rodu, stále ako *H. convolvuli*. V súčasnosti evidujeme dva platne popísané poddruhy a asi 20 rôznych variet a farebných aberácií z rôznych oblastí výskytu lišaja pupencového, ktoré sú dnes považované jeho synonymum (Kitching & Cadiou 2000).

- ssp. *marshallensis* (Clark, 1922)

  TL: Maršalove ostrovy, Jaluit atol
- ssp. *peitaihoensis* (Clark, 1922)

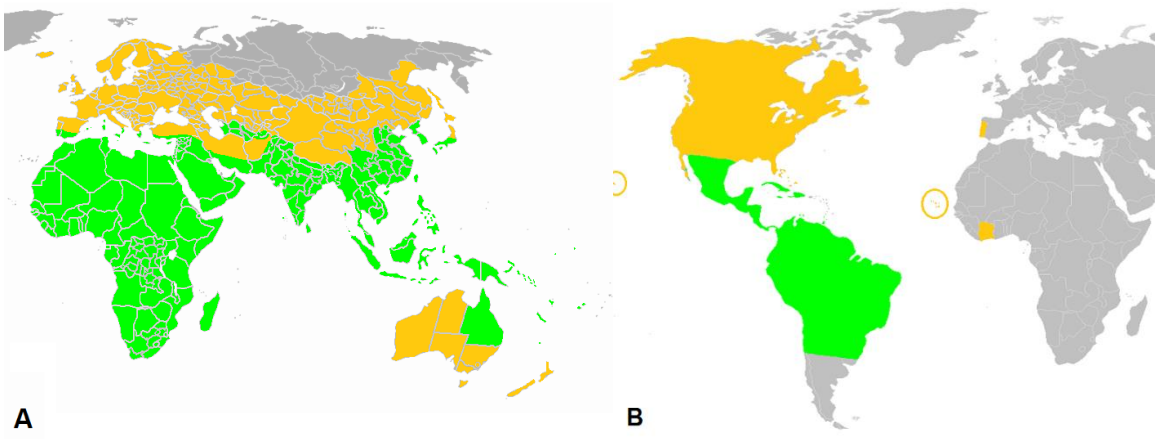
  TL: Čína, Beidaihe dištrikt



Obrázok 3: A - Lišaj pupencový (*A. convoluvli*), **B -** Lišaj pruhovaný (*A. cingulata*) [foto: Ian Kitching]

Lišaj pupencový je starosvetský druh s disjunktným rozšírením, patriaci vďaka výborným letovým schopnostiam medzi migrantov na veľké vzdialenosti. Areál rozšírenia (Obrázok 2-A) u tohto druhu sa tiahne naprieč paleotropickou a australázijskou oblasťou odkiaľ migruje smerom na sever, s výnimkou subarktických zón (de Freina & Witt 1987; Pittaway 1992). V Európe má tento druh údajne stále populácie v oblasti Mediteránu odkiaľ migruje do Strednej a Severnej Európy, kde ho možno zachytiť až na Islande, či Faerských ostrovoch. Behom migrácie zakladá tzv. démy (dočasné populácie), ktoré sú posilované populáciami z juhu (Macek *et al*. 2007). Lišaje liahnuce sa u nás v jeseni nie sú ešte pohlavne dospelé (Harbich 1980), dospievajú až behom migrácie na juh. V Australázijskej oblasti sa jeho výskyt tiahne od Austrálie naprieč Oceániou, až po Nový Zéland (Waterhouse 1998). Lišaj

pupencový obýva prevažne teplé, suché habitaty ako napr. stepné lúky, trávnaté úhory a okraje polí (de Freina & Witt 1987). Dospelí lišaji sa radi, za súmraku a v noci, kŕmia na kvetoch s dlhým okvetím (napr. *Phlox*, *Petunia*, *Origanum*, *Convolvulus*, *Nicotiana*, *Lonicera*, atď.). Vďaka dlhému cuciaku patria k významným opeľovačom tohto typu kvetov (Johnson & Raguso 2016). Húsenice sa v Strednej Európe živia prevažne rastlinami z čeľade Convolvulaceae (Ebert 1994; Lepidopterologen-Arbeitsgruppe 1997), nájsť ich však môžeme aj na iných rastlinách (napr. Polygonaceae, Balsaminaceae, atď.). V juhovýchodnej Ázii (a zrejme aj v Afrike) je tento druh lišaja považovaný za ekonomicky významného škodcu povojníkov rodu *Ipomoea* a niekoľkých ďalších strukovín, najmä z rodov *Vigna* a *Phaseolus* (Holloway 1987; Waterhouse 1998). Húsenice vytvárajú tri farebné variácie - čiernu, hnedú a zelenú (Dupont & Roepke 1941). Sú aktívne a prijímajú potravu prevažne v noci. Cez deň sa skrývajú na zemi pri koreňoch rastlín, alebo v hrabanke (Harbich 1975; Macek *et al*. 2007). Dĺžka vývoja húsenice je jeden až dva mesiace v závislosti od vonkajších podmienok (Ebert 1994) a prechádza piatimi instarmi. Plne vyvinutá môže dosahovať dĺžky až 9 cm. V čase kuklenia už húsenica niekoľko dní neprijíma potravu, a podobne ako u väčšiny druhov z danej skupiny, zalieza do zeme, kde si vytvára spevnenú komôrku (Pittaway 1992; Macek *et al*. 2007). Hĺbka, v ktorej si húsenica vytvára komôrku je variabilná, no môže presiahnuť 30 cm. Kukla je u lišajov pupencových prezimujúcim štádiom. Je veľká a nápadná, hlavne vďaka typicky vyčnievajúcemu cuciaku. Dĺžka diapauzy závisí od vonkajšej teploty. Pri priemernej teplote 30°C (údaje pre Egypt) môže diapauza trvať do 14 dní (Awadallah *et al*. 1976), pri 25°C (údaje pre Japonsko) je to približne 22 dní (Harbich 1980; Setokuchi *et al*. 1985). Doba liahnutia imág závisí od zemepisnej šírky. Samica po spárení kladie obvykle jednotlivo vajíčka prevažne na spodnú stranu listu (Macek *et al*. 2007). Celkové množstvo vajíčok, ktoré samica môže naklásť sa pohybuje v rozpätí od 100 do 360 kusov (Harbich 1980). Lišaj pupencový zvykne zalietať aj do vyšších nadmorských výšok presahujúcich 2000 m (Holloway 1987).

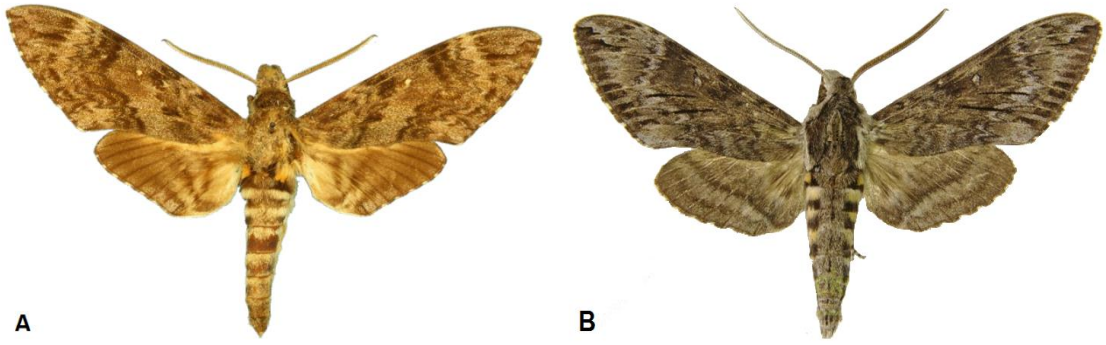


Obrázok 2: A - Rozšírenie lišaja *Agrius convolvuli*, **B** - Rozšírenie lišaja *Agrius cingulata* (zelená - stabilné rozšírenie, žltá - oblasti kam druh migruje)

1.1.2 Lišaj pruhovaný (*A. cingulata*)

Lišaj pruhovaný (Obrázok 1-B) bol popísaný Fabríciom v roku 1775 ako *Sphinx cingulata* a neskôr Hübner v roku 1819 popísal rod *Agrius*. I tento druh však behom 20. storočia bol známy pod rodovým menom *Herse* (Rothschild & Jordan 1903). Dnes poznáme približne sedem farebných aberácií a variet vyskytujúcich sa u *A. cingulata*. Všetky sú považované za subjektívne synonymum (Kitching & Cadiou 2000). Lišaj pruhovaný je novosvetský druh, vyskytujúci sa v súčasnosti v Južnej, Strednej a Severnej Amerike a na ich priľahlých ostrovoch (Obrázok 2-B), ktoré postupne kolonizoval (Tuttle 2007). V rámci Severnej Ameriky sú známe pravidelné letné migrácie na sever (napr. Kanada) a zrejme migruje aj južne (Tuttle 2007; Ballesteros-Mejia *et al*. 2011). Pred vyše 30 rokmi bol tento lišaj po prvýkrát reportovaný z Afrotropickej oblasti, konkrétne z Cape Verde (Bauer & Traub 1980). Dnes už je tento druh pevne etablovaný napríklad na ostrovoch Sao Filipe, či Santo Antao (Ballesteros-Mejia *et al*. 2011). V roku 2002 bola samica lišaja pruhovaného po prvýkrát chytená na africkej pevnine, presnejšie v okolí mesta Man na Pobreží Slonoviny (Melichar *et al*. unpubl.) a v 2006 sa objavil túlavý jedinec v Portugalsku (Marabuto 2006). Nie je známe, či tieto vzdialené oblasti boli kolonizované prirodzene, alebo s ľudskou pomocou. Hostiteľskou rastlinou lišaja pruhovaného sú totiž, podobne ako u lišaja pupencového, povojníky rodu *Ipomoea* (Tuttle 2007; Ballesteros-Mejia *et al*. 2011). Povojník batátový (*I. batatas*), alebo tzv. batáta je považovaná za ekonomicky významnú plodinu, ktorá je široko pestovaná v Novom svete a v Afrike. Imága sú aktívne v noci a okrem statusu škodcu (Schotman 1989) sú považované taktiež za významných opeľovačov (Jordano 2016)

a zlodejov nektáru (Fox *et al*. 2015) u rastlín s dlhým okvetím (*Petunia, Saponaria, Nicotiana, Lonicera, Vinca,* atď.). Húsenice sa kŕmia solitárne na spodnej strane listu rastlín z čeľade pupencovitých (Convolvulaceae) a sú aktívne cez deň, ale aj v noci. Vytvárajú tri rôzne farebné formy – dve zelené a jednu hnedú. Kuklia sa podobne ako lišaj pupencový v podzemnej komôrke. Doby letu a vývinu sú obdobné ako u lišaja pupencového, a tiež sú v prevažnej miere závislé na latitude a teplote prostredia, v ktorom sa jedinci vyvíjajú.



Obrázok 3: A - Lišaj smútočný (*Agrius luctifera*), **B -** Lišaj borákový (*Agrius cordiae*) [foto: Ian Kitching]

1.1.3 Lišaj smútočný (*A. luctifera*), lišaj Godartov (*A. godarti*), lišaj Rothschildov (*A. rothschildi*), lišaj borákový (*A. cordiae*)

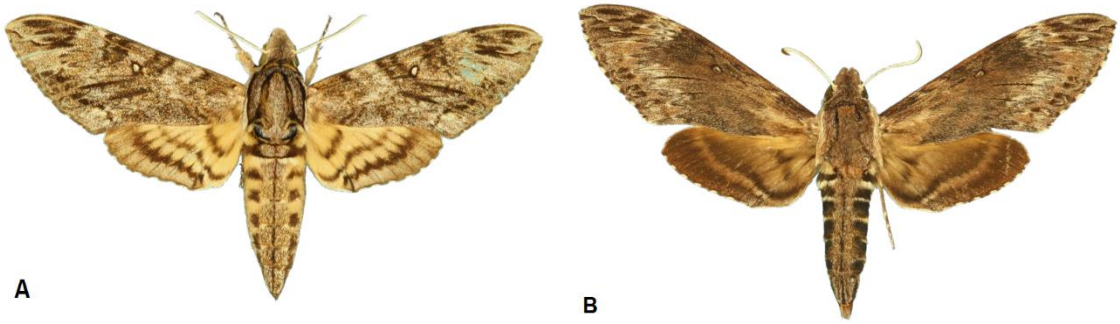
Lišaj smútočný (Obrázok 3-A) bol popísaný Walkerom v roku 1865. Neskôr bol preradený do rodu *Herse* (Rothschild & Jordan 1903). Jedná sa o wallaceánsky druh lišaja (Obrázok 5-B) s rozšírením prevažne v Indonézii, avšak zasahujúcim až na Papuu-Novú Guineu (Holloway 1983). Obýva prevažne nížinné biotopy v blízkosti pobrežia a hostiteľskou rastlinou sú pravdepodobne taktiež rastliny z čeľade pupenvitých (Convolvulaceae). V súčasnosti evidujeme jeden platný poddruh lišaja smútočného, ktorý ale však bude pravdepodobne iba odchýlka spôsobená prostredím, a teda subjektívne synonymum (Kitching & Cadiou 2000).

- ssp. *elegans* (Gehlen, 1932)

  TL: Halmahera, Moluky, Indonézia

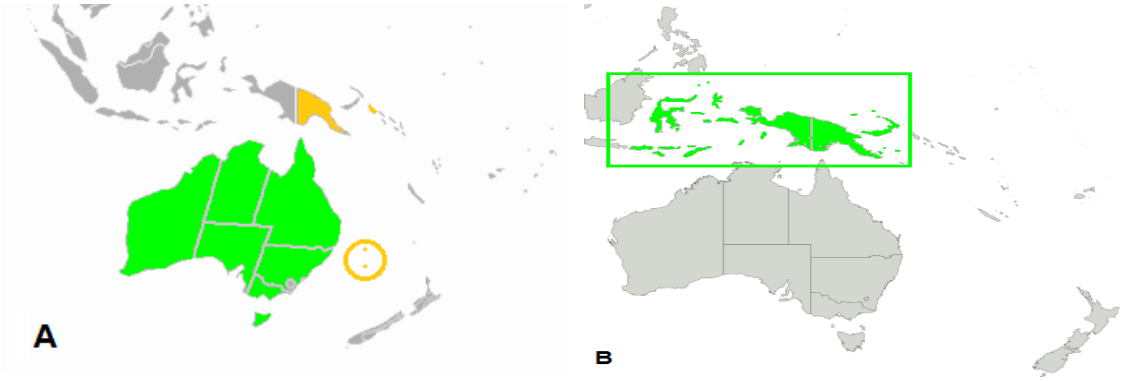
Lišaj Godartov (Obrázok 4-A) je austrálsky druh lišaja popísaný Macleaeyom v roku 1826. V Austrálii sa vyskytuje v oblastiach Severné Teritórium, Queensland, Nový Južný Wales

a Viktória (Obrázok 5-A). Je považovaný za endemický druh avšak podľa všetkého existuje niekoľko nálezov tohto lišaja aj z juhu Papui-Novej Guinei. Podobne, ako u predošlých zástupcov tohto rodu, i tu sú hostiteľskými rastlinami pupencovité (Common 1990).



Obrázok 4: A - Lišaj Godartov (*A. godarti*), **B** - Lišaj Rothschildov (*A. rothschildi*) [foto: Ian Kitching]

Lišaj Rothschildov (Obrázok 4-B) bol popísaný lordom Rothschildom v roku 1894 ako *Sphinx fasciatus*. Do rodu *Agrius* bol preradený až v roku 2000 (Kitching & Cadiou). Zároveň bolo rovnakými autormi pre tento taxón vytvorené náhradné druhové meno *rothschildi*, nakoľko názov *Sphinx fasciatus* Rothschild, 1894 je mladším primárnym homonymom mena *Sphinx fasciatus* Sulzer, 1776 (dnes *Eumorpha fasciatus*). V mnohých svetových zbierkach však figuruje častokrát pod názvom *A. fasciatus*. Jedná sa o ostrovný endemit Novej Kaledónie. Bionómia lišaja Rothschildovho bude zrejme podobná ako u predchádzajúcich lišajov z tohto rodu.

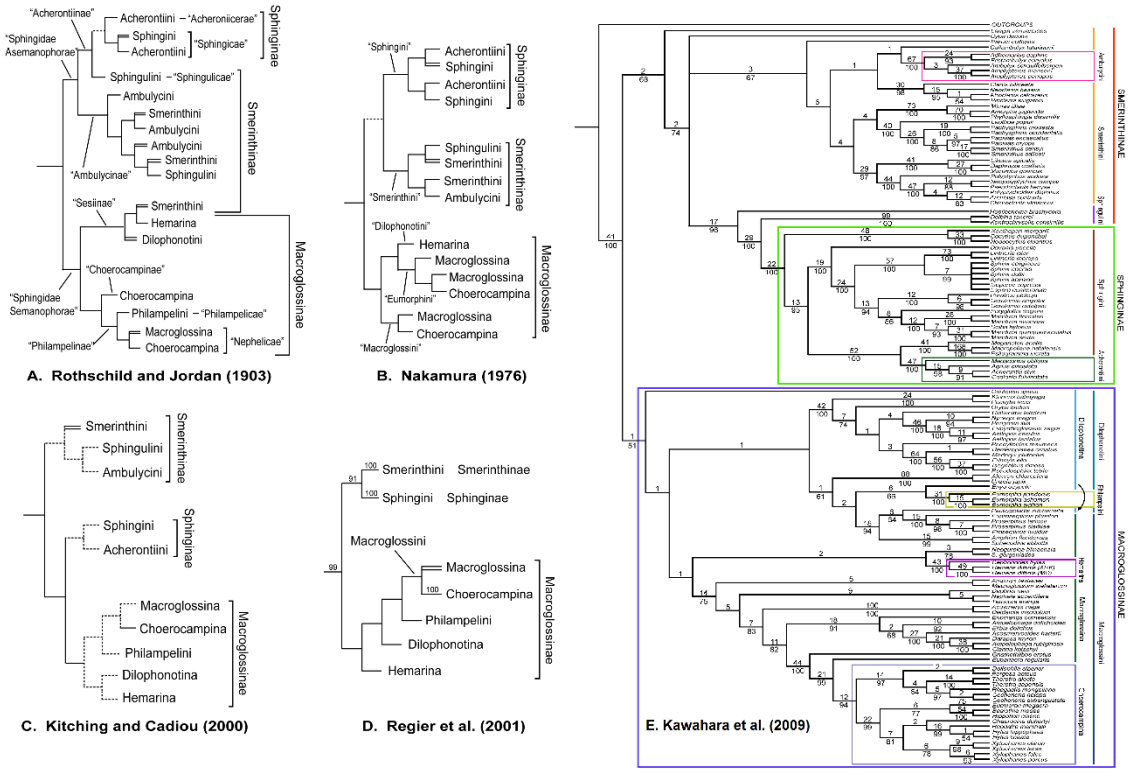


Obrázok 5: Rozšírenie lišaja *Agrius godarti* (žltá - oblasť kam zalietava) , **B** – Rozšírenie lišaja *Agrius luctifera*

Lišaj borákový (Obrázok 3-B) bol popísaný Riottem v roku 1984 a je ostrovným endemitom Markézskych ostrovov, ktoré sú súčasťou Francúzskej Polynézie. Potravné preferencie *A. cordiae* sú zrejme podobné ako u lišaja pupencového (Riotte 1984).

1.2 Fylogenéza lišajovitých (Sphingidae)

Sphingidae patrí do nadčeľade Bombycoidea (Minet 1994; Kitching & Cadiou 2000; Kawahara *et al*. 2009; Kawahara & Barber 2015). Snahy o vnútornú rekonštrukciu fylogenézy čeľade prevažne za pomoci morfológie pretrvávali behom celého 20. storočia (Obrázok 6). Už Rothschild s Jordanom (1903) sa pokúsili zrekonštruovať fylogenézu lišajovitých, kde načrtli existenciu piatich súčasných podčeľadí a monofýliu čeľade Sphingidae. Čeľaď rozdelili do dvoch skupín (Asemanophorae a Semanophorae) na základe prítomnosti, poprípade absencie senzorických chlpov mikrotrichií na prvom segmente labiálných pálp. Asemanophorae boli tvorené dnešnými podčeľaďami Sphinginae a Smerinthinae, pričom Semanophorae zase dnešnými Macroglossinae. V rámci druhého významného pokusu (Nakamura 1976) o rekonštrukciu fylogenézy lišajovitých sa už zohľadňovali nielen morfologické znaky imág, ale aj znaky na húseniciach a kuklách, i keď len u v Japonsku sa vyskytujúcich rodov. Výsledkom bola reklasifikácia niekoľkých tríbov, kde označil Smerinthini a Sphingini ako sesterské. Ostávajúce tríby spojil do skupiny pripomínajúce dnešné Macroglossinae. V svetovom katalógu z roku 2000 Kitching & Cadiou navrhli na základe morfologických dát vzťahy medzi jednotlivými rodmi. Smerinthinae boli umiestnené na báze stromu, pričom však zároveň postulovali tríbus Smerinthini ako parafyletický. Podčeľade Sphinginae a Macroglossinae však považovali za monofyletické. Prvá molekulárna analýza (Rieger *et al*. 2001) publikovaná na dvoch markeroch (EF-1α a DDC) jednak potvrdila monofýliu čeľade avšak vyvrátila návrh dvojice Kitching & Cadiou (2000). Potvrdila totiž pôvodnú hypotézu Rothschilda a Jordana, že Smerinthinae spolu so sesterskými Sphinginae umiestnila ako odvodenú skupinu od Macroglossinae ležiacich na báze. Druhý pokus o rekonštrukciu fylogenézy lišajovitých tento krát na piatich nukleárnych markeroch (Kawahara *et al*. 2009) taktiež podporil monofýliu čeľade. Vo vzťahu Smerinthinae + Sphinginae sa potvrdila hypotéza (Rothschild & Jordan 1903), podľa ktorej sú obe tieto skupiny sesterské.



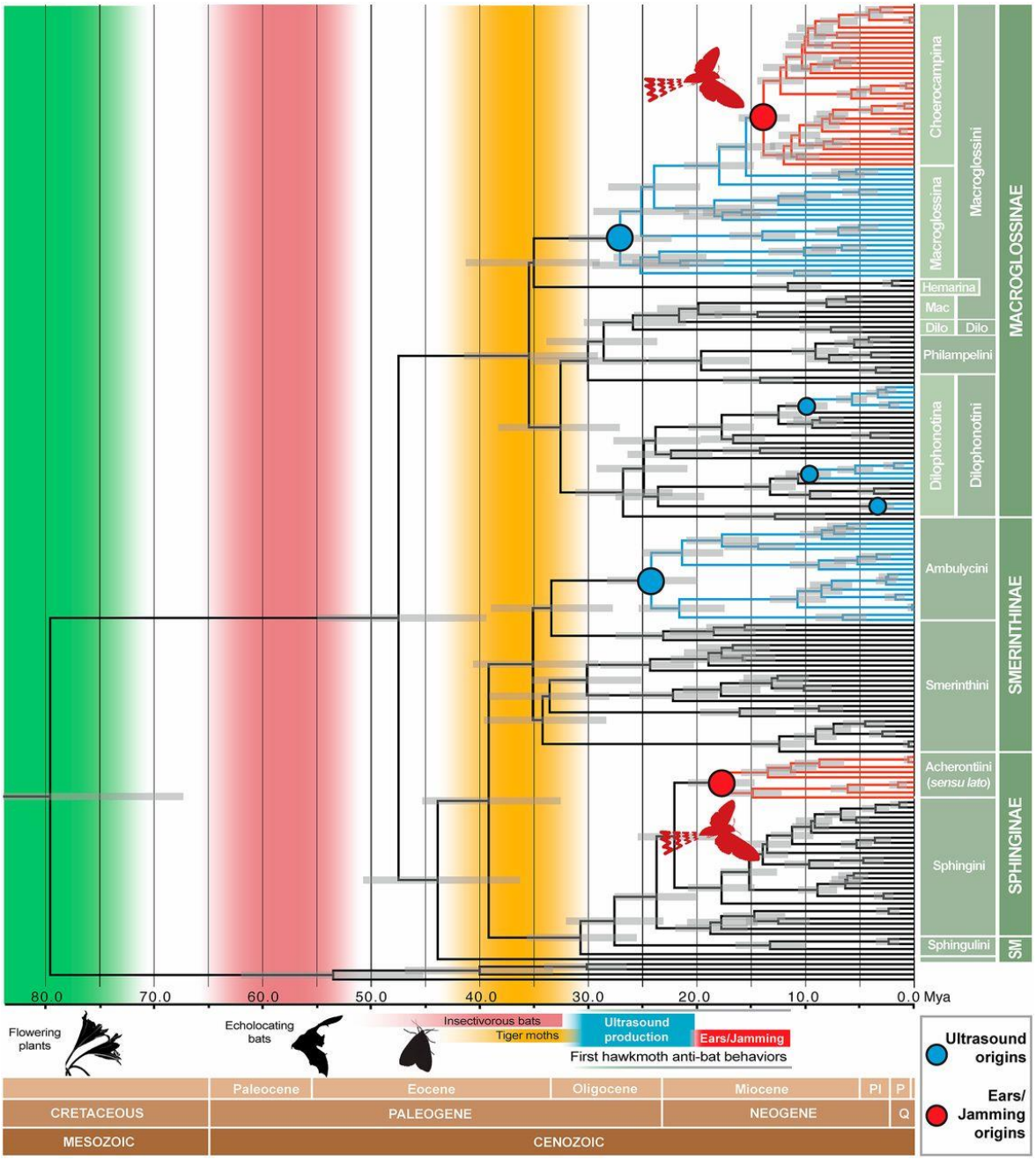
Obrázok 6: Fylogenéza lišajovitých (Sphingidae) a jej vývoj v posledných dvoch storočiach

I v tejto štúdii sa ale Smerinthinae *sensu lato* javia ako parafyletické. Avšak vzhľadom nato, že Ambulicini vyšli ako monofyletické a Smerinthini (mínus rod *Langia*, patriaca zrejme do samostatnej podčeľade Langiinae) tiež, je z danej analýzy zjavné, že Smerinthinae *sensu stricto* budú tiež monofyletické. Autori taktiež navrhujú vytvorenie Sphinginae *sensu stricto* pozostávajúce z podčeľade Sphinginae a časti tríbu Sphingulini. Výsledky tiež zvýrazňujú monofýliu tríbu Acherontiini, ktoré sú súčasťou podčeľade Sphinginae a parafýliu tríbu Sphingini, kde vznikajú monofyletické, prevažne novosvetské Sphingini *sensu stricto* s pravdepodobne starosvetským tropickým pôvodom a odčlenený *Meganoton* clade pozostávajúci z rodov *Meganoton*, *Psilogramma* a *Macropoliana*. Monofýlia podčeľade Macroglossinae taktiež jednoznačne preukázaná nebola. Analýza prakticky rozdelila celú podčeľaď na štyri makro skupiny v rámci troch tríbov. Týmito tríbami sú: Dilophonotini (Dilophonotina *sensu lato* a Hemarina), Macroglossini (Choerocampina a Macroglossina) a Philampelini. Dilophonotina *s.l.* je novosvetská nemonofyletická skupina, ktorá pozostáva z monofyletickej skupiny Dilophonotina *sensu stricto* a ďalšej pravdepodobne polyfyletickej skupiny rodov, kde rod *Eumorpha*, zrejme patrí do tríbu Philampelini a *Proserpinus* group spoločne s rodmi *Amhion* a *Sphecodina* do tríbu Macroglossini. Hemarina je relatívne malá skupina rodov považovaná za monofyletickú už na základe morfologických dát (Kitching &

Cadiou 2000). Molekulárne dáta tento záver podporili. Analýza potvrdila monofýliu pôvodom starosvetskej skupiny lišajovitých Choerocampina a skupiny Macroglossini sensu stricto. Tríbus Macroglossini ako celok je však podľa výsledkov polyfyletický. Posledná publikovaná fylogenéza (Kawahara & Barber 2015) odhaduje vznik lišajovitých v Eocénu (cca. 47 miliónmi rokov) a potvrdzuje monofýliu čeľade. Ich výsledky potvrdzujú zistenia predchádzajúcej skupiny autorov, avšak na rozsiahlejších dátach (Obrázok 7). Navyše sa dozvedáme, že sa u lišajov niekoľkokrát nezávisle vyvinula v priebehu evolúcie ako rušička ultrazvukov, tak ich samotná produkcia a schopnosť vnímania.

1.2.1 Fylogenéza rodu *Agrius*

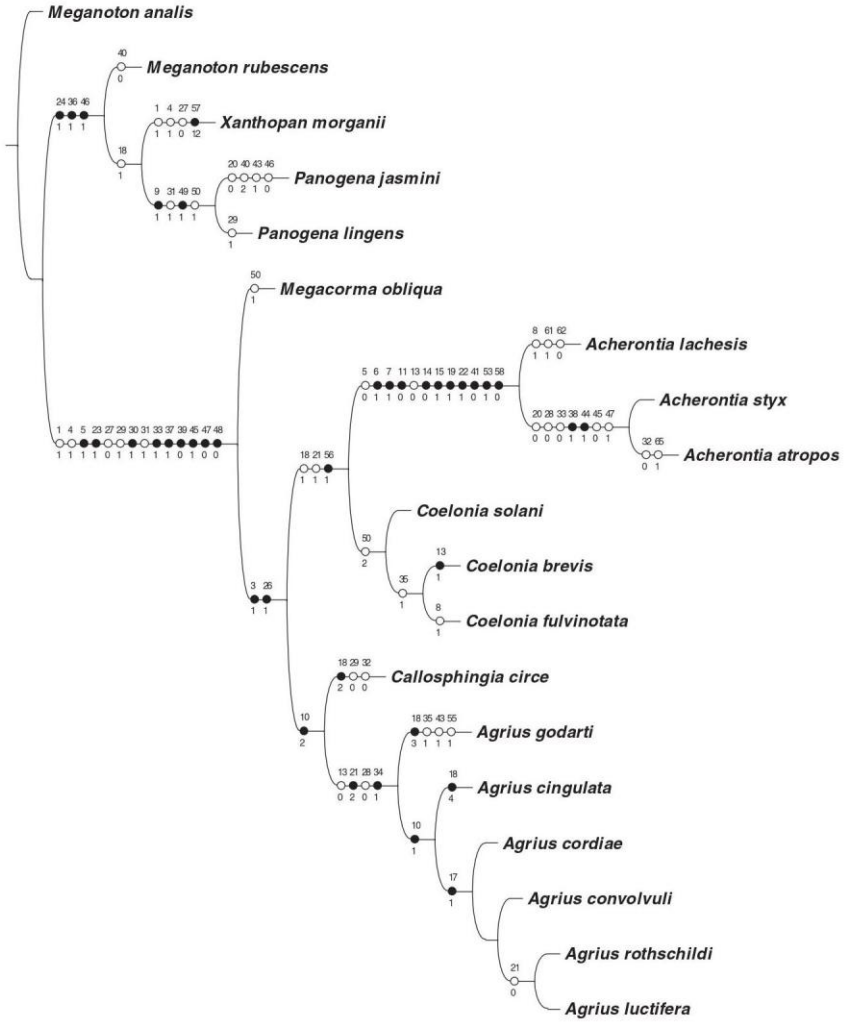
Lišajovité z rodu *Agrius* boli súčasťou niekoľkých fylogenetických štúdií ako typickí zástupcovia tríbu Acherontiini *sensu lato* (Kitching 2002; Kawahara *et al*. 2009; Rougerie *et al*. 2014; Kawahara & Barber 2015). Jednalo sa predovšetkým o lišaja pruhovaného a lišaja pupencového, a teda o druhy s najväčším areálom výskytu z celého rodu. Podľa Kawaharu & Barbera (2015) vznikol rod *Agrius* v Miocéne, asi pred približne 11 miliónmi rokov. Po prvýkrát bol tento rod fylogeneticky študovaný Kitchingom v roku 2002 (chýba *A. cordiae*) a 2003 (už kompletný) pomocou 65 morfologických znakov (Obrázok 8). Jednalo sa o parsimoniálnu rekonštrukciu fylogenézy rodu *Acherontia* v kontexte ostatných rodov z daného tríbu. Z analýz vyplýva, že rod *Agrius* je monofyletický. Najbazálnejšie sa umiestnil austrálsky endemit lišaj Godartov. Prekvapivo lišaj borákový (*A. cordiae*) sa v strome umiestnil medzi lišajov *A. cingulata* a *A. convolvuli* a nie v rámci skupiny ostrovných endemitov (*A. rothschildi* a *A. luctifera*). Jedno z vysvetlení ale môže byť nízky počet analyzovaných znakov, čo spôsobil vek a stav analyzovaného jedinca. Ako sesterská skupina k nami študovanému rodu sa javí rod *Callosphingia*.



Obrázok 7: Prvá publikovaná kalibrovaná fylogenéza Sphingidae [zdroj: Kawahara & Barber 2015]

1.3 Biogeografia lišajovitých

Čeľaď lišajovitých je z hľadiska biogeografie pomerne málo preštudovaná. V minulosti sa publikované práce snažili zhrnúť skôr biogeografiu fauny vybraných celkov (Melanézia, Wallacea, Karibik), a to na báze hlavne distribučných (Mackey 1978; Holloway 1983; Beck *et al*. 2006b) a neskôr aj molekulárnych dát (Kawahara *et al*. 2013).



Obrázok 8: Fylogenéza v tríbu Acherontiini na základe morfologických znakov [zdroj: Kitching 2003]

Avšak vďaka publikovaným fylogenézam (Kawahara *et al*. 2009, Kawahara & Barber 2015) vieme približne vyvodiť isté závery i na úrovni čeľade. Hlavným zistením je starosvetský pôvod predka pre celú čeľaď, na rozdiel od napríklad novosvetského pôvodu inej bombycoidnej čeľade Saturniidae. Všetky tri podčeľade teda zdedili prevažne starosvetskú líniu, ktorá neskôr umožnila vznik druhotnej radiácii do Nového sveta, hlavne medzi tríbami Ambulicini, Smerinthini a Sphingini. Práve Ambulicini majú výborné disperzné možnosti vďaka svojej schopnosti kŕmiť sa ako jediné z celej podčeľade Smerinthinae, ktorá je inak považovaná za skupinu nekŕmiacich sa letcov so slabou schopnosťou prekračovať disperzné bariéry (Beck *et al*. 2006b). Rozhodujúcim faktorom pre dobré disperzné schopnosti sú teda jednak schopnosť imág kŕmiť sa za letu, a jednak spektrum hostiteľských rastlín u húseníc,

ktorá je považovaná za najsilnejší prediktor (Beck *et al*. 2006a), hlavne pre medziostrovné a medzikontinentálne disperzie (Beck *et al*. 2006c) Medzi týmito skupinami obmedzenými prevažne na jednu hemisféru (Kawahara *et al*. 2009) sú evidentné príležitostne sa opakujúce disperzie do tej druhej. Dobrými príkladmi sú zástupcovia rodu *Sphinx* a ich disperzie do Palearktu, lišaje rodu *Amorpha* do Nearktu, poprípade disperzie lišajov z rodov *Cocytius*, *Manduca* a *Agrius* v rámci Nového sveta (Tuttle 2007; Kawahara *et al*. 2013). V podčeľadi Macroglossinae je jasná dichotómia medzi dvoma hlavnými skupinami - starosvetskými Macroglossini *sensu stricto* a novosvetskými Dilophonotina *sensu lato*. Aj tu však podľa výsledkov (Kawahara & Barber 2015) boli recentné disperzie do Nového sveta, a to hlavne v rámci skupiny Choerocampina a Macroglossina. Skupina Hemarina, podobne ako celé Macroglossinae má zrejme starosvetský pôvod.

2 CIELE PRÁCE

V rámci tejto diplomovej práce sme si na začiatku vytýčili tri hlavné ciele:

1. Vypracovanie fylogenetickej analýzy lišajovitých z rodu *Agrius*
2. Rekonštrukcia historickej biogeografie lišajovitých z rodu *Agrius*
3. Analýza vnútro druhových rozdielov u lišaja pupencového (*Agrius convolvuli*)

3 METODIKA

3.1 Materiál

V rámci tohto projektu bol obstaraný materiál z takmer celého areálu výskytu jednotlivých druhov lišajovitých z rodu *Agrius* (Príloha 1). Na prácu bol použitý vlastný materiál a taktiež vzorky pochádzajúce zo súkromnej zbierky Dr. Vadima Krutova (RU) a zo zbierok niekoľkých európskych múzeí – napr. Prírodovedné múzeum v Londýne (UK), Sphingidae múzeum v Příbrami (CZ), Múzeum Witt v Mníchove (D) a Prírodovedné štátne múzeum v Stuttgarte (D). Úspešne spracovaných bolo len 7 vzoriek od druhu *A. cingulata* pochádzajúcich z Argentíny, Ekvádoru, Panamy, Mexika, Kuby a zo Spojených štátov amerických. Dataset lišaja pruhovaného bol následne rozšírený o 59 sekvencií z databázy The Barcode of Life Data Systems (http://www.boldsystems.org). Z druhu *A. convolvuli* bolo úspešne amplifikovaných 56 vlastných vzoriek pochádzajúcich z Afriky, Madagaskaru, Európy, Ázie, Indonézie, Austrálie a Novej Kaledónie. Data boli doplnené o 188 sekvencií pochádzajúcich opäť z BOLDu. Analyzovaných bolo aj 5 vlastných lišajov druhu *A. godarti* z Austrálie a dva kusy druhu *A. rothschildi* z Novej Kaledónie. V rámci indonézskych ostrovov sme úspešne spracovali 6 vlastných vzoriek *A. luctifera* a doplnili ich o tri ďalšie z databázy BOLD. Avšak nepodarilo sa mi zatiaľ amplifikovať použiteľný výsledok u druhu *A. cordiae*. Dôvodom je jednak nízky počet dostupných jedincov (v Európe len tri dostupné jedince) a jednak ich vek. Na určenie koreňa boli fylogenetického stromu a pre výber kalibračných bodov boli ako outgroup vybrané dva druhy z tríbu Acherontiini, a to *Megacorna obliqua* (Walker, 1856) a *Acherontia styx* Westwood, 1847 (Príloha 1).

3.2 Izolácia DNA

Tkanivá pre izoláciu DNA boli získané prevažne zo suchého materiálu lišajovitých, konkrétne sme spracovávali materiál pozostávajúci z nôh lišajov a v jednom prípade z húsenice. Na extrakciu DNA bol použitý kit Genomic DNA Mini Kit (Tissue) od firmy Geneaid, pričom postup izolácie prebiehal podľa inštrukcií výrobcu.

Do eppendorfky s tkanivom bolo pridaných 200 µl GT pufru a následne prebehla mechanická homogenizácia vzorky pomocou sterilnej plastovej pestle. Do vzniknutej zmesi som pridal 25 µl proteinázy K a po dôslednom pretrepaní som ju inkuboval pri teplote 60°C minimálne 8 hodín. Po uplynutí danej doby bolo do eppendorfky pridaných 200 µl GBT pufru, zmes som

dôkladne pretrepal a pokračoval som v inkubácii pri rovnakej teplote po dobu dvoch hodín. Potom som pridal do zmesi etanol (p.a.) o objeme 200 µl, zmes sa svortexovala, scentrifugovala a prepipetovala do filtračných koloniek (GD + zberná kolonka) tak, aby na dne eppendorfky zostala len vzniknutá usadenina. Obsah filtračnej kolonky (cca 620 µl) scentrifugujeme pri 14 tisícoch otáčkach po dobu dvoch minút. Zberná kolonka s filtrátom bola vymenená u všetkých vzoriek za novú. Do filtračnej kolonky som následne napipetoval 400 µl W1 pufru a znovu ju centrifugoval pri rovnakých otáčkach po dobu 30 s. Obsah zbernej kolonky sa potom vyliali, ale samotnú kolonku som u všetkých zachoval. Potom nasledovalo pridanie 600 µl Wash pufru a znovu centrifugácia zmesi rovnakým spôsobom ako v predchádzajúcom kroku. Tentoraz som ale zberné kolonky odstránil a filtračné kolonky osadil do nových, označených eppendorfiek. Vybral som si z inkubátora Ellution pufer, ktorý sa nechal predhriať na 60°C a napipetoval som ho do filtračnej kolonky. Nechal som to odstáť 5 minút a finálnym krokom bola opäť centrifugácia s rovnakými parametrami ako v predchádzajúcich krokoch. Potom som odstránil filtračné kolonky a eppendorfky s vyizolovanou DNA som uchovával v mraze pri teplote -21°C.

3.3 PCR

Fragmenty DNA som amplifikoval pomocou polymerázovej reťazovej reakcie, tzv. PCR. Reakcia PCR bola robená pre dva gény, mitochondriálny (COI) a jadrový (*Wingless*). Na prípravu vzoriek som použil sadu štandardných primerov na fylogenézu motýľov (Wahlberg & Wheat 2008). Mnou použité primery sú obsahom Tabuľka 1. Prvú časť COI som amplifikoval pomocou primeru HybRon-HybHCO a LepF1-LepR1. Na amplifikáciu jadrového génu Wingles som použil primer hybLepWg1-hybLepWg2.

PCR reakcia prebiehala v objeme 25 µl. Reakčná zmes pozostávala z PCR-H_2O a PPP-Mastermixu od spoločnosti Top-Bio. Na jednu vzorku teda pripadali objemy 8,67 µl PCR-H_2O, 12,50 µl PPP-Mastermixu, 1 µl forward primeru a 1 µl reverse primeru. Do zmesi som následne pridal 2 µl z vyizolovanej DNA. PCR reakcia prebiehala pre oba typy génov v nasledujúcich teplotných cykloch:

- 95°C po dobu 5 min
- 40 cyklov:
    - 94°C po dobu 30 s
    - 50°C po dobu 30 s
    - 72°C po dobu 1 min a 30 s
- záverečná extenzia pri 72°C po dobu 10 min.

Na overenie, či PCR reakcia bola úspešná, som použil agarózovú elektroforézu.

Tabuľka 1: Primery použité na PCR reakciu

Gén	Časť	Typ	Primer	Sekvencia
COI	1	F	HybRon	5' GGAGCYCCWGATATAGCTTTCCC 3'
	1	R	HybHCO	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'
	1	F	LepF1	5' ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG 3'
	1	R	LepR1	5' TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA 3'
Wingless	1	F	hybLepWg1	5' GGARTGYAARTGYCAYGGYATGTCTGG 3'
	1	R	hybLepWg2	5' ACTICGCARCACCARTGGAATGTRCA 3'

3.4 Elektroforéza

Úspešnosť reakcie PCR bola overovaná elektroforézou na 1,5% agaróznom gély, ktorý som pripravil rozpustením 1,5 g agarózy v 98,5 ml TAE a následným zohriatím do bodu varu. Roztok sa prelial do predom pripravenej formy osadenej hrebienkami (2 x 16 jamiek) a bol ponechaný po dobu 30 min. na zatuhnutie. Po vytuhnutí som do každej z jamiek nanášal 5 µl z PCR produktu zmiešaného s farbivom SYBR Green. Do prvej jamky som vždy naniesol marker (ladder). Elektroforéza prebiehala pri izbovej teplote, napätí 150 V po dobu 25 minút.

3.5 Sekvenácia a alignment

Vyhovujúce vzorky som po elektroforéze napipetoval do platní po 96 vzoriek a odoslal na sekvenáciu. Tá prebiehala iba jedným smerom a vzorky boli sekvenované prostredníctvom firmy Macrogen (http://www.macrogen.com/) v Južnej Kórei. Získané sekvencie boli ručne skontrolované a následne alignované v programe Geneious v. 9.0.4. Začiatky a konce boli orezané od nepotrebných úsekov tak, aby začínali a končili v rovnakej pozícii.

3.6 Analýzy

3.6.1. Substitučné modely

Ako prvé som hľadal vhodný model substitúcie nukleotidov, a to prostredníctvom programu MrModeltest 2.2 (Nylander 2004), ktorý pomocou algoritmu v rámci programu PAUP porovnáva rôzne typy modelov. Najvhodnejší z nich je vybratý na základe Akaikeho informačného kriterionu (AIC) a hLRT. Model bol potom pustený cez grafické rozhranie MrMTgui v. 1.0. (Nuin 2005), kde v rámci oboch kritérií vyšiel ako najvhodnejší model HKY + I + G (Hasegawa-Kishino-Yano model s proporciou invariantných miest a gamma distribúcií).

3.6.2 Fylogeneze a jej kalibrácia prostredníctvom programu BEAST

Fylogenetická analýza bola spracovaná pomocou metód Maximum Likelihood (RAxML) a Bayesian analysis (MrBayes 3.2) (Ronquist & Huelsenbeck 2003; Stamatakis 2014). Odhad času vzniku jednotlivých vetiev som počítal v programe BEAST v. 1.8.2 (Drummond *et al.* 2012). Na určenie koreňa fylogenetického stromu a pre výber kalibračných bodov boli na základe výsledkov jedinej publikovanej a kalibrovanej fylogenézy (Kawahara & Barber 2015) vybrané druhy *Megacorna obliqua* a *Acherontia styx* (Príloha 1). Na kalibráciu stromu boli použité dva uzly. Prvým bolo odštiepenie rodu *Megacorna* od zbytku Acherontiini (14,2 mil. rokov), druhým odštiepenie sa rodu *Agrius* od skupiny *Acherontia* + *Coelonia* (11 mil. rokov). Ostatné hodnoty ostali v prednastavenej forme. Ako substitučný model bol použitý HKY + I + G, ktorý vyšiel ako prvý najvhodnejší. Molekulárne hodiny boli nastavené ako striktné a za najvhodnejší bol vybraný koalescentný model s konštantnou veľkosťou (Kingman 1982). Analýzy prebiehali v piatich behoch po 50 miliónoch generácií a samplingu 5000 generácií.

3.6.3 BioGeoBEARS – rekonštrukcia historickej biogeografie rodu *Agrius*

Ako prvé som si pripravil distribučnú maticu, kde som si na základe distribučných dát u jednotlivých druhov zadefinoval 9 celkov (NA – Severná Amerika, CA - Stredná Amerika, SA – Južná Amerika, AF – Afrika, PA – Palearkt, IN – Indonézia, AU – Austrália, OFP – Oceánia a Francúzska Polynézia, NZ – Nový Zéland).

Potom som pomocou predprípravného skriptu nainštaloval v bioštatistickom rozhraní R v. 3.2.3 predpísané balíčky uvedené v zozname BioGeoBEARS potrebné na analýzu dát. Nasledovalo vloženie mnou vytvorenej distribučnej matice spolu s kalibrovaným fylogenetickým stromom, ktorý som dostal v programe BEAST v. 1.8.2. Načítaný strom bol príkazom *drop.tip* orezaný do potrebnej veľkosti a ďalej počítaný v rámci biogeogragickej analýzy. Ancestrálna distribúcia bola počítaná pomocou biogeografického modelu zvaného disperzno - extinkčná kladogenéza (DEC), pričom na výpočet možnej speciácie prostredníctvom efektu zakladateľa bol použitý parameter J, a to ako v nestratifikovanom (NS1-j), tak v stratifikovanom prístupe (TS1-j) na vyhodnotenie dôležitosti diaľkových medzi-ostrovných disperzií (Matzke 2012, 2014).

3.6.4 Vzťahy medzi haplotypmi u lišaja pupencového *A. convolvuli*

Haplotypové siete boli zrekonštruované pomocou programov TCS v. 1.2.1 (Clement *et al.* 2000), pričom spojovacia hodnota bola ponechaná na štandardnej hodnote 95% a vizualizované pomocou programu popART v. 1.7 (Leigh & Bryant 2015). Na ich dodatočnú úpravu bol použitý Adobe Illustrator CS6. V rámci programu popART bolo možné vypočítať aj hierarchickú analýzu molekulárnej variácie AMOVA (Excoffier *et al.* 1992) medzi nami preddefinovanými geografickými celkami. Výsledok tejto analýzy môže vypovedať o variabilite na základe haplotypových sekvencií, a teda či je variabilita najväčšia medzi geografickými skupinami, v populáciách v rámci týchto skupín, alebo priamo medzi jednotlivými populáciami.

3.6.4 Populačno-genetické parametre *A. convolvuli*

Ako prvé som si roztriedil sekvencie do siedmych geografických celkov – Afrika, Madagaskar, Európa, Ázia, Indonézia, Austrália, Oceánia a Francúzska Polynézia. Následne sa testovala neutralita sekvencií mt DNA pre COI v rámci geografických celkov. Štatistická významnosť testu neutrality, ktorú som počítal v programe DnaSP (Librado & Rozas 2009), bola vypočítaná prostredníctvom koalescentných simulácií s 10 000 replikáciami. Počítané boli pre jednotlivé geografické celky (Príloha 4) aj haplotypová diverzita (Hd) (pravdepodobnosť rozdielu dvoch náhodne vybraných haplotypov vo vzorke), nukleotidová diverzita (π) (pravdepodobnosť rozdielu dvoch náhodne vybraných homologických, nukleotidových pozícií) a počet polymorfných miest (S). Počítané boli aj priemerný počet

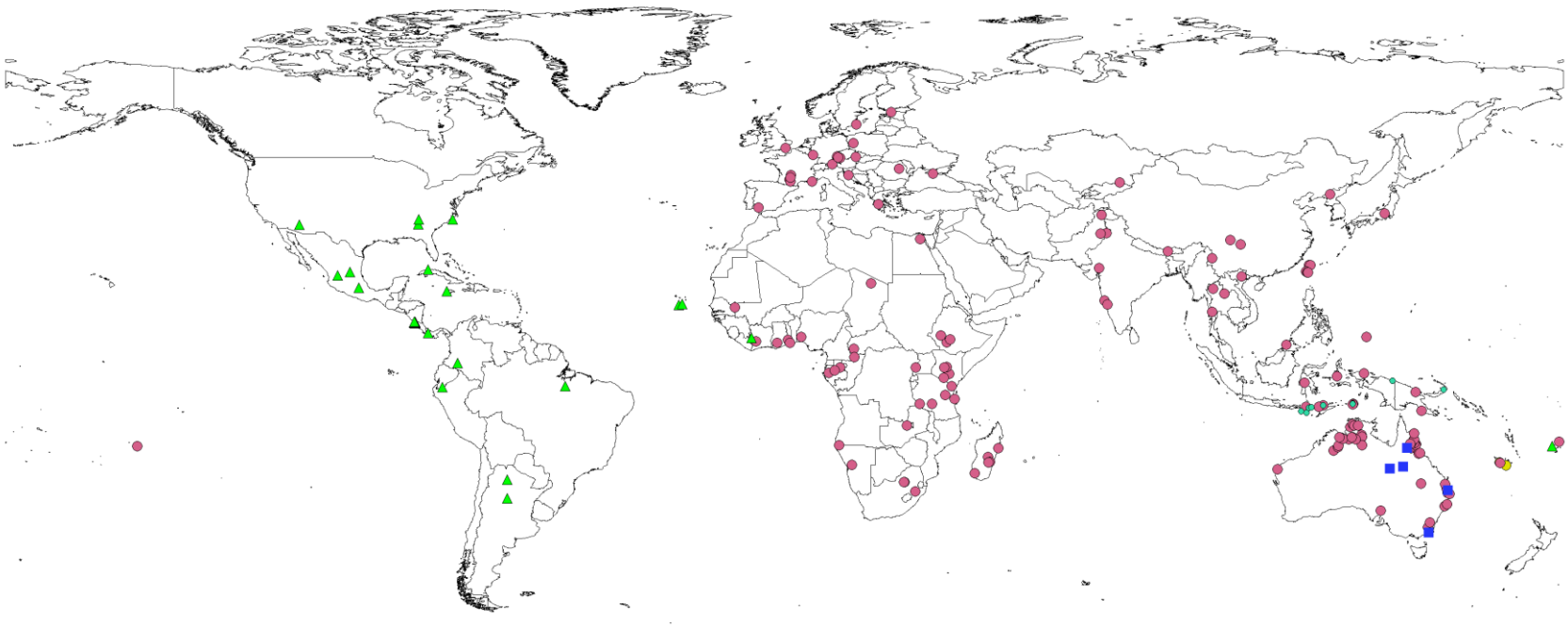
nukleotidových rozdielov (k) v rámci analýzy sekvenčného polymorfizmu (Wakeley 1996) vybraných celkov a DNA divergencia porovnávaná medzi jednotlivými nami definovanými celkami vyjadrená priemerným počtom nukleotidových rozdielov (k_P) v nich (Príloha 3). Pre zhodnotenie genetickej štruktúry v geografických regiónoch a vyjadrenie divergencie medzi ich populáciami bol vypočítaný aj ich párový fixačný index (Fst). Vyššie hodnoty fixačného indexu (Fst) môžu znamenať zníženie genetického toku medzi celkami a môžu poukázať na vplyv genetického driftu u populácii v nami charakterizovaných celkoch (Príloha 2).

4 VÝSLEDKY

Na analýzy bolo použitých celkovo 323 sekvencií prvého úseku génu COI (mt DNA), pričom sa jednalo o 144 sekvencii *A. convolvuli*, 65 sekvencií *A.cingulata*, 9 sekvencii *A. luctifera*, 5 sekvencii *A. godarti* a 2 sekvencie *A. rothschildi* (Obrázok 9). Z tohto počtu sa mi úspešne podarilo vyizolovať a amplifikovať 74 vzoriek. Dataset bol neskôr doplnený o 249 sekvencií prvého úseku COI pochádzajúcich z databázy BOLD (Obrázok 9). Všetky sekvencie boli upravené a skrátene na dĺžku 688 bp. Boli získané aj sekvencie pre nukleárny gén *Wingless*, a to u 36 vzoriek *A. convolvuli*, 6 vzoriek *A. cingulata*, 5 vzoriek *A. godarti*, 6 vzoriek *A. luctifera* a jednej vzorky druhu *A. rothschildi*. U mnohých jedincov sa nám nepodarilo amplifikovať použiteľnú DNA a z tohto dôvodu sme ich do prezentovaných analýz nezahrnuli.

4.1 Molekulárna fylogenéza lišajovitých rodu *Agrius*

Výsledný fylogenetický strom a molekulárne datovanie boli vytvorené prostredníctvom Bayesiánskej analýzy v programe BEAST v. 1.8.2 a potom ďalej použité na rekonštrukciu historickej biogeografie pomocou BioGeoBEARS (Obrázok 10). Znázornené sú vzťahy medzi jednotlivými druhmi v rode, ich ancestrálna a súčasná distribúcia. *Agrius* je monofyletickým rodom, ktorý vznikol približne pred 9,4 miliónmi rokov a vzápätí nato sa rozštiepil na dve druhové línie. V prvej línii sa pred 6,9 miliónmi rokov odštiepil od predka *A. convolvuli*, ktorý sa neskôr pred 1,7 miliónmi rokov rozštiepil na dva samostatné druhy. Pod výsledkov mojej fylogenézy je *A. convolvuli* parafyletický. To je však možno považovať za dôsledok chybnej identifikácie jedincov zberateľmi, ktorí vzorky poskytli, poprípade kontamináciou behom izolácie. Sesterskou skupinou druhov, ktorá sa odštiepila pred 5 miliónmi rokov, je skupina austrálskych, oceánskych a polynézskych endemitov. Tu sa ako prvý vyspecioval *A. godarti* pred asi 1,3 miliónmi rokov. Ďalej tu patrí *A. rothschildi*, ktorý recentne vznikol v Novej Kaledónii, a ktorý je zrejme výsledkom bottlenecku. Do tejto skupiny bude pravdepodobne patriť aj druh *A. cordiae*, ktorý sa nám ale nepodarilo úspešne osekvenovať. V druhej línii sa ako prvý odštiepil pred zhruba 3,4 miliónmi rokov *A. luctifera*. I ten vychádza z výsledkov ako parafyletický a zrejme i z rovnakých dôvodov ako u lišaja pupencového. Druhým druhom tejto línie je novosvetský druh *A. cingulata* odštepujúci sa približne pred 2,5 miliónmi rokov.



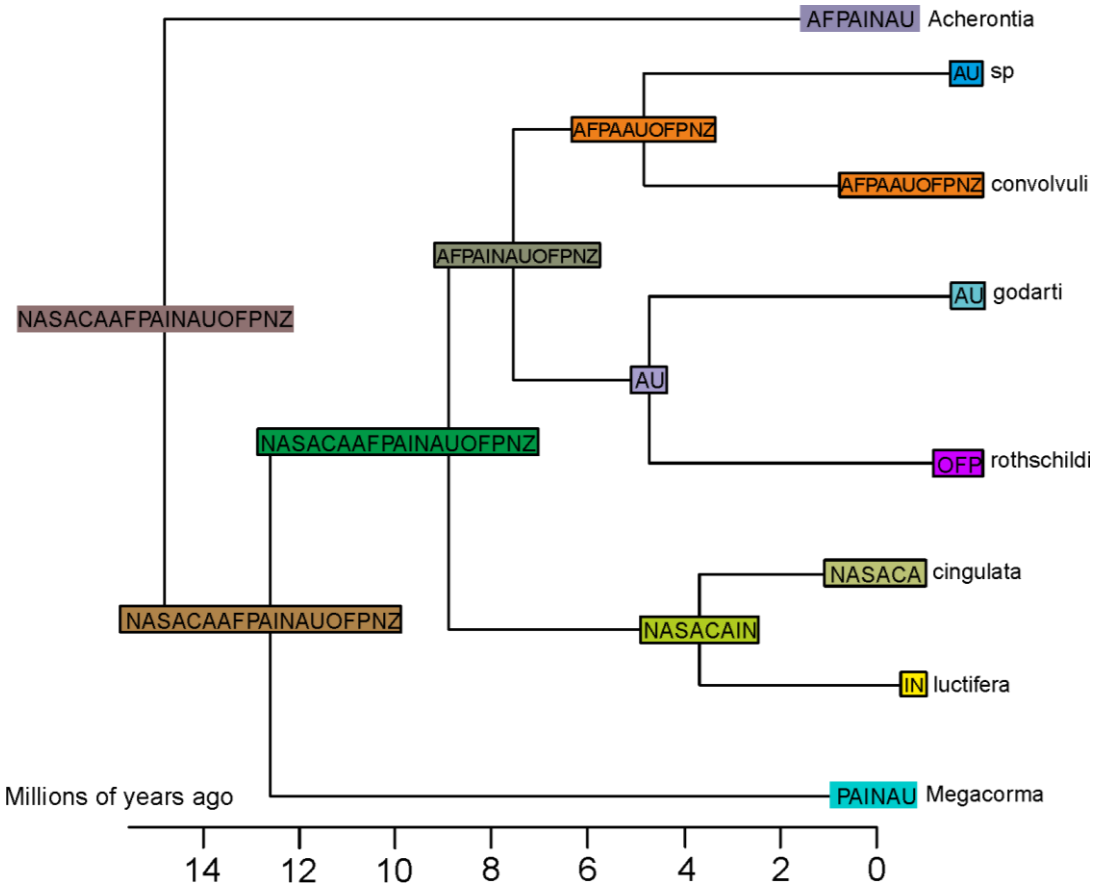
Obrázok 9: Distribučná mapa materiálu použitého fylogenézu lišajovitých rodu *Agrius* Hübner, 1819

4.2 Historická biogeografia rodu *Agrius*

Starý svet bol zrejme kolonizovaný cez Afriku, to a asi pred 5,7 miliónmi rokov. Z Austrálie, ktorá je v súčasnosti druhovo najbohatšia ďalej bola kolonizovaná aj Indonézia a cez ňu opakovane rekolonizovaná Oceánia (Obrázok 14). Austrália mohla byť kolonizovaná dvomi potenciálnymi cestami, cez Strednú Áziu, poprípade priamym preletom z Východnej Afriky pred asi 2,5 miliónmi rokov. Ázia bola zrejme kolonizovaná neskôr pred 2,3 miliónmi rokov, a to druhom *A. convolvuli*. Kolonizácia Európy sa javí ako následok recentných migrácií druhu *A. convolvuli* severným smerom. Kolonizácia Nového sveta podľa všetkého zo Strednej Ameriky odkiaľ boli neskôr kolonizované postupne Severná a Južná Amerika (Obrázok 13). Africkí jedinci *A. cingulata* sú príbuzní tým kostarickým. Rekonštrukcia biogeografie pomocou BioGeoBEARS (Obrázok 10) však neodhalila pôvod predka nakoľko areál *A. convolvuli* je príliš široký pre generovanie ancestrálnej distribúcie. Dôsledkom toho je výsledok, že predok lišajovitých rodu *Agrius* bol kozmopolitne rozšírený. Avšak výsledok analýzy tiež načrtáva to, že predok bol pravdepodobne zdatným letcom so schopnosťou diaľkových disperzií, a teda kolonizácie vzdialených kontinentov. Za zaujímavú môžeme považovať parafýliu jedincov z niektorých lokalít u *A. luctifera* (Obrázok 13) i u A. convolvuli (Obrázok 15). Spôsobená môže byť chybnou identifikáciou materiálu zberateľmi, poprípade kontamináciou v rámci procesu izolácie DNA.

4.3 Vnútrodruhová diverzita u lišaja pupencového *A. convolvuli*

Haplotypové siete ilustrujú fylogeografické vzťahy jednotlivých populácií lišajov druhu *A. convolvuli* (Obrázok 11, 12). Siete som rekonštruoval zvlášť pre mitochondriálnu a zvlášť pre nukleárnu DNA zo vzoriek uvedených v Prílohe 1. V prvom prípade sa jednalo o 242 sekvencií s úsekmi o dĺžke 688 bp a v prípade nukleárnej DNA sa bolo analyzovaných 54 sekvencií s úsekmi o dĺžke 400 bp. Celkovo bolo rozpoznaných 41 haplotypov, pričom dva boli vyhodnotené ako nevyhovujúce, zrejme kvôli horšej kvalite sekvencie a do TCS analýzy teda neboli nezahrnuté. Jednalo sa o vzorky pochádzajúce z databázy BOLD. Zvyšné haplotypy (vďaka pridruženým GPS koordinátam v súbore nexus) boli v rámci analýzy NClust + GeoTags ďalej rozdelené do desiatich farebne odlíšených clustrov na základe relatívnej frekvencie, s ktorou bol daný haplotyp nájdený v zadefinovaných geografických celkoch.



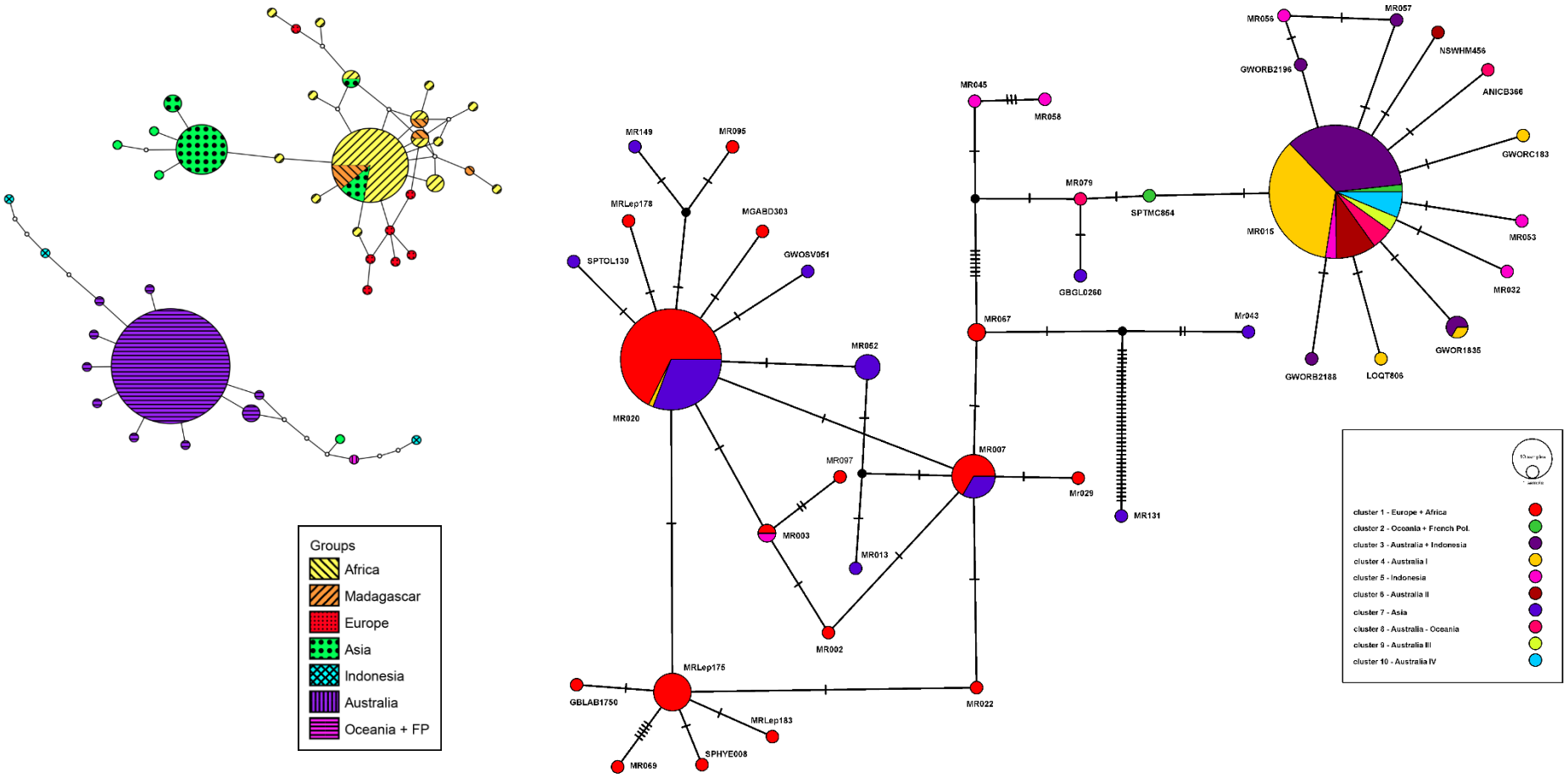
Obrázok 10: Kalibrovaná rekonštrukcia ancestrálnej distribúcie lišajovitých rodu *Agrius* Hübner, 1819 [global optim, 9 areas max. d=0; j=1.4183; LnL=-35.48]

Haplotypová sieť naznačuje že lišaj pupencový ma centrum vzniku východnej Afrike. V Afrike došlo k vytvoreniu niekoľkých niekoľkých haplotypov, pričom všetky s výnimkou haplotypu Hap_06 sú geograficky špecifické (Príloha 1). Haplotyp Hap_06 je rozšírený po celej Afrike, vrátane Madagaskaru a je to zároveň jediný africký haplotyp, ktorého jedinci pravidelné migrujú do Európy a spolu s haplotypom Hap_03 obsahujú aj jedince z Madagaskaru a Ázie, a teda sa možno domnievať, že práve tieto haplotypy sú zodpovedné za ich kolonizáciu. Vďaka výborným letovým schopnostiam lišaja pupencového nemožno určiť koľkými cestami bola Ázia kolonizovaná, avšak i tam sa vytvorila samostatná haplotypová skupina (Obrázok 11). Zjavná je aj komunikácia medzi pevninskou Afrikou a Madagaskarom, ktorá predstavuje kombináciu východoafrických haplotypov spolu s pôvodným madagaskarským haplotypom. Z haplotypových sietí tiež vyplýva, že austrálska

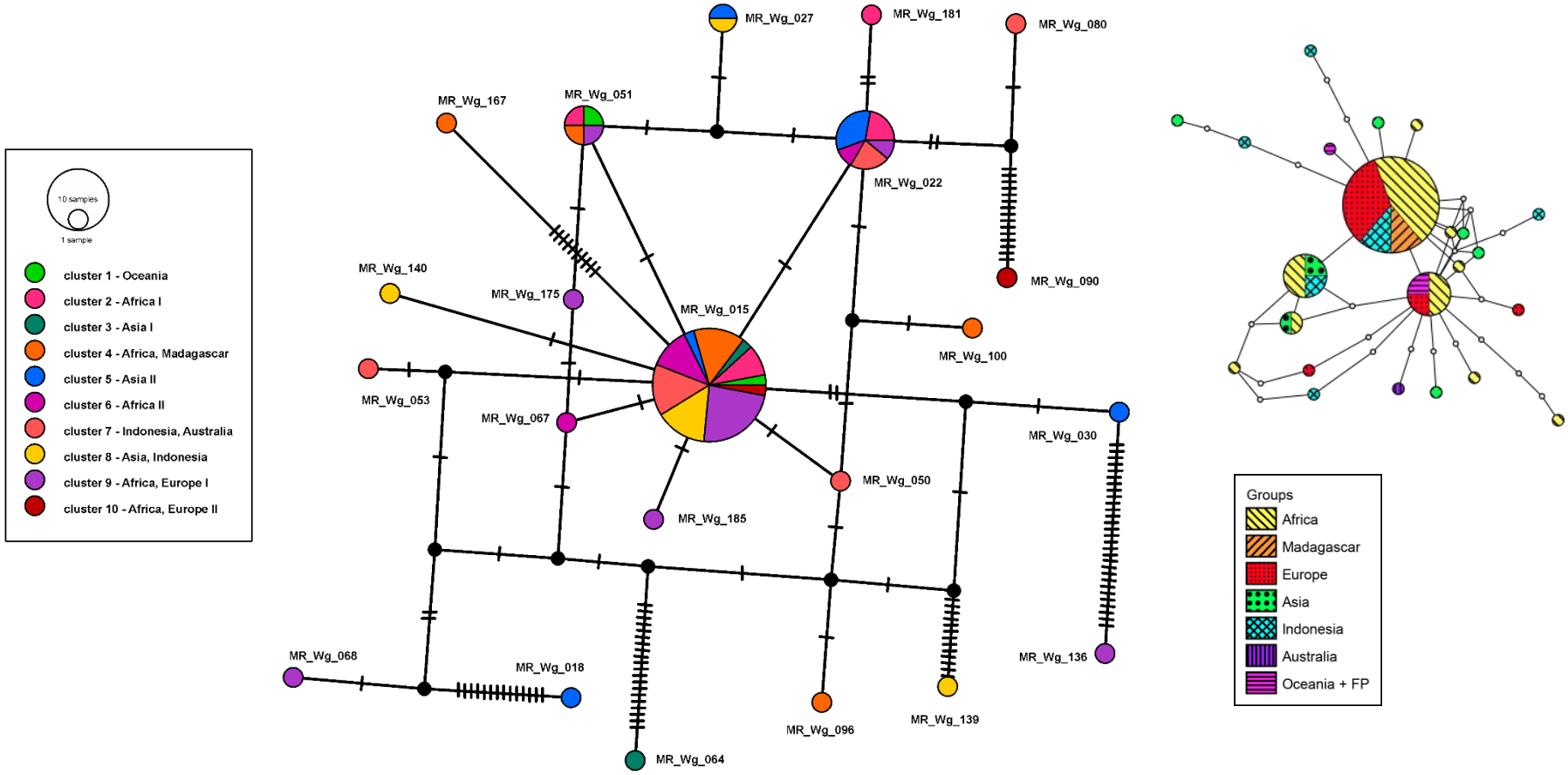
populácia vytvára samostatnú skupinu haplotypov, spolu s indonézskymi, papuánskymi, oceánskymi a polynézskymi lišajmi. Druhá fylogenetická sieť je tvorená sekvenciami nukleárneho génu *Wingless* (Obrázok 12), sa mi podarilo úspešne amplifikovať iba 54 sekvencií. Rozpoznaných bolo spolu 22 haplotypov, ktoré boli následne zatriedené geografických celkov a farebne odlíšené. Rovnako ako v prípade mt DNA, aj tu je centrálna haplotypová skupina obsahujúca jedince z Afriky, Madagaskaru, Európy, Ázie, Indonézie a dokonca aj z Oceánie. To by mohlo podporovať predošlé výsledky o malom počte ťažných haplotypov s veľkým areálom rozšírenia a dobrou schopnosťou disperzie. Oceánia, Austrália a Indonézia nie sú tentokrát výrazne oddelené a navyše Indonézia vykazuje až 6 haplotypov, z ktorých sú 4 špecifické pre jednotlivé ostrovy.

4.4 Populačno-genetické analýzy lišaja pupencového (*A. convolvuli*)

Do populačno-genetických analýz bolo zahrnutých celkovo 242 vzoriek, ktoré boli pre nesúrodosť materiálu ako populácie rozdelené do jednotlivých geografických celkov. Jednalo sa o tieto celky: Afrika, Madagaskar, Európa, Ázia, Indonézia, Austrália, Oceánia a Francúzska Polynézia. Ako prvé bol dataset otestovaný Tajima´s D testom, ktorý nevyšiel signifikantne (D= -1,44276; P= 0,936). Z toho môžeme usudzovať, že dataset nebol zaťažený selekciou, a preto s nim je možné počítať ďalšie populačné analýzy. Celkovo bolo prostredníctvom DnaSP rozlíšených 200 polymorfných miest (S), celková haplotypová diverzita (Hd) vyšla 0,712 a totálna nukleotidová diverzita (π) vyšla 0,2849. Konkrétne hodnoty pre jednotlivé porovnávané geografické celky sa nachádzajú v Prílohe 4. Vysoké hodnoty haplotypovej diverzity mali celky Madagaskar, Európa, Ázia, Indonézia, Oceánia a Francúzska Polynézia. U nukleotidovej diverzity boli zaznamenané vyššie hodnoty Ázie, Indonézie a Austrálie. Z výsledkov Fst indexu bola medzi geografickými celkami zistená istá genetická diferenciácia (Príloha 2). U 28,6% presahovala hodnota Fst hodnotu 0,8 a u 33,3 bola hodnota Fst indexu nižšia jako 0,3.

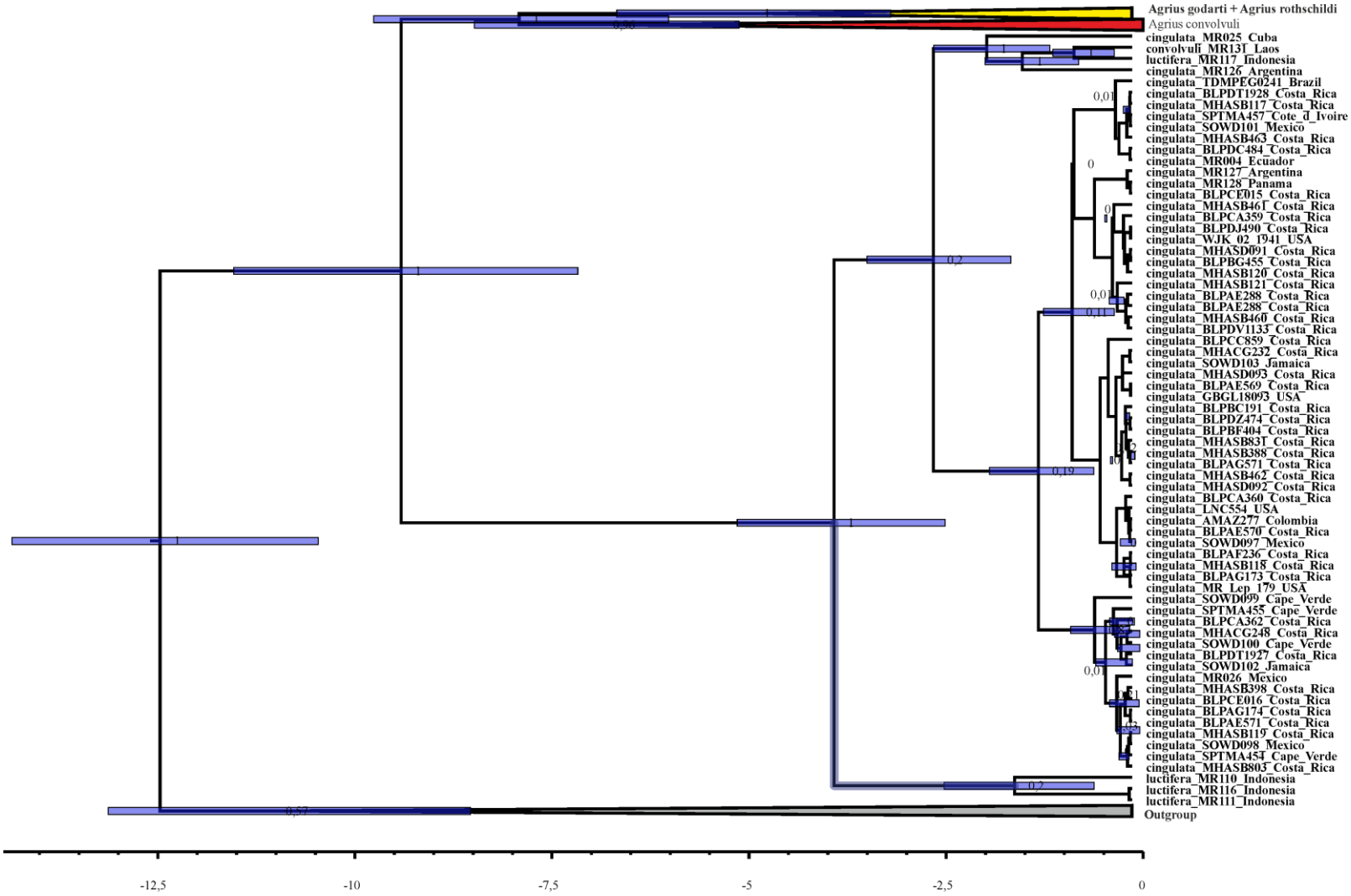


Obrázok 11: Haplotypová sieť predstavujúca fylogenetické vzťahy na základe mitochondrialného génu COI medzi jednotlivými populáciami *A. convolvuli* v Starom svete. (vľavo hore – jednoduchá TCS sieť, vpravo – klastrovaná TCS sieť označená vzorkami reprezentujúcimi daný haplotyp)



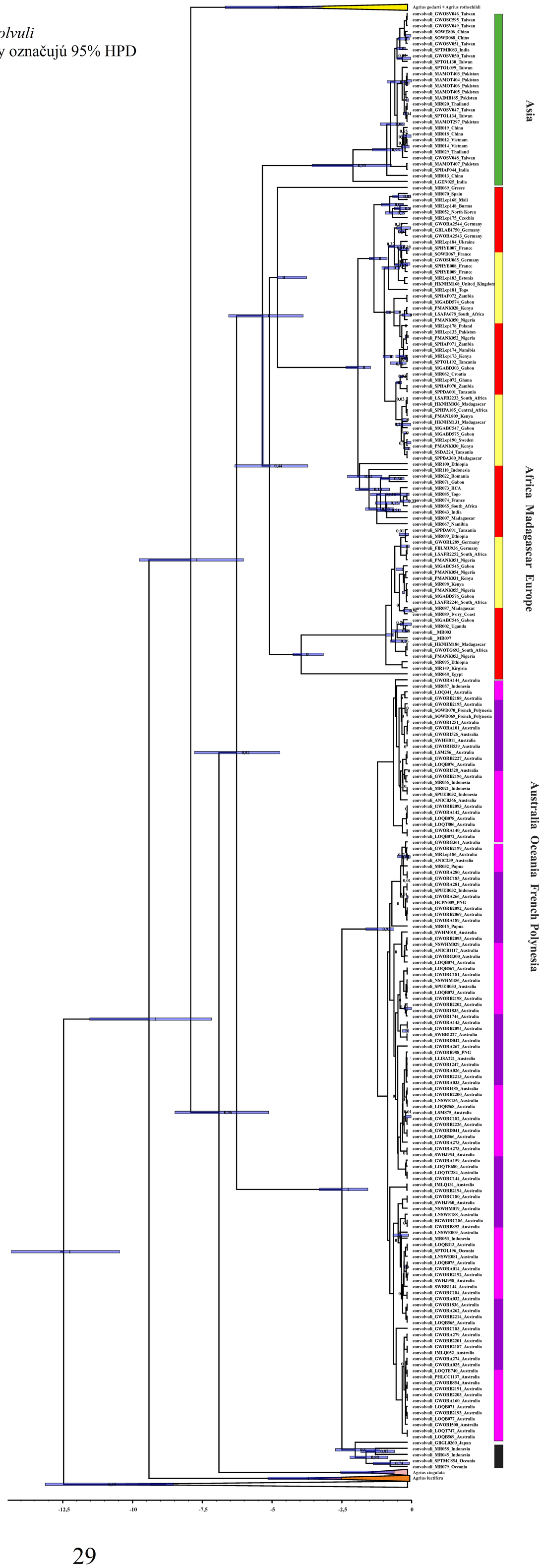
Obrázok 12: : Haplotypová sieť predstavujúca fylogenetické vzťahy na základe jadrového génu *Wingless* medzi jednotlivými populáciami *A. convolvuli* v Starom svete. (vľavo hore – klastrovaná TCS sieť označená vzorkami reprezentujúcimi daný haplotyp, vpravo – jednoduchá TCS sieť)

Počítaný bol aj priemerný počet nukleotidových rozdielov (k_P), počet polymorfných miest a nukleotidová diverzita medzi jednotlivými geografickými celkami (Príloha 3). Z výsledkov vyplýva, že populácie z Afriky, Madagaskaru a Ázie sú si blízke, a teda medzi nimi existovala komunikácia. Naproti tomu napríklad Indonézia je výrazne oddelená od Ázie. Naopak podľa počtu nukleotidových rozdielov sa javí ako blízka Austrálii, a dokonca ešte bližšia lišajom z Oceánie a Francúzskej Polynézie. To potvrdzuje výsledok fylogenetickej analýzy a haplotypových sietí o tom, že Indonézia bola pravdepodobne kolonizovaná postupne jedincami prevažne z Austrálie. Vzťah k Oceánii a Francúzskej Polynézii zasa možno vysvetliť dobrými disperznými schopnosťami lišajov, a teda prelety medzi ostrovmi zrejme existovali. Výpočet molekulárnej variácie (AMOVA) u lišajov pupencových ukázal až zanedbateľnú hodnotu u celkovej variácie, vzťahu medzi celkami a v rámci populácií. Signifikantne však vyšiel vzťah medzi populáciami vybraných geografických celkov, a to až 79,9% (Príloha 5).



Obrázok 13: Datovaný fylogenetický strom druhu *Agrius cingulata*
[os X udáva vek v miliónoch rokov, modré úsečky označujú 95% HPD interval, čísla nad vetvami označuj podporu]

Obrázok 24: Datovaný fylogenetický strom druhu *Agrius convolvuli*
[os X udáva vek v miliónoch rokov, modré úsečky označujú 95% HPD interval, čísla nad vetvami označuj podporu]



5 DISKUSIA

Hlavnými cieľmi práce bolo zostaviť fylogenézu a pokúsiť sa o rekonštrukciu ancestrálnej distribúcie lišajovitých rodu *Agrius*. Tieto výsledky potom porovnať s inými rodmi motýľov, ktoré v sebe obsahujú druhy so schopnosťou diaľkových migrácii. Cieľom práce bolo tiež pomocou fylogeografických a populačno-genetických prístupov odkryť vnútrodruhovú variabilitu u lišaja pupencového a porovnať ju s inými široko rozšírenými druhmi.

5.1 Molekulárna fylogenéza a historická biogeografia

Rod *Agrius*, podobne ako v predchádzajúcich štúdiách (Kitching 2002, 2003), je aj podľa našich výsledkov založených na mitochondriálnej a nukleárnej DNA monofyletický. Kitching (2003) uvádza ako bazálny druh rodu *A. godarti*, ktorý ale podľa mojich molekulárnych dát patrí spolu so sesterským druhom *A. rothschildi* k odvodenejším. V oboch týchto štúdiách (Kitching 2002, 2003) sa na kladograme (Obrázok 8) striedajú ostrovné endemity s druhmi s vysokou disperznou schopnosťou. To je však v rozpore s mojimi výsledkami, kde je skupina ostrovných endemitov jasne odlíšenou skupinou, rozdiel od babočiek rodu *Vanessa*, kde sa tento jav vyvinul niekoľkokrát nezávisle v rámci evolúcie (Wahlberg & Rubinoff 2011). Výnimkou je *A. luctifera*, ktorá na rozdiel od predchádzajúcich prác Kitchinga je u nás sesterským druhom k *A. cingulata*, ktorá kolonizovala zvyšok Nového sveta zo Strednej Ameriky. Je teda celkom možné, že *A. luctifera* podobným spôsobom kolonizovala oblasť Indonézie a Papui Novej Guinei. Čo by opäť bolo paralelou k výsledkom Wahlberg & Rubinoff 2011, kde u babočiek mala väčšina endemických druhov v minulosti vagilných predkov. Z prechádzajúcich prác (Tuttle 2007) vieme, že *A. cingulata* patrí medzi sezónnych migrantov, vyvstáva preto otázka, či existujú obdobné migrácie aj u lišaja smútočného, a teda či je to vlastnosť dedená po predkovi, alebo je tato vlastnosť špecifikom *A. cingulata*, ako napríklad babôčky rodu *Danaus* (Smith 2014). Z kladogramu tiež vyplýva, že obe línie (*convolvuli – godarti – rothschildi, luctifera – cingulata*) obsahujú jedného sezónneho migranta, migrujúceho podľa publikovaných dát prevažne severo-južným smerom (Chapman *et al.* 2010; Ballesteros-Mejia *et al.* 2011). Molekulárna analýza však tiež naznačuje, že migrujúce druhy sú evolučne staršie ako tie endemické. Z rekonštrukcie ancestrálnej distribúcie BioGeoBEARS plynie že predok mal veľký areál rozšírenia a zrejme dobrú

schopnosť diaľkových disperzií, podobne ako napr. babôčky z rodov *Vanessa* (Wahlberg & Rubinoff 2011), *Danaus* (Smith 2014) *Junonia* (Kodandaramaiah & Wahlberg 2007), či drozdy rodu *Turdus* (Voelker *et al*. 2007). Pôvod predka nám podobne ako u babočiek (Wahlberg & Rubinoff 2011) komplikujú druhy so širokým areálom rozšírenia. To je jedným z dôvodov, prečo tento rod nebol doposiaľ takto detailne študovaný, a prečo *A. convolvuli* bol z jedinej publikovanej biogeografie o wallaceánskych lišajoch vylúčený (Beck *et al*. 2006b). Kladogram postavený na mitochondriálných a nukleárnych dátach taktiež potvrdil existenciu druhého kryptického druhu v rámci parafyletického *A. convolvuli* (Obrázok 14). Jedná sa o doposiaľ morfologický neodlíšený druh, ktorý je ale podľa výsledných analýz rovnako starý ako ten prvý a k ich odštiepeniu došlo zhruba pred 1,7 miliónmi rokov.

5.2 Fylogeografická história lišaja pupencového (*A. convolvuli*)

Fylogeografická analýza odhalila rozpor s hypotézou, ktorá poukazuje na nízku genetickú variabilitu u široko rozšírených druhov (Lohman *et al*. 2008; Dor *et al*. 2010; Wahlberg & Rubinoff 2011). Lišaj pupencový vykazuje vysokú mieru genetickej štruktúrovanosti, čomu nasvedčuje aj vyšší počet haplotypov. Fylogenéza rozhalila vznik druhu pred približne 6,9 miliónmi rokov, pravdepodobne v Afrike a následné rozštiepenie na austrálsku a palearktický líniu. Dnes už poznáme niekoľko ďalších druhov ako modráčik *Lampides boeticus* (Lohman *et al*. 2008), babôčky rodu *Danaus* (Smith 2014), moru *Helicoverpa armigera* (Behere *et al*. 2007), či dokonca lastovičky z rodu *Hirundo* (Dor *et al*. 2010), ktoré majú africký pôvod a následne sa rýchlymi disperziami rozšírili cez celú Afriku do rôznych častí sveta, a dokonca v prípade *H. armigera* rovno až do Austrálie cez oceán. Podobný scenár kolonizácie Austrálie má zrejme aj lišaj pupencový, keď na rozdiel nej vytvára separovanú skupinu haplotypov, jednak z potomkov pôvodných expanzných línii a jednak novo vzniknuté haplotypy zrejme genetickým driftom. Podobne ako *Lampides*, či *Helicoverpa*, aj u *A. convolvuli* sa objavil v Afrike haplotyp, ktorý mal široký areál rozšírenia aj v rámci Afriky a kolonizoval postupne Európu, Áziu a samozrejme priľahlý Madagaskar. Práve jedince patriace do tohto haplotypu sezónne migrujú severne do Európy. Haplotypové siete a populačno-genetické analýzy tiež poukázali na blízky vzťah oceánskych a polynézskych jedincov k tým austrálskym, podobne ako u motýľov rodu *Delias* (Braby & Pierce 2007). U oboch destinácii zrejme existuje komunikácia prostredníctvom náhodných disperzií, a to ako z Austrálie, tak z Indonézie. Podobne, ako napríklad u babočiek rodu *Junonia* došlo v Ázii k diverzifikácii pôvodne

afrických migrantov a teraz tvoria dokonca samostatnú haplotypovú skupinu. Za zaujímavé možno považovať aj existenciu samostatných európskych haplotypov, čo potenciálne indukuje existenciu stálych populácii v oblasti Mediteránu.

6 Záver

Molekulárna fylogenéza a biogeografia prezentovaná v tejto práci ozrejmuje históriu lišajovitých rodu *Agrius,* fylogenetické vzťahy medzi druhmi a ich rýchlu expanziu naprieč Starým a Novým svetom, ich inconsistentnú speciáciu v rámci odlišných geografických celkov. Výsledky tiež ozrejmujú vek a izolovanosť ostrovných druhov, ktoré je možno v súčasnosti považovať na najzraniteľnejšie. Rekonštrukciou historickej biogeografie predkladaná práca osvetľuje disperzné schopnosti predka a poukazuje na fakt, že migrujúce druhy sú evolučne staršie, pričom ale sezónne migrácie sa v evolúcii rodu *Agrius* vyskytujú nezávisle. Populačno-genetická analýza druhu *A. convolvuli* odhalila genetickú štruktúrovanosť a variáciu na úrovni populácií vybraných geografických celkov. Výsledky tiež ukázali, že schopnosť diaľkových migrácii má len malé množstvo haplotypov, pričom ale sezónne migruje iba jeden hlavný, v Afrike široko rozšírený haplotyp. Fylogeografická analýza objasnila aj pôvod ázijských a austrálskych populácii, ktoré sú dnes už súčasťou samostatných haplotypových skupín. Osvetlená bola aj existencia komunikácie medzi ostrovnými a teda geograficky rôznorodými populáciami. Zaujímavý je aj výsledok v podobe existencie samostatných európskych haplotypov, čo by mohlo znamenať v oblasti Mediteránu by mala existovať životaschopná populácia. Týmto predpokladom, by však bolo ešte vhodné sa v budúcnosti bližšie zaoberať, a to na hlbšej populačnej úrovni.

7 LITERATÚRA

AWADALLAH K. T., TAWFIK M. F. S. & F. F. SHALABY (1976) Insect fauna of bind-weed, (Convolvulus arvensis) L., in Giza, Egypt. Bulletin of the Entomological Society of Egypt 60: 15-24

BALLESTEROS-MEJIA L., KITCHING I. J., BECK J. (2011) Projecting the potential invasion of the Pink Spotted Hawkmoth (Agrius cingulata) across Africa. International Journal of Pest Management 57: 153-159

BAUER E. & B. TRAUB (1980) Zur Macrolepidopterenfauna der Kapverdischen Inseln. Teil 1. Sphingidae und Arctiidae. Entomologische Zeitschrift, 90: 244-248

BECK J., KITCHING I. J. & LINSENMAIR K. E. (2006a) Measuring range sizes of South-East Asian hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae): effects of scale, resolution and phylogeny. Global Ecology and Biogeography 15: 339-348

BECK J., KITCHING I. J. & LINSENMAIR K. E. (2006b) Wallace's line revisited: has vicariance or dispersal shaped the distribution of Malesian hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae)? Biological Journal of the Linnean Society 89: 455-468

BECK J., KITCHING I. J. & LINSENMAIR K. E. (2006c) Diet breadth and host plant relationships of Southeast-Asian sphingid caterpillars. Ecotropica 12: 1-13

BEHERE G. T., TAY W. T., RUSSELL D. A., HECKEL D. G., APPLETON B. R. & K. R. KRANTHI (2007) Mitochondrial DNA analysis of field populations of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to H. zea. BMC Evolutionary Biology 7: e117

BRABY M. F. & N. E. PIERCE (2007) Systematics, biogeography and diversification of the Indo-Australian genus Delias Hübner (Lepidoptera: Pieridae): phylogenetic evidence supports an 'out-of-Australia' origin. Systematic Entomology 32: 2-25

CHAPMAN J. W., NESBIT R. L., BURGIN L. E., REYNOLDS D. R., SMITH A. D., MIDDLETON D. R., HILL J. K. (2010) Flight Orientation Behaviors Promote Optimal Migration Trajectories in High-Flying Insects. Science 327: 682-685

CLEMENT M., POSADA D. & K. CRANDALL (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9: 1657-1660

CRACRAFT J. (1974) Continental Drift and Vertebrate Distribution. Annual Review of Ecology and Systematics 5: 215-261

COMMON I. F. B. (1990) Moths of Australia. Melbourne University Publishing. 544 p.

DE FREINA J. J. & T. J. WITT (1987) Die Bombyces und Sphinges der Westpalaearktis. Band 1. Edition Wissenschaft & Forschung, München. 708 p.

DOR R., SAFRAN R. J., SHELDON F. H., WINKLER D. W., LOVETTE I. J. (2010) Phylogeny of the genus Hirundo and the Barn Swallow subspecies complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 56: 409-418

DRUMMOND A. J., SUCHARD M. A., XIE D. & A. RAMBAUT (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology And Evolution 29: 1969-1973

DUPONT F. & W. ROEPKE (1941) Heterocera Javanica, fam Sphingidae, hawk moths. Band 40. Vohandelingen des Hedelandsche Akademie van wetenschappen, afdeeling natuurkunde. 104 p.

EBERT G. (ed.) (1994) Die Schmetterlinge Baden-Württembergs. Band.4 - Nachtfalter II. Verlag Eugen Ulmer, Frankfurt. 535p.

EXCOFFIER L., SMOUSE P. & J. QUATTRO (1992) Analysis of molecular variance inferredfrom metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491

FOX K., ANDERSON K. M., ANDRES R., FOSTER M. C., FOSTER C. E., VIK D., VITT P., HARRIS M. O. (2015) Nectar Robbery and Thievery in the Hawk Moth (Lepidoptera: Sphingidae)-Pollinated Western Prairie Fringed Orchid Platanthera praeclara. Annals of the Entomological Society of America 108: 1000-1013

HARBICH H. (1975) Zur Biologie von Herse convolvuli. Atalanta 6: 200-203

HARBICH H. (1980) Weiteres zur Biologie von Agrius convolvuli (Linne, 1758). Atalanta 11: 197-200

HOLLOWAY J. D. (1983) The Biogeography of the Macrolepidoptera of South-Eastern Polynesia. GeoJournal 7: 517-525

HOLLOWAY J. D. (1987) The Moths of Borneo, Part 3: Bombycoidea: Lasiocampidae, Eupterotidae, Bombycidae, Brahmaeidae, Saturniidae, Sphingidae. Malaysian Nature Society, Kuala Lumpur. 199 p.

HÜBNER J. (1819) Verzeichniss bekannter Schmettlinge, Volume 9. Jacob Hübner pub., Augsburg. 431 p.

JOHNSON S. D. & R. A. RAGUSO (2016) The long-tongued hawkmoth pollinator niche for native and invasive plants in Africa. Annals of Botany 117: 25-36

JORDANO P. (2016) Natural history matters: how biological constraints shape diversified interactions in pollination networks. Journal of Animal Ecology 85: 1423-1426

KAWAHARA A. Y., MIGNAULT A. A., REGIER J. C., KITCHING I. J., MITTER C. (2009) Phylogeny and Biogeography of Hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae): Evidence from Five Nuclear Genes. PLOS ONE 4 (5): e5719

KAWAHARA A. Y., BREINHOLT J. W., PONCE F. V., HAXAIRE J., XIAO L., LAMARRE G. P. A., RUBINOFF D., KITCHING I. J. (2013) Evolution of Manduca sexta hornworms and relatives: Biogeographical analysis reveals an ancestral diversification in Central America. Molecular Phylogenetics and Evolution 68: 381-386

KAWAHARA A. Y. & J. R. BARBER (2015) Tempo and mode of antibat ultrasound production and sonar jamming in the diverse hawkmoth radiation. PNAS 112: 6407-6412

KINGMAN J. F. C. (1982) The coalescent. Stochastic Processes and Their Applications 13: 235-248

KITCHING I. J. & J. M. CADIOU (2000) Hawkmoths of the World: An Annotated and Illustrated Revisionary Checklist. Cornell University Press, London. 226 p.

KITCHING I. J. (2002) The phylogenetic relationships of Morgan's Sphinx, Xanthopan morganii (Walker), the tribe Acherontiini, and allied long-tongued hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae, Sphinginae). Zoological Journal of the Linnean Society 135: 471-527

KITCHING I. J. (2003), Phylogeny of the death's head hawkmoths, Acherontia [Laspeyres], and related genera (Lepidoptera: Sphingidae: Sphinginae: Acherontiini). Systematic Entomology 28: 71-88

KODANDARAMAIAH U. & N. WAHLBERG (2007) Out-of-Africa origin and dispersal-mediated diversification of the butterfly genus Junonia (Nymphalidae: Nymphalinae). Journal of Evolutionary Biology 20: 2181-2191

LEIGH J. W., BRYANT D. (2015) popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution 6: 1110-1116

LEPIDOPTEROLOGEN-ARBEITSGRUPPE (1997) Schmetterlinge und ihre Lebensräume. Band 2. Arten, Gefährdung, Schutz. Fotorotar, Egg. 680 p.

LIBRADO P. & J. ROZAS (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452

LINNAEUS C. (1758) Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differintiis, Synonymis, Locis, Tom I. 10th Edition. Laurentii Salvii. Holmiae. 864 p.

LOHMAN D. J., PEGGIE D., PIERCE N. E., MEIER R. (2008) Phylogeography and genetic diversity of a widespread Old World butterfly, Lampides boeticus (Lepidoptera: Lycaenidae). BMC Evolutionary Biology 8: e301

LOHMAN D. J., BRUYN DE M., PAGE T., VON RINTELEN K., HALL R., NG P. K. L., SHIH H.-T., CARVALHO G. R., VON RINTELEN T. (2011) Biogeography of the Indo-Australian Archipelago. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 42: 205-226

MACEK J., DVOŘÁK J., TRAXLER L. & V. ČERVENKA (2007) Motýli a housenky střední Evropy. I. Academia, Praha. 376 p.

MACKEY A. P. (1978) The biogeographic relationships of the New Guinea Sphingidae (Lepidoptera). Journal of the Australian Entomological Society 16: 361-365

MARABUTO E. (2006) The occurrence of a neotropical hawkmoth in southern Portugal: Agrius cingulatus (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Sphingidae). Boletin de la Sociedad Entomologica Aragonesa 38: 163-166

MATZKE N. J. (2012) Founder-event speciation in BioGeoBEARS package dramatically improves likelihoods and alters parameter inference in dispersal-extinction-cladogenesis DEC analyses. Frontiers of Biogeography 4: 210

MATZKE N. J. (2014) Model selection in historical biogeography reveals that founder-event speciation is a crucial process in island clades. Systematic Biology 63: 951-970

METCALFE I. (2001) Palaeozoic and Mesozoic tectonic evolution and biogeography of SE Asia-Australasia. 15-34. In: Metcalfe I., Smith J. M. B., Morwood M., Davidson I. (eds.) Faunal and Floral Migration and Evolution in SE Asia-Australasia. Balkema/CRC Press, Lisse. 482 p.

MINET J. (1994) The Bombycoidea: phylogeny and higher classification (Lepidoptera, Glossata). Entomologica Scandinavica 25: 63-88

NAKAMURA M. (1976) An inference on the phylogeny of Sphingidae in relation to habits and the structures of their immature stages. Yugatô 63: 19-28

NUIN P. (2005) MrMTgui 1.0 (version 1.6). Program distributed by the author at http://www.genedrift.org/mtgui.php.

NYLANDER J. A. A. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

OKEN L. L. (1815) Lehrbuch der Naturgeschichte. Teil 3. – Zoologie. August Schmid & Co., Jena. 842 p.

PARMESAN C., RYRHOLM N., STEFANESCU C., HILL J. K., THOMAS C. D., DESCIMON H., HUNTLEY B., KAILA L., KULLBERG J., TAMMARU T., TENNENT W. J., THOMAS J. A. & M. WARREN (1999) Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. Nature 399: 579-583

PITTAWAY A. R. (1993) Hawkmoths of the Western Palaearctic. Harley Books, Colchester, United Kingdom. 240 p.

REGIER J. C., MITTER C., FRIEDLANDER T. P., PEIGLER R. S. (2001) Phylogenetic relationships and evolution of hostplant use in Sphingidae (Lepidoptera): initial evidence from two nuclear genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 20: 311-316

RIOTTE J. C. E. (1984) The genus Agrius in the Pacific region with description of a new species (Lepidoptera: Sphingidae). International Journal of Entomology 26: 339-350

RONQUIST F. & J. P. HUELSENBECK (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574

ROUGERIE R., KITCHING I. J., HAXAIRE J., MILLER S. E., HAUSMANN A., HEBERT P. D. N. (2014) Australian Sphingidae – DNA Barcodes Challenge Current Species Boundaries and Distributions. PLOS ONE 9 (7): e101108

ROTHSCHILD W. & K. JORDAN (1903) A revision of the lepidopterous family Sphingidae. Novitates Zoologicae 9: 1-972

SAX D. F. & S. D. GAINES (2008) Species invasions and extinction: The future of native biodiversity on islands. Proceedings of the National Academy of Sciences 105 (Supplement 1): 11490-11497

SCHOTMAN C. Y. L. (1989) Plant pests of quarantine importance to the Caribbean. RLAC-PROVEG No. 21. 80 p.

SCHREIBER H. (1978) Dispersal Centres of Sphingidae (Lepidoptera) in the Neotropical Region. Biogeographica 10: 17-34

SETOKUCHI O., NAKAGAWA K. & M. KOBAYASHI (1986) Food consumption of three major sweet potato defoliators, Aedia leucomelas Linnaeus, Agrius convolvuli (Linnaeus) and Brachmia triannulella (Herrich-Schaffer). Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology 30: 93-98

SMITH D. A. S. (2014) African Queens and Their Kin: A Darwinian Odyssey. Brambleby Books, Taunton. 848 p.

STAMATAKIS A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30: 1312-1313

THOMAS C. D., CAMERON A., GREEN R. E., BAKKENES M., BEAUMONT L. J., COLLINGHAM Y. C., ERASMUS B. F. N., FERRELRA DE SLQEULRA M., GRALNGER A., HANNA L., HUGHES L., HUNTLEY B., JAARSVELD VAN A. S., MIDGLEY G. F., MILES L., ORTEGA- HUERTA M. A., PETERSOND A. T., PHILIPLIPS O. L. & S. E. WILLIAMS (2004) Extinction risk from climate change. Nature 427: 145-148

TUTTLE J. P. (2007) The Hawk Moths of North America - A Natural History Study of the Sphingidae of the United States and Canada. The Wedge Entomological Research Foundation. 273 p.

UDVARDY M. D. F. (1969) Dynamic Zoogeography: With Special Reference to Land Animals. Van Nostrand Reinhold, New York. 445p

VAN DER PUTTEN W. H., MACEL M., VISSER M. E. (2010) Predicting species distribution and abundance responses to climate change: why it is essential to include biotic interactions across trophic levels. Philosophical Transactions of the Royal Society B (Biological Sciences) 365: 2025-2034

VOELKER G., ROHWER S., BOWIE R. C. K., OUTLAW D. C. (2007) Molecular systematics of a speciose, cosmopolitan songbird genus: Defining the limits of, and relationships among, the Turdus thrushes. Molecular Phylogenetics and Evolution 42: 422-434

WAHLBERG N. & C. W. WHEAT (2008) Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers: designing novel nuclear markers for genomic DNA extractions of Lepidoptera. Systematic Biology 57: 231-242

WAHLBERG N. & D. RUBINOFF (2011) Vagility across Vanessa (Lepidoptera: Nymphalidae): mobility in butterfly species does not inhibit the formation and persistence of isolated sister taxa. Systematic Entomology 36: 362-370

WAKELEY J. (1996) The Variance of Pairwise Nucleotide Differences in Two Populations with Migration. Theoretical Population Biology 49: 39-57

WATERHOUSE D. F. (1998) Biological Control of Insect Pests: Southeast Asian Prospects. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 547 p.

WELTON L. J., WOOD P. L. JR., OAKS J. R., SILER C. D., BROWN R. F. (2014) Fossil-calibrated phylogeny and historical biogeography of Southeast Asian water monitors (Varanus salvator Complex). Molecular Phylogenetics and Evolution 74: 29-37

WILEY E. O. (1988) Parsimony analysis and vicariance biogeography. Systematic Zoology 37: 271-290

YAGO M., HIRAI N., KONDO M., TANIKAWA T., ISHII M., WANG M., WILLIAMS M., UESHIMA R. (2008) Molecular systematics and biogeography of the genus Zizina (Lepidoptera : Lycaenidae). Zootaxa 1746: 15-38

ZINK R. M., BLACKWELL-RAGO R. C. & F. RONQUIST (2000) The shifting roles of dispersal and vicariance in biogeography. Proceedings of the Royal Society of London B (Biological Sciences) 267: 497-503

8 PRÍLOHY

Druh	*Kód*	*Krajina*	*Lokalita*	*Longitude*	*Latitude*	*Geograf. sk.*	*Haplot.*	*Clust. COI*	*COI*	*Clust. Wg*	*Wg*
convolvuli	MR002	Uganda	Kibale Forest, Kanyawara	0.561	30.357	Africa	Hap_01	C1	x	-	-
convolvuli	MR003	Borneo	Papar, Keningau, Sabah	5.750	115.928	Indonesia	Hap_02	C5	x	-	-
convolvuli	MR007	Madagascar	Mafahaly, Saritsipy	-23.867	43.965	Madagascar	Hap_03	C1	x	-	-
convolvuli	MR012	Vietnam	Tam Dao, National Park	21.484	105.611	Asia	Hap_03	C7	x	-	-
convolvuli	MR013	China	Luzhou, Sichuan	28.880	105.393	Asia	Hap_04	C7	x	-	-
convolvuli	MR014	Vietnam	Tam Dao, National Park	21.484	105.611	Asia	Hap_03	C7	x	-	-
convolvuli	MR015	Papua	Arfak Mountains	-0.892	133.918	Australia	Hap_05	C5	x	C7	x
convolvuli	MR018	China	Luzhou, Sichuan	28.887	105.440	Asia	Hap_03	C7	x	C5	x
convolvuli	MR019	China	Luzhou, Sichuan	28.875	105.399	Asia	Hap_03	C7	x	-	-
convolvuli	MR020	Thailand	Chiang Mai, Fang	18.708	98.981	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	MR021	Sulawesi	Palopo, Selatan	-2.962	120.146	Indonesia	Hap_05	C5	x	-	-
convolvuli	MR022	Romania	Comanesti, Bacau	46.432	26.473	Europe	Hap_07	C1	x	C9	x
convolvuli	MR029	Thailand	Chiang Mai, Fang	19.958	19.958	Asia	Hap_08	C1	x	-	-
convolvuli	MR032	Papua	Arfak Mountains	-0.892	133.918	Australia	Hap_09	C5	x	C7	x
convolvuli	MR043	India	Gangtok, Sikkim	27.339	88.604	Asia	Hap_10	C7	x	C5	x
convolvuli	MR045	Indonesia	Kalabahi, Alor Island	-8.214	124.509	Indonesia	Hap_11	C5	x	C7	x
convolvuli	MR052	North Korea	Mt. Nangnimsan, Chagang Prov.	40.492	126.032	Asia	Hap_12	C7	x	C8	x
convolvuli	MR053	Indonesia	Ruteng, Flores Isl.	-8.616	120.470	Indonesia	Hap_13	C5	x	C7	x

convolvuli	MR056	Indonesia	Tapaya vill., Obi Island	-1.560	127.672	Indonesia	Hap_14	C5	x	C7	x
convolvuli	MR057	Indonesia	Lorulun, Jamdena Isl.	-7.835	131.408	Indonesia	Hap_15	C3	x	C7	x
convolvuli	MR058	Indonesia	Lamalera, Lembata Isl.	-8.575	123.424	Indonesia	Hap_16	C5	x	C7	x
convolvuli	MR062	Croatia	Baska, Krk Isl.	44.970	14.752	Europe	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	MR065	South Africa	Dundee	-28.160	30.231	Africa	Hap_03	C1	x	C6	x
convolvuli	MR067	Namibia	Usacos	-22.006	15.584	Africa	Hap_17	C1	x	C6	x
convolvuli	MR068	Egypt	Hers	30.112	31.345	Africa	Hap_17	C1	x	C9	x
convolvuli	MR069	Greece	Patra	38.258	21.749	Europe	Hap_18	C1	x	C9	x
convolvuli	MR070	Spain	Seville	37.389	-5.987	Europe	Hap_06	C1	x	C10	x
convolvuli	MR071	Gabon	Lambarene	-0.700	10.240	Africa	Hap_03	C1	x	C2	x
convolvuli	MRLep072	Ghana	Obuasi, Ashanti	6.204	-1.692	Africa	Hap_06	C1	x	C2	x
convolvuli	MR073	RCA	Bomani	4.817	15.983	Africa	Hap_03	C1	x	C2	x
convolvuli	MR074	France	Lorgues	43.493	6.361	Europe	Hap_03	C1	x	C2	x
convolvuli	MR079	New Caledonia	Baraoua	-21.467	165.383	Ocean. + F. pol.	Hap_26	C8	x	C1	x
convolvuli	MR085	Togo	Mt. Kloto, near Kpalime	6.867	0.764	Africa	Hap_03	C1	x	-	-
convolvuli	MR087	Madagascar	Tamatave, Toamasina	-18.154	49.416	Madagascar	Hap_03	C1	x	C7	x
convolvuli	MR089	Ivory Coast	Issia, Haut-Sassandra	6.490	-6.586	Africa	Hap_03	C1	x	C2	x
convolvuli	MR095	Ethiopia	Gogo	6.355	37.505	Africa	Hap_19	C1	x	C4	x
convolvuli	MR097	Kenya	Bungule, Taita	-3.852	38.654	Africa	Hap_20	C1	x	C4	x
convolvuli	MR098	Kenya	Mwingi	-0.916	38.062	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	MR099	Ethiopia	Leku, Shello Abore	6.949	38.222	Africa	Hap_06	C1	x	C4	x
convolvuli	MR100	Ethiopia	Rift Valley, Sidamo	7.852	36.086	Africa	Hap_06	C1	x	C4	x

convolvuli	MR131	Laos	Mt. Phu Pane	17.601	101.601	Asia	Hap_21	C7	x	C5	x
convolvuli	MRLep133	Pakistan	Karakorum Mts.	35.701	73.301	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	MRLep148	Burma	Khai Sai, Tenasserim island	13.350	98.830	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	MR149	Kirgisia	Kirgiz Mts., Issyk River	43.250	77.480	Asia	Hap_22	C7	x	-	-
convolvuli	MRLep168	Mali	Kayes	14.410	-11.440	Africa	Hap_06	C1	x	C2	x
convolvuli	MRLep173	Kenya	Ewaso River, Rift Valley	0.580	37.490	Africa	Hap_06	C1	x	C4	x
convolvuli	MRLep174	Namibia	Van Zyls Pass	-17.380	12.570	Africa	Hap_06	C1	x	C6	x
convolvuli	MRLep175	Czechia	Troubsko u Brna	49.160	16.500	Europe	Hap_23	C1	x	C9	x
convolvuli	MRLep178	Poland	Zbaszynek, Lubuskie	52.242	15.925	Europe	Hap_24	C1	x	C9	x
convolvuli	MRLep181	Togo	Lome	6.201	1.210	Africa	Hap_06	C1	x	C2	x
convolvuli	MRLep183	Estonia	Kabli	59.427	24.614	Europe	Hap_25	C1	x	C9	x
convolvuli	MRLep184	Ukraine	Crimea	45.301	34.340	Europe	Hap_23	C1	x	C9	x
convolvuli	MRLep186	Australia	Brisbane	-27.460	153.010	Australia	Hap_05	C8	x	-	-
convolvuli	MRLep190	Sweden	Oland	56.620	16.610	Europe	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	ANIC239	Australia	Kuranda, Queensland	-16.480	145.380	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	ANICB1117	Australia	Port Augusta, SA	-32.491	137.762	Australia	Hap_05	C9	x	-	-
convolvuli	ANICB366	Australia	Tregole, Queensland	-26.300	147.080	Australia	Hap_28	C8	x	-	-
convolvuli	FBLMU936	Germany	Regensburg	49.031	12.156	Europe	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	GBGL0260	Japan	Narahara	36.101	138.701	Asia	Hap_41	C7	x	-	-
convolvuli	GBLAB1750	Germany	Saarhölzbach	49.524	6.614	Europe	Hap_38	C1	x	-	-
convolvuli	GWOR1247	Australia	Forty Miles Scrub, Queensland	-18.128	144.815	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWOR1251	Australia	Innot Hot Spring, Queensland	-17.668	145.242	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWOR1744	Australia	Mt. Lewis, Queensland	-16.595	145.279	Australia	Hap_05	C4	x	-	-

convolvuli	GWOR1835	Australia	Daintree, Queensland	-16.081	145.461	Australia	Hap_29	C4	x	-	-
convolvuli	GWOR1836	Australia	Daintree, Queensland	-16.081	145.461	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORA014	Australia	Berrangi Bridge	-18.733	126.875	Australia	Hap_05	C10	x	-	-
convolvuli	GWORA025	Australia	Halls Creek, WA	-17.881	127.842	Australia	Hap_05	C10	x	-	-
convolvuli	GWORA026	Australia	Halls Creek, WA	-17.487	127.953	Australia	Hap_05	C10	x	-	-
convolvuli	GWORA032	Australia	Halls Creek	-17.487	127.953	Australia	Hap_05	C10	x	-	-
convolvuli	GWORA033	Australia	Halls Creek, WA	-17.487	127.953	Australia	Hap_05	C10	x	-	-
convolvuli	GWORA101	Australia	Gregory National Park, NT	-16.109	130.425	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA140	Australia	Kununurra, WA	-15.694	128.692	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA142	Australia	Cockatoo Lagoon, NT	-15.972	129.044	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA143	Australia	Cockatoo Lagoon, NT	-15.972	129.040	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA144	Australia	Cockatoo Lagoon, NT	-15.972	129.044	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA159	Australia	Parrys Lagoon	-15.561	128.266	Australia	Hap_05	C10	x	-	-
convolvuli	GWORA189	Australia	Sullivan Creek, NT	-15.589	131.282	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA2543	Germany	Bayern	48.889	12.787	Europe	Hap_23	C1	x	-	-
convolvuli	GWORA2544	Germany	Bayern	49.195	12.163	Europe	Hap_23	C1	x	-	-
convolvuli	GWORA262	Australia	Tabletop Swamp, NT	-13.185	130.756	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA266	Australia	Fogg Dam, Humpty Doo, NT	-12.562	131.307	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA267	Australia	Fogg Dam, Humpty Doo, NT	-12.562	131.307	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA273	Australia	Fogg Dam, Humpty Doo, NT	-12.562	131.307	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA274	Australia	Fogg Dam, Humpty Doo, NT	-12.562	131.307	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA279	Australia	Fogg Dam, Humpty Doo, NT	-12.562	131.307	Australia	Hap_29	C3	x	-	-
convolvuli	GWORA280	Australia	Fogg Dam, Humpty Doo, NT	-12.562	131.307	Australia	Hap_05	C3	x	-	-

convolvuli	GWORA281	Australia	Humpty Doo, NT	-12.562	131.307	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2069	Australia	Fogg Dam, Humpty Doo, NT	-12.562	131.307	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2092	Australia	Mary River Billabong, NT	-12.897	131.643	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2093	Australia	Elsey Creek, NT	-15.006	133.287	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2094	Australia	Elsey Creek, NT	-15.006	133.287	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2095	Australia	Elsey Creek, NT	-15.006	133.287	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2187	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2188	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_35	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2191	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2192	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2193	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2194	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2195	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2196	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_37	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2198	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2199	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2200	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2201	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_29	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2202	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2203	Australia	Larrimah, NT	-15.535	133.406	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2213	Australia	Newcastle Waters, NT	-17.381	133.444	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2214	Australia	Newcastle Waters, NT	-17.381	133.444	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB2226	Australia	Top Springs, Buchanan	-16.026	131.943	Australia	Hap_05	C3	x	-	-

convolvuli	GWORB2227	Australia	Top Springs, NT	-16.026	131.943	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORB854	Australia	Fishery Falls, Queensland	-17.186	145.889	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORB892	Australia	Wooroonooran, NT	-17.440	145.863	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORB988	Papua New Guinea	Port Moresby	-9.482	147.185	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORC144	Australia	Almaden, Queensland	-17.344	144.683	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORC180	Australia	Almaden, Queensland	-17.344	144.683	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORC181	Australia	Almaden, Queensland	-17.344	144.683	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORC182	Australia	Almaden, Queensland	-17.344	144.683	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORC183	Australia	Daintree, Queensland	-17.344	144.683	Australia	Hap_30	C4	x	-	-
convolvuli	GWORC184	Australia	Almaden, Queensland	-17.344	144.683	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORC185	Australia	Almaden, Queensland	-17.344	144.683	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORC186	Australia	Almaden, Queensland	-17.344	144.683	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORD041	Australia	Mareeba, Queensland	-16.949	145.434	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORD042	Australia	Barron River, Queensland	-16.949	145.434	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORG300	Australia	Daintree, Queensland	-16.194	145.419	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORG361	Australia	Daintree, Queensland	-16.089	145.464	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORH539	Australia	Almaden, Queensland	-17.344	144.683	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	GWORI485	Australia	Gregory NP, NT	-15.591	131.107	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORI500	Australia	Mary River Billabong, NT	-12.897	131.643	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORI526	Australia	Jim Jim Billabong, NT	-12.941	132.553	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORI527	Australia	Jim Jim Billabong, NT	-12.941	132.553	Australia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	GWORI528	Australia	Jim Jim Billabong, NT	-12.941	132.553	Australia	Hap_05	C3	x	-	-

convolvuli	GWORL289	Germany	Kreuzeck	47.450	11.067	Europe	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	GWOSC595	Taiwan	Ren’ai, Nantou	24.133	121.167	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	GWOSU065	Germany	Wörth an der Donau	49.001	12.412	Europe	Hap_23	C7	x	-	-
convolvuli	GWOSV046	Taiwan	Hualien City	24.175	121.502	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	GWOSV047	Taiwan	Mei Feng, Nantou	24.090	121.173	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	GWOSV048	Taiwan	Mei Feng, Nantou	24.090	121.173	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	GWOSV049	Taiwan	Mei Feng, Nantou	24.090	121.173	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	GWOSV050	Taiwan	Mei Feng, Nantou	24.090	121.173	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	GWOSV051	Taiwan	Hualien	24.175	121.502	Asia	Hap_36	C7	x	-	-
convolvuli	GWOTG693	South Africa	Mogales Gate Biodiversity Centre	-25.948	27.623	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	HCPN009	Papua New Guinea	Baitabag village, Madang	-5.133	145.783	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	HKNHM036	Madagascar	Ibity, Amoron'i Mania	-20.117	47.017	Madagascar	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	HKNHM131	Madagascar	Ranomafana NP	-21.254	47.422	Madagascar	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	HKNHM168	United Kingdom	Kent	51.214	0.242	Europe	Hap_23	C1	x	-	-
convolvuli	HKNHM186	Madagascar	Kalambatritra	-17.344	144.683	Madagascar	Hap_06	C4	x	-	-
convolvuli	IMLQ052	Australia	Imbil, Queensland	-26.444	152.668	Australia	Hap_05	C8	x	-	-
convolvuli	IMLQ131	Australia	Imbil, Queensland	-26.444	152.668	Australia	Hap_05	C8	x	-	-
convolvuli	LGEN025	India	Gandhinagar	23.476	72.638	Asia	Hap_12	C7	x	-	-
convolvuli	LLISA221	Australia	Corndale, NSW	-28.412	153.214	Australia	Hap_05	C8	x	-	-
convolvuli	LNSWE009	Australia	Tom's Creek, NSW	-31.459	152.476	Australia	Hap_05	C6	x	-	-
convolvuli	LNSWE081	Australia	Tom's Creek Retreat, NSW	-31.459	152.476	Australia	Hap_05	C6	x	-	-
convolvuli	LNSWE136	Australia	Tom's Creek, NSW	-31.459	152.476	Australia	Hap_05	C6	x	-	-

convolvuli	LNSWE188	Australia	Tom's Creek , NSW	-31.459	152.476	Australia	Hap_05	C6	x	-	-
convolvuli	LOQ341	Australia	Chillagoe, Queensland	-14.667	145.467	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB071	Australia	Lizard Island	-14.667	145.467	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB072	Australia	Lizard Island	-14.667	145.467	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB073	Australia	Lizard Island	-14.667	145.467	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB074	Australia	Chillagoe, Queensland	-14.667	145.467	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB075	Australia	Lizard Island	-14.667	145.467	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB076	Australia	Chillagoe, Queensland	-14.667	145.467	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB077	Australia	Lizard Island	-14.667	145.467	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB078	Australia	Lizard Island	-14.667	145.467	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB313	Australia	Chillagoe, Queensland	-14.667	145.467	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB565	Australia	Chillagoe, Queensland	-17.117	144.533	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB566	Australia	Chillagoe, Queensland	-17.117	144.533	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB567	Australia	Chillagoe, Queensland	-17.117	144.533	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB568	Australia	Chillagoe, Queensland	-17.117	144.533	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQB569	Australia	Chillagoe, Queensland	-17.117	144.533	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQT747	Australia	Townsville, Queensland	-19.381	146.449	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQT806	Australia	Townsville, Queensland	-19.381	146.449	Australia	Hap_31	C4	x	-	-
convolvuli	LOQTC284	Australia	Townsville, Queensland	-19.283	146.801	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQTE680	Australia	Townsville, Queensland	-19.283	146.801	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LOQTE740	Australia	Townsville, Queensland	-19.283	146.801	Australia	Hap_05	C4	x	-	-
convolvuli	LSAFA678	South Africa	Mogales Gate Biodiversity Centre	-25.946	27.617	Africa	Hap_06	C1	x	-	-

convolvuli	LSAFR2233	South Africa	Mogales Gate Biodiversity Centre	-25.949	27.657	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	LSAFR2246	South Africa	Mogales Gate Biodiversity Centre	-25.941	27.627	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	LSAFR2252	South Africa	Mogales Gate Biodiversity Centre	-25.941	27.627	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	LSM256	Australia	Waste Point, NSW	-36.347	148.606	Australia	Hap_05	C9	x	-	-
convolvuli	LSM875	Australia	Waste Point, NSW	-36.347	148.606	Australia	Hap_05	C9	x	-	-
convolvuli	MAIMB165	Pakistan	Lahore, Punjab	31.517	74.350	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	MAMOT297	Pakistan	Faisalabad, Punjab	31.383	73.017	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	MAMOT403	Pakistan	Faisalabad, Punjab	31.383	73.010	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	MAMOT404	Pakistan	Faisalabad, Punjab	31.383	73.010	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	MAMOT405	Pakistan	Faisalabad, Punjab	31.383	73.010	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	MAMOT406	Pakistan	Faisalabad, Punjab	31.383	73.010	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	MAMOT407	Pakistan	Faisalabad, Punjab	31.383	73.010	Asia	Hap_12	C7	x	-	-
convolvuli	MGABC545	Gabon	La Lop, Ogooue	-0.219	11.585	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	MGABC546	Gabon	Makokou	0.512	12.804	Africa	Hap_02	C1	x	-	-
convolvuli	MGABC547	Gabon	La Lop, Ogooue	0.509	12.797	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	MGABD303	Gabon	La Lop, Ogooue	-0.219	11.585	Africa	Hap_34	C1	x	-	-
convolvuli	MGABD574	Gabon	Lope	-0.219	11.585	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	MGABD575	Gabon	La Lop, Ogooue	-0.219	11.585	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	MGABD576	Gabon	Lope	-0.219	11.585	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	NSWHM019	Australia	Hat Head, NSW	-31.063	153.052	Australia	Hap_05	C6	x	-	-
convolvuli	NSWHM029	Australia	Hat Head, NSW	-31.063	153.052	Australia	Hap_05	C6	x	-	-

convolvuli	NSWHM456	Australia	Hat Head, NSW	-31.063	153.052	Australia	Hap_39	C6	x	-	-
convolvuli	PHLCC1137	Australia	Canberra, CT	-35.261	149.059	Australia	Hap_05	C9	x	-	-
convolvuli	PMANK028	Kenya	Laikipia	0.534	36.911	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	PMANK030	Kenya	Laikipia	0.534	36.911	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	PMANK031	Kenya	Laikipia	0.534	36.911	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	PMANK050	Nigeria	Oyo	7.501	3.906	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	PMANK051	Nigeria	Oyo	7.501	3.906	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	PMANK052	Nigeria	Oyo	7.501	3.906	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	PMANK053	Nigeria	Oyo	7.501	3.906	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	PMANK054	Nigeria	Oyo	7.501	3.906	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	PMANK055	Nigeria	Oyo	7.501	3.906	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	PMANL809	Kenya	Kajiado	-1.842	36.792	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	SOWD067	France	Garonne	44.863	1.440	Europe	Hap_23	C1	x	-	-
convolvuli	SOWD068	China	Gaoligong Shan, Yunnan	25.750	98.750	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	SOWD069	French Polynesia	Le Grand Canyon, Tahiti	-17.606	-149.541	Ocean. + F. pol.	Hap_05	C2	x	-	-
convolvuli	SOWD070	French Polynesia	Le Grand Canyon, Tahiti	-17.606	-149.541	Ocean. + F. pol.	Hap_05	C2	x	-	-
convolvuli	SOWE806	China	Sichuan	29.981	103.013	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	SPHAP044	India	Amboli, Maharashtra	15.933	73.942	Asia	Hap_12	C7	x	-	-
convolvuli	SPHAP070	Zambia	Kumasamba Lodge	-12.906	28.239	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	SPHAP071	Zambia	Kumasamba Lodge, Kitwe	-12.906	28.239	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	SPHAP072	Zambia	Kumasamba Lodge	-12.906	28.239	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	SPHPA185	RCA	Bayanga	2.918	16.169	Africa	Hap_06	C1	x	-	-

convolvuli	SPHYE007	France	Bouillac	43.844	1.122	Europe	Hap_23	C1	x	-	-
convolvuli	SPHYE008	France	Villate	43.468	1.378	Europe	Hap_33	C1	x	-	-
convolvuli	SPHYE009	France	Lhospitalet	44.358	1.415	Europe	Hap_23	C1	x	-	-
convolvuli	SPPBA360	Madagascar	Fianarantsoa	-21.460	47.078	Madagascar	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	SPPDA001	Tanzania	Iringa	-7.944	34.105	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	SPPDA091	Tanzania	Mbizi Mts., Rukwa	-7.895	31.249	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	SPTMB083	India	Yellapur, Karnataka	15.070	74.610	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	SPTMC854	Fiji	Levu	-16.670	179.020	Ocean. + F. pol.	Hap_27	C2	x	-	-
convolvuli	SPTOL099	Taiwan	Pingtung	22.670	120.460	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	SPTOL130	Taiwan	Taidong	22.410	120.801	Asia	Hap_40	C7	x	-	-
convolvuli	SPTOL134	Taiwan	Taidong	22.450	120.900	Asia	Hap_06	C7	x	-	-
convolvuli	SPTOL192	Tanzania	Dar es Salaam	-6.801	39.283	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	SPTOL196	Palau	Ibobang	7.501	134.501	Ocean. + F. pol.	Hap_05	C5	x	-	-
convolvuli	SPUEB032-07	Maluku Islands	Saumlaki, South Tanimbar	-7.966	131.317	Indonesia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	SPUEB032	Maluku Islands	Saumlaki, South Tanimbar	-7.966	131.317	Indonesia	Hap_05	C3	x	-	-
convolvuli	SPUEB033	Australia	Exmouth	-23.041	113.891	Australia	Hap_05	C10	x	-	-
convolvuli	SSDA224	Tanzania	Kijungu	-5.801	37.187	Africa	Hap_06	C1	x	-	-
convolvuli	SWBB1144	Australia	Byron Bay, NSW	-28.658	153.622	Australia	Hap_05	C8	x	-	-
convolvuli	SWBB1227	Australia	Byron Bay, NSW	-28.658	153.622	Australia	Hap_05	C8	x	-	-
convolvuli	SWHH011	Australia	Hat Head, NSW	-31.063	153.052	Australia	Hap_32	C6	x	-	-
convolvuli	SWHJ954	Australia	Hat Head, NSW	-31.063	153.052	Australia	Hap_05	C6	x	-	-

convolvuli	SWHJ958	Australia	Hat Head, NSW	-31.063	153.052	Australia	Hap_05	C6	x	-	-
convolvuli	SWHJ960	Australia	Hat Head, NSW	-31.063	153.052	Australia	Hap_05	C6	x	-	-
convolvuli	SWHM010	Australia	Hat Head, NSW	-31.063	153.052	Australia	Hap_05	C6	x	-	-
cingulata	MR004	Ecuador	Zamora, Loja	-4.072	-79.066	-	-	-	x	-	-
cingulata	MR025	Cuba	Malecón, Havana	23.144	-82.379	-	-	-	x	-	x
cingulata	MR026	Mexico	Tlaquepaque, Puebla	18.962	-98.285	-	-	-	x	-	x
cingulata	MR126	Argentina	Macapillo	-25.340	-64.040	-	-	-	x	-	x
cingulata	MR127	Argentina	Coronel Moldes	-29.710	-64.050	-	-	-	x	-	x
cingulata	MR128	Panama	El Valle, Barú	8.420	-82.330	-	-	-	x	-	-
cingulata	MRLep179	USA	Missouri, Arizona	33.501	-112.062	-	-	-	x	-	x
cingulata	AMAZ277	Colombia	Florencia	1.518	-75.548	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPAE288	Costa Rica	Guanacaste	10.856	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPAE569	Costa Rica	Guanacaste	10.855	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPAE570	Costa Rica	Guanacaste	10.855	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPAE571	Costa Rica	Guanacaste	10.856	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPAF236	Costa Rica	Guanacaste	10.898	-85.619	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPAG173	Costa Rica	Guanacaste	10.856	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPAG174	Costa Rica	Guanacaste	10.855	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPAG571	Costa Rica	Guanacaste	11.002	-85.456	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPBC191	Costa Rica	Guanacaste	10.880	-85.389	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPBF404	Costa Rica	Guanacaste	10.989	-85.426	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPBG455	Costa Rica	Guanacaste	10.989	-85.426	-	-	-	x	-	-

cingulata	BLPCA359	Costa Rica	Guanacaste	10.856	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPCA360	Costa Rica	Guanacaste	10.856	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPCA362	Costa Rica	Guanacaste	10.856	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPCC859	Costa Rica	Guanacaste	10.884	-85.473	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPCE015	Costa Rica	Guanacaste	10.894	-85.436	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPCE016	Costa Rica	Guanacaste	10.894	-85.436	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPDC484	Costa Rica	Guanacaste	10.856	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPDJ490	Costa Rica	Guanacaste	10.856	-85.670	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPDT1927	Costa Rica	Guanacaste	10.792	-85.462	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPDT1928	Costa Rica	Guanacaste	10.792	-85.462	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPDV1133	Costa Rica	Guanacaste	10.933	-85.459	-	-	-	x	-	-
cingulata	BLPDZ474	Costa Rica	Guanacaste	10.866	-85.327	-	-	-	x	-	-
cingulata	GBGL18093	USA	Georgia	33.600	-84.591	-	-	-	x	-	x
cingulata	JSPC027	Costa Rica	Guanacaste	10.838	-85.619	-	-	-	x	-	-
cingulata	LNC554	USA	North Carolina, Maritime Forest	34.697	-76.683	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHACG232	Costa Rica	Alajuela	10.901	-85.289	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHACG248	Costa Rica	Guanacaste	10.827	-85.637	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB117	Costa Rica	Guanacaste	10.890	-85.480	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB118	Costa Rica	Guanacaste	10.890	-85.480	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB119	Costa Rica	Guanacaste	10.890	-85.480	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB120	Costa Rica	Guanacaste	10.854	-85.609	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB121	Costa Rica	Guanacaste	10.890	-85.480	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB388	Costa Rica	Alajuela	10.914	-85.382	-	-	-	x	-	-

cingulata	MHASB398	Costa Rica	Guanacaste	10.772	-85.434	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB460	Costa Rica	Alajuela	10.901	-85.289	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB461	Costa Rica	Alajuela	10.880	-85.389	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB462	Costa Rica	Alajuela	10.907	-85.288	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB463	Costa Rica	Alajuela	10.880	-85.389	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB803	Costa Rica	Guanacaste	11.005	-85.474	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASB831	Costa Rica	Alajuela	10.916	-85.379	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASD091	Costa Rica	Sendero	10.933	-85.457	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASD092	Costa Rica	Quebrada	11.027	-85.495	-	-	-	x	-	-
cingulata	MHASD093	Costa Rica	Quebrada	11.027	-85.495	-	-	-	x	-	-
cingulata	SOWD097	Mexico	San Luis Potosi	22.545	-100.430	-	-	-	x	-	-
cingulata	SOWD098	Mexico	Zacatecas	21.735	-103.177	-	-	-	x	-	-
cingulata	SOWD099	Cape Verde	Fogo	14.925	-24.405	-	-	-	x	-	-
cingulata	SOWD100	Cape Verde	Fogo	14.925	-24.405	-	-	-	x	-	-
cingulata	SOWD101	Mexico	Zacatecas	21.735	-103.177	-	-	-	x	-	-
cingulata	SOWD102	Jamaica	Belmont	18.166	-78.009	-	-	-	x	-	-
cingulata	SOWD103	Jamaica	Belmont	18.166	-78.009	-	-	-	x	-	-
cingulata	SPTMA454	Cape Verde	Santa Cruz	15.119	-23.603	-	-	-	x	-	-
cingulata	SPTMA455	Cape Verde	Santa Cruz	15.119	-23.603	-	-	-	x	-	-
cingulata	SPTMA457	Cote d'Ivoire	Man	7.378	-7.555	-	-	-	x	-	-
cingulata	SPTMC854	Fiji	Lauwaki	-17.649	177.403	-	-	-	x	-	-
cingulata	SPTOL218	USA	Georgia	34.683	-84.472	-	-	-	x	-	-
cingulata	TDMPE224	Brasil	Pacajá	-3.842	-50.663	-	-	-	x	-	-

godarti	MR101	Australia	Poddy Creek, Queensland	-37.610	148.910	-	-	-	x	-	x
godarti	MR103	Australia	Winton, Queensland	-22.380	143.030	-	-	-	x	-	x
godarti	MR104	Australia	NE Boulia, Queensland	-22.906	139.918	-	-	-	x	-	x
godarti	MR105	Australia	Talaroo, Queensland	-18.130	143.926	-	-	-	x	-	x
godarti	MR106	Australia	Helensvale, Queensland	-27.912	153.337	-	-	-	x	-	x
luctifera	MR109	Indonesia	Melolo, Sumba Island	-9.895	120.653	-	-	-	x	-	x
luctifera	MR110	Indonesia	Waikabubak, Sumba Island	-9.637	119.413	-	-	-	x	-	x
luctifera	MR111	Indonesia	NW Kalabahi, Alor Island	-8.205	124.508	-	-	-	x	-	x
luctifera	MR116	Indonesia	Sentani, Papua	-2.560	140.510	-	-	-	x	-	x
luctifera	MR117	Indonesia	Lorulun, Yamdena Island	-7.780	131.270	-	-	-	x	-	x
luctifera	MR118	Indonesia	S Tanimbar, Yamdena Island	-7.902	131.290	-	-	-	x	-	x
luctifera	SOWD074	Papua New Guinea	Lat, New Britain Island	-4.628	152.264	-	-	-	x	-	-
luctifera	SOWD075	Indonesia	Wolopogo, Nusa Tenggara	-8.778	121.189	-	-	-	x	-	-
luctifera	SOWD077	Indonesia	Moni, Flores	-8.686	121.786	-	-	-	x	-	-
rothschildi	MR082	New Caledonia	Mt. Krape Poya	-21.401	165.267	-	-	-	x	-	x
rothschildi	SPRBA1083	New Caledonia	Yate	-22.087	166.733	-	-	-	x	-	-

Príloha 2: Párové Fst *Agrius convolvuli* (COI); geografické označenie je zhodné s označením geografických celkov v Prílohe 1

	Africa	**Madagascar**	**Europe**	**Asia**	**Indonesia**	**Australia**
Africa						
Madagascar	-0.02692					
Europe	0.28251	0.30217				
Asia	0.00957	-0.00222	0.14521			
Indonesia	0.71014	0.71528	0.69861	0.5848		
Australia	0.83449	0.84184	0.81421	0.7169	0.07592	
Oceania_F. Pol.	0.91611	0.92434	0.88605	0.7732	0.03369	0.04366

Príloha 3: DNA divergencia porovnávaná medzi jednotlivými geografickými celkami (S – počet polymorfných miest, π – totálna nukleotidová diverzita, k_P – priemerný počet nukleot. rozdielov medzi geograf. celkami)

	Africa	**Madagascar**	**Europe**	**Asia**	**Indonesia**	**Australia**	**Oceania_F. Pol.**
Africa		S: 11 π: 0.00333 k_P: 1.056	S: 24 π: 0.00783 k_P: 2.053	S: 61 π: 0.00838 k_P: 2.546	S: 30 π: 0.02287 k_P: 12.757	S: 217 π: 0.02702 k_P: 15.129	S: 25 π: 0.01079 k_P: 14.233
Madagascar			S: 19 π: 0.00745 k_P: 2.214	S: 61 π: 0.01511 k_P: 3.324	S: 28 π: 0.02925 k_P: 15.204	S: 237 π: 0.01570 k_P: 16.396	S: 29 π: 0.02694 k_P: 23.200
Europe				S: 65 π: 0.01463 k_P: 4.310	S: 40 π: 0.02711 k_P: 8.595	S: 213 π: 0.02245 k_P: 15.593	S: 33 π: 0.02219 k_P: 16.381
Asia					S: 63 π: 0.02699 k_P: 13.784	S: 211 π: 0.02619 k_P: 14.106	S: 60 π: 0.02463 k_P: 14.823
Indonesia						S: 223 π: 0.01322 k_P: 5.655	S: 27 π: 0.01756 k_P: 4.622
Australia							S: 223 π: 0.01181 k_P: 2.578

Príloha 4: Prehľad hodnôt pre sekvenčný polymorfizmus (n – počet sekvencií, π – nukleotidová diverzita, h – počet haplotypov, Hd – haplotypová diverzita, S – počet polymorfných miest, k – priemerný počet nukleot. rozdielov)

Lokalita	n	π	h	Hd	S	k	Tajima's D
Africa	48	0.00329	13	0.581	11	1.014	-2.53464
Madagascar	6	0.00327	5	0.933	5	1.867	-0.82582
Europe	21	0.00822	14	0.914	19	2.695	-1.83049
Asia	35	0.01673	13	0.755	61	4.850	-2.50915
Indonesia	9	0.02043	7	0.917	29	8.417	-1.19115
Australia	117	0.0123	14	0.241	231	4.133	-3.00599
Oceania_Fr. Pol.	5	0.00653	4	0.9	7	3.600	0.49788

Príloha 5: Výsledky molekulárnej variácie (AMOVA) u lišajov druhu *A. convolvuli*

Variácia	df	Σ štvorcov	Variácia komponentov	% variability	Fikačné indexy Φ
Medzi geografickými celkami	0	0	NA	NA	NA
Medzi populáciami g. celkov	9	6662.278	32. 757	NA	0.79969
V populáciách g. celkov	232	1903.615	8205	NA	NA
Total	241	8565.893	NA	NA	