

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: B4106 Zemědělská specializace
Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů
Katedra: Katedra biologických disciplín
Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Fylogeografie horského okáče *Bicyclus anisops* v západní
Africe**

Vypracoval: Bc. Vojtěch Petruš

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Robert Tropek, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Michal Berec, Ph.D.

České Budějovice, 2014

Prohlášení:

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 (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích

.....
Vojtěch Petru

Poděkování:

Rád bych touto formou poděkoval mému školiteli, panu RNDr. Robertu Tropkovi, Ph.D. za obětavé a trpělivé vedení mé diplomové práce a možnost podílet se na projektu, jehož součástí je i tato diplomová práce.

Speciální poděkování pak patří všem, kteří mi ve vypracování této práce jakkoli pomáhali, především pak Bc. Danu Leštinovi a a RNDr. Michaele Borovanské, Ph.D. za pomoc v laboratoři, Dr. Oskaru Brattströmovi Ph.D. za poskytnutí vzorků z Nigérie, RNDr. Petru Henebergovi Ph.D. za pomoc se sekvenováním problematických genů, Mgr. Zuzaně Musilové, Ph. D. a Mgr. Petru Janšтови za pomoc s fylogenetickými analýzami a Ing. Zdeňku Ipserovi za pomoc s formálními náležitostmi v této diplomové práci. Za financování této práce děkuji National Geographic Society (Waitt Grant W163-11) a Grantové agentuře České republiky (14-36098G).

Abstrakt

Pohoří Guinejského zálivu představuje pás hor sopečného původu rozkládajících se v Africe, v oblasti na hranicích Nigérie a Kamerunu a dále pokračujících v Guinejském zálivu ostrovy Bioko, Sv. Tomáš a Princovým ostrovem. Toto území je unikátní rozsáhlou horskou oblastí v celé střední a západní Africe. Díky vysoké míře izolovanosti se stalo domovem mnoha endemických druhů a jako celek patří do jednoho z 25 světových „hot-spotů“ biodiverzity, označovaného jako West African Forests („Západoafrické lesy“). Toto pohoří je i přes svůj význam z hlediska ochrany přírody pod silným antropogenním tlakem, protože po dlouhou dobu patří k nejhustěji zalidněným oblastem tropické Afriky.

I přes všechny tyto faktory se ochranné snahy v západní Africe zaměřují především na nížinné oblasti rozsáhlých deštných lesů, zatímco horským systémům je pozornost věnována spíše okrajově. Z toho plyne i nedostatek biogeografických a fylogeografických studií horské fauny a flóry. V této práci jsem shrnul výsledky všech klíčových studií zabývajících se biogeografií pohoří Guinejského zálivu. Dále jsem osekvenoval tři mitochondriální geny (COI, COII a ND1) endemického horského okáče *Bicyclus anisops* a na základě získaných sekvencí jsem zanalyzoval strukturu populací tohoto druhu.

Variabilita ve studovaných genech byla relativně nízká. Fylogenetické analýzy spolehlivě rozlišily studované populace do sedmi skupin (1. Mt. Cameroon, 2. Nkogam I, 3. Nkogam II, 4. Bakossi-Kupe-Manengouba-Bani, 5. Mbam, 7. Hosséré Enla Fabo 6. Všechny ostatní lokality (tj. Bamenda-Banso Mts., Acha Tugi, Mbam, Ngel Nyaki, Gotel Mts.)), ale nevyřešily vztahy mezi nimi. Na základě haplotypové diverzity populací *B. anisops*, jakožto deštníkového druhu, byly určeny Mt. Cameroon, Nkogam, Mbam Massif, Mbiame, Hosséré Enla Fabo, Mt. Manengouba, Mt. Kupe a Mt. Oku jako lokality s největším ochranným významem.

klíčová slova: Pohoří Guinejského zálivu, *Bicyclus anisops*, fylogeografie, motýli, Afrika, Kamerun, Nigérie

Abstract

The Gulf of Guinea Highlands is a unique montane range of volcanic origin, situated on the African mainland in the border of Nigeria and Cameroon, and the Gulf of Guinea islands of Bioko, São Tomé and Príncipe. This area is highly unique as the only large mountains in central and western Africa. The high degree of isolation of these mountains generated high degree of endemism of many groups of organisms; the whole region is thus one of the world biodiversity hotspots (known as the West African Forests). Despite its tremendous conservation importance, this mountain range is under strong anthropogenic influence, as one of the most densely populated areas in tropical Africa.

Despite all these factors, the conservation efforts in West Africa focused mainly on lowland areas of rain forests, whilst only few conservation effort is focused to the mountain habitats. As the other result, the lack of comprehensive biogeographic and phytogeographical studies of mountain flora and fauna is obvious. In this work, I have summarized the results of all crucial studies of the biogeography of the Gulf of Guinea Highlands. I also obtained sequences of three mitochondrial genes (COI, COII, and ND1) of an endemic montane butterfly *Bicyclus anisops*.

Variability in the studied genes was relatively low. Phylogenetic analyses separated haplotypes into 7 well-established groups (1st Mt. Cameroon, 2nd Nkogam I, 3rd Nkogam II, 4th Bakossi-Kupe-Manengouba-Bani, 5th Mbam, 7th Hosséré Enla Fabo 6th all others localities (tj. Bamenda-Banso Mts., Acha Tugi, Mbam, Ngel Nyaki, Gotel Mts.)) but did not significantly resolved relationships among them. Based on the haplotype diversity of *B. anisops* as an umbrella species, Mt. Cameroon, Nkogam, Mbam Massif, Mbiame, Hosséré Enla Fabo, Mt. Manengouba, Mt. Kupe and Mt. Oku are considered as localities of the highest conservation importance.

keywords: the Gulf of Guinea Highlands, *Bicyclus anisops*, phylogeography, butterflies, Africa, Cameroon, Nigeria

OBSAH:

| | |
|--|-----------|
| 1. ÚVOD | 7 |
| 2. CÍLE PRÁCE | 8 |
| 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED | 9 |
| 3.1. Geologický popis | 9 |
| 3.2. Vznik a vývoj..... | 9 |
| 3.3. Habitaty. | 11 |
| 3.4. Fauna a flóra. | 12 |
| 3.5. Ochrana a ohrožení. | 15 |
| 3.6. Vliv klimatických změn v období čtvrtohor..... | 16 |
| 3.6. Biogeografie. | 17 |
| 4. METODIKA | 23 |
| 4.1. Popis druhu | 23 |
| 4.1.1. Rod <i>Bicyclus</i> | 23 |
| 4.1.2. <i>Bicyclus anisops</i> | 24 |
| 4.2. Sběr materiálu | 24 |
| 4.2.1. Přehled lokalit | 25 |
| 4.3. Laboratorní analýza..... | 28 |
| 4.3.1. Izolace DNA..... | 28 |
| 4.3.2. PCR..... | 29 |
| 4.3.3. Fylogenetické a populačně-genetické analýzy | 29 |
| 5. VÝSLEDKY | 31 |
| 6. DISKUZE | 38 |
| 6.1. Fylogeografie a historie populací | 38 |
| 6.2. Porovnání výsledků s jinými fylogeografickými studii..... | 39 |
| 6.3. Aplikovatelnost výsledků pro ochranu přírody | 40 |
| 7. ZÁVĚRY | 42 |
| 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 43 |

1. ÚVOD

Pohoří Guinejského zálivu představuje jedinou souvislou horskou oblast západní a střední Afriky. Díky své výrazné izolovanosti od ostatních Afrických pohoří zaujímá významnou roli coby domovský areál mnoha endemických druhů (*Tropek et Konvička 2010*). Toto pohoří je navíc součástí jednoho ze světových „hot-spotů“ biodiverzity (*Myers et al. 2000*), označovaného jako West African Forests („Západoafrické lesy“). Riziko ztráty těchto vzácných ekosystémů je ovšem značné, protože zde žije jedna z nejpočetnějších lidských populací tropické Afriky a antropogenní tlak na přírodní stanoviště je tedy velmi silný (*Tropek et Konvička 2010*). Problémem je navíc i fakt, že ochránářské snahy se v současné době zaměřují převážně na nížinné tropické lesy a horské oblasti zůstávají takřka bez povšimnutí (*Bergh et al. 2007*). Nedojde-li ke vhodnému rozšíření sítě chráněných území i na horské biotopy, je možné očekávat stupňující se degradaci těchto stanovišť a ztrátu značné části zdejší biodiverzity (*Tropek et Konvička 2010*). Z ochránářského hlediska je tedy velmi důležité poznat strukturu a historii populací na molekulární úrovni, protože díky tomu můžeme zefektivnit ochranu druhů tak, že vytyčíme oblasti přednostní ochrany, které budou reflektovat celou širší genetické variability druhů, aniž bychom museli vynakládat úsilí na ochranu celého areálu jejich rozšíření. Ochranářské snahy pak můžeme o to intenzivněji zaměřit na nejcenější oblasti z hlediska genetické variability druhu, ale také je možné konfrontovat nabitě poznatky s dalšími faktory, jako velikost a životaschopnost populace, stupeň degradace biotopů, nebo můžeme výsledky srovnat mezi jednotlivými endemickými a ohroženými druhy a zjistit mnoho informací o stavu celých společenstev (*Smith et al. 2000; Zimkus 2009; Tropek et Konvička 2010*).

2. CÍLE PRÁCE

- Získání sekvencí třech mitochondriálních genů (COI, COII a ND1) endemického motýla *Bicyclus anisops*
- Analýza populační struktury a fylogeografie
- Porovnání výsledků se známým historickým vývojem cílové oblasti a s fylogeografickými pracemi na jiných organismech

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Geologický popis

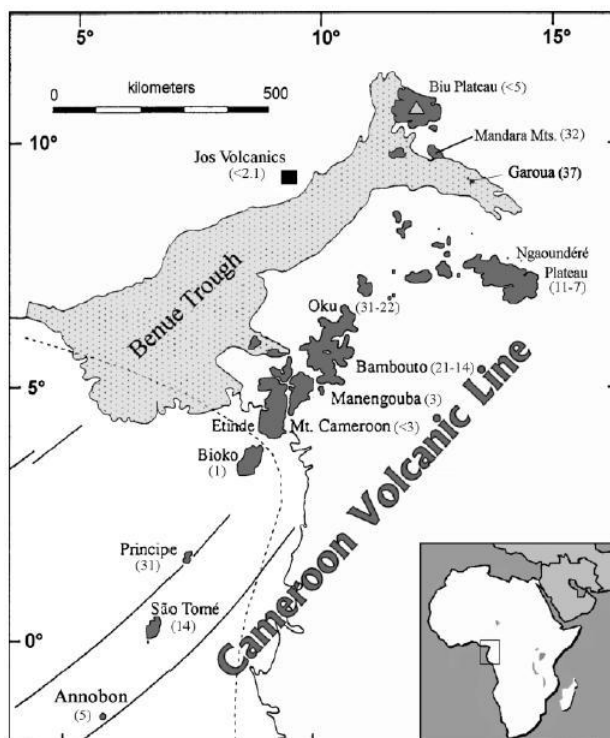
Horské oblasti západního Kamerunu, východní Nigérie a přilehlých ostrovů Guinejského zálivu představují jedno z největších souvislých pohoří na Africkém kontinentu, nejčastěji nazývané the Cameroon Volcanic Line, nebo the Gulf of Guinea Highlands (v českém jazyce nemá tato oblast ustálený název, v této práci budu tedy používat termín pohoří Guinejského zálivu). Toto pohoří je tvořeno pásem vulkanických vrcholů rozšířených od ostrovů Guinejského zálivu, přes Kamerunské vnitrozemí až k Čadskému jezeru. Jde o pás geologických útvarů vulkanického původu, rozložených na přibližně tisíc kilometrů dlouhé ose přičemž přibližně polovina leží na pevnině a polovina na dně oceánu. Šest mořských vrcholů představuje čtyři ostrovy – Bioko (dříve Fernando Pó), Princův ostrov, Sv. Tomáš a Pagua (dříve Annobon). Také zahrnuje dvě velké podmořské hory, jednu ležící mezi ostrovy Bioko a Princovým ostrovem a druhou mezi Princovým ostrovem a Sv. Tomášem. Zda patří podmořské hory, ležící přibližně 100 km jihozápadně od Pagalu k tomuto geologickému seskupení, se z důvodu absence dat s určitostí nedá potvrdit. Vnitrozemská část tohoto pohoří se rozkládá od hory Mt. Cameroon na jihozápadním pobřeží Kamerunu přes Rumpi Hills, Bakossi Mountains a Mt. Manengouba k pohořím Bamenda-Banso a Adamawa (zahrnující hory Gotel a Tchabal Mbabo) na severovýchodě Kamerunu a přetíná Nigerijskou hranici v podobě pohoří Obudu, Mambilla Plateau Alantika Mts. a Mandara Mts. Sopky pevninské části pohoří Guinejského zálivu vznikly v místech, kde tato linie protíná praskliny zemské kůry (*Meyers et al. 1998; Déruelle et al. 2007*). Tyto praskliny ovšem nejsou zmapovány. Obecně jde o poměrně malé geologické útvary, s průměrem pohybujícím se od 100 do 2000 km, přičemž přesná délka záleží na tom, zdali jsou jednotlivé vrcholy solitérní, nebo kumulované (*Burke 2001*).

3.2. Vznik a vývoj

Vulkanická činnost, vedoucí k vyvrásnění pohoří Guinejského zálivu začala v pánvi okolo Čadského jezera v období pozdní křídy, někdy před asi 69 miliony let (*Mbowou et al. 2012*), nicméně většina skalních útvarů vznikla během období

kenozoiku, před asi 45 až 10 miliony let, přičemž stáří jednotlivých vrcholů se snižuje od jezera Čad směrem k pobřeží Guinejského zálivu (*Marzoli et al. 2000*). Oblast mezi pohořími Kapsiki a Bambouto vznikla v období před 65 až 30 miliony let. Jižní část pevninských vrcholů pohoří Guinejského zálivu se začala formovat před 25 miliony let a horotvorná činnost zde pokračuje do současnosti (*Mbowou et al. 2012*). Nejmladšími vrcholy jsou Mt. Cameroon, Mt. Manengouba a vulkanické vrcholy ostrova Bioko, které mají pliocéní až pleistocéní původ (obr. 1). Recentní původ Mt. Cameroon navíc jasně demonstruje jeho vulkanická aktivita. Jde o nejčinnější západoafrickou sopku s nejméně 7 erupcemi v posledních sto letech (*Njome 2009*).

Před vyvrásněním pohoří Guinejského zálivu, byly na přibližně tomtéž území přítomny malé komplexy žulových plutonů (*Burke 2001*). Šlo o 711 vrcholků, které ležely na kontinentální litosferické desce před 65 až 30 miliony let. Tyto vrcholky měly jen 5 až 10 km v průměru a byly rozloženy na asi 1200 km dlouhé linii (*Burke 2001*). Nejvíce koncentrovány byly okolo 7 ° severní šířky a 11,5 ° východní délky (*Deruelle et al. 1991*). Tyto souřadnice odpovídají současným nejrozsáhlejším horským oblastem v rámci pohoří Guinejského zálivu, tedy regionům Bamboutu a Oku (*Burke 2001*). Před 35 miliony let začalo docházet k intruzi magmatických hornin a vyvrásnění současných vrcholů podél stejné linie. Tyto nově vzniklé magmatické komplexy jsou definovány tím, že zde nikdy nepřevládá čedič, který je produktem tání kontinentálních desek a linie vrcholů je prodloužena do moře o 650 km. Nejjižnější výběžek Kamerunského žulového komplexu na Mt. Koupe, vzniklý před asi 46 miliony let (*Fitton 1987*), leží asi 100 km od pobřeží, ačkoli je možné, že se podobné komplexy nacházejí také pod Mt. Cameroon a na ostrově Bioko, ovšem jsou překryty mladším objemným nánosem vulkanického čediče a andezitu. Většina vrcholů pohoří Guinejského zálivu tedy vznikla před 35 až 10 miliony let, zatímco vrcholy na Mt. Cameroon, Mt. Manengouba a ostrově Bioko v posledních 3 milionech let. Stáří posledních dvou vrcholů pohoří Guinejského zálivu není znám, protože se nacházejí na mořském dně (*Burke 2001; Rankenburg 2005*). Vzhledem k velkému odtoku sedimentů z Africké pevniny v posledních 10 milionech let se dá předpokládat, že vrcholy Africké desky před 30 miliony let prudce vzrostly a brzy začaly být erodovány (*Burke 1996*).



Obr. 1: Geologická mapa ukazující období vulkanické aktivity hlavních masivů pohoří Guinejského zálivu, znázorněných nejtmaší barvou opatřených názvem a číselnou hodnotou udávající období největší vulkanické aktivity v milionech let. (převzato z Rankenburg 2005)

3.3. Habitaty

Kamerun je země rovníkové Afriky rozléhající se na území 475 000 km² mezi 2–12 ° severní šířky a 8–16 ° východní délky. Je charakterizována několika biogeografickými oblastmi, od suchých savan na severu po rovníkové deštné lesy na jihu. Horské oblasti v centrální a západní části země navíc přispívají ke zvýšení rozmanitosti biotopů a zvyšují sezonalitu (Ayala 2009). Převážná část pohoří Guinejského zálivu je situována do oblasti tropických lesů a pouze nejsevernější vrcholy zasahují do pásma afrických savan (Graham et al. 2005). V těchto sušších oblastech na severovýchodě pohoří se vyskytuje suchý les, který je oproti zapojenému lesu tropických pásů výrazněji ovlivněn fluktuací srážek během roku. Druhová skladba navíc není tak pestrá a s rostoucí vzdáleností od rovníkových oblastí Guinejského zálivu se hustota porostu rozvolňuje a snižuje se i druhová diverzita, přičemž hranice rozvolněného lesa a savany se vyznačuje výskytem pouze

asi šesti druhů vyšších dřevin. Tento les je pak ve vyšších oblastech doplněn suchými trávníky a skalnatými výběžky bez souvislého vegetačního pokryvu (Swaine 1992). Souvislý podhorský a horský les v tropických oblastech se vyskytuje přibližně ve výškovém rozmezí od 900 po 1800 m n. m. Oblasti nad touto hranicí se pak vyznačují směsí horských elementů jako roztroušený horský les doplněný o fragmenty horských trávníků, bambusových porostů a subalpínských společenstev (White 1983).

3.4. Fauna a flora

Hory Guinejského zálivu jsou významnou součástí jednoho ze světových „hotspotů biodiverzity“ (Myers et al. 2000). Tento „hotspot“ souhrnně označovaný jako West African Forests, tedy západoafrické lesy patří mezi 25 nejvýznamějších světových center biodiverzity a endemismu (Myers et al. 2000, Zimkus 2009, Missoupe et al. 2012). Jako celek je domovem okolo 9000 rostlinných druhů, z nichž 2250 je pro tuto oblast endemických. Dále zde můžeme nalézt 1320 druhů obratlovců, přičemž endemických pro západoafrické lesy je 270. To znamená, že tato oblast v globálním měřítku představuje domov pro 0,8 % endemických druhů rostlin a 1 % endemických obratlovců, které lze nalézt pouze zde (Myers et al. 2000). Kromě cévnatých rostlin a obratlovců, nelze opomenout také bezobratlé, kteří rovněž představují skupinu živočichů s množstvím endemických druhů typických pro tuto oblast (Vick 1999; Tropek et Konvička 2010).

Přesto, že se velká část druhového bohatství vyskytuje v oblastech nížinných a horských lesů, značné množství druhů obývá kromě lesních biotopů také oblasti mozaikovitě krajiny na okraji lesů, až po otevřené horského bezlesí, přičemž některé druhy tyto otevřené lokality preferují a některé jsou na bezlesí přímo vázány (Bergl et al. 2007; Reif 2007; Tropek et Konvička 2010).

Bergl et al. (2007) ve své studii zkoumali distribuci chráněných území a pokrytí areálů výskytu endemických druhů těmito chráněnými územími v západoafrickém pralese Biafran a v horách Guinejského zálivu. Tato studie mapuje areál výskytu endemických druhů ptáků, savců a obojživelníků, což jsou skupiny s vysokým počtem druhů, endemických pro západoafrické lesy. Z této studie

vyplývá, že podíváme-li se na areály rozšíření jednotlivých skupin organismů endemických pro prales oblasti Biafra a hory Guinejského zálivu podle nadmořské výšky, zjistíme, že se značně liší. Například u primátů je patrné, že preferují spíše nížinná stanoviště. Výskyt čtyř z dvanácti endemických poddruhů primátů byl zaznamenán pouze v nadmořských výškách pod 1600 m n. m. Zbylých 8 poddruhů se vyskytuje jak v horských, tak v nížinných oblastech, ovšem vzácněji se vyskytují v oblastech nad 1700 m n. m. Specifickým případem s velmi malým a roztroušeným areálem výskytu je gorila nížinná nigerijská (*Gorilla gorilla diehli*) (Bergl et al. 2007). Tento poddruh obývá extrémně členitý terén sahající od oblastí pod 200 m n. m. v pralese Takamanda v Kamerunu po oblasti přesahující 2000 m n. m. blízko hory Kagwene. Jejich habitat je velmi rozmanitý a proměnlivý v závislosti na sezonalitě prostředí. Zahrnuje nížinné lesy, suché lesy, podhorské a horské lesy i horské bezlesí (Bergl et al. 2007).

Zcela jinou stanovištní preferenci můžeme vyzorovat u ptačích endemitů pralesů oblasti Biafra a hor Guinejského zálivu. Na rozdíl od primátů se zdejší endemické druhy ptáků téměř výhradně vyskytují v horských oblastech. Z 26 endemických druhů jich bylo 23 zaznamenáno v nadmořských výškách nad 1600 m n. m., 17 z nich nebylo nikdy pozorováno pod 800 m n. m. Všechny zdejší endemické druhy ptáků obývají horské lesy a horské bezlesí. Většina těchto druhů obývá více vrcholů, ale najde se i několik druhů, které se vyskytují pouze na jediném vrcholu, případně několika málo vrcholech (Bergl et al. 2007). Mezi takové druhy můžeme zařadit frankolína kamerunského (*Francolinus camerunensis*) obývajícím Mt. Cameroon, kruhoočko fernandské (*Speirops brunneus*) endemické pro Pico Basilé na bioku a kruhoočko kamerunské (*Speirops melanocephalus*) endemický pro Mt. Cameroon (Graham et al. 2005; Bergl et al. 2007). Celý rod *Speirops* se přitom vyskytuje pouze na Mt. Cameroon, Bioku a dalších ostrovech Guinejského zálivů (Bergl et al. 2007). Mezi druhy s velmi úzkým výskytem můžeme zahrnout také *Malaconotus cupensis*, který byl zaznamenán na třech lokalitách – Bakossi Mts., Banyang Mbo a Mt. Kupe a timálii kamerunskou (*Kupeornis gilberti*), turako bannermanova (*Tauraco bannermani*), či strdimila biokoského (*Cinnyris ursulae*), pozorované rovněž pouze na několika horských lokalitách (Graham et al. 2005). Přestože dosud neexistuje podobně podrobná studie bezobratlých živočichů studované oblasti, přinejmenším u motýlů je zjevné, že většina endemických taxonů

je vázána na vyšší nadmořské výšky (Larsen 2005; Tropek et Konvička 2010) podobně jako u ptáků (Graham et al. 2005).

Třetí dobře známou skupinou s vysokým počtem endemických druhů typických pro západoafrické lesy, zmiňovanou v této studii jsou obojživelníci (Zimkus et Gvoždík 2013). Z 51 endemických obojživelníků pralesa Biafran a hor Guinejského zálivu jich bylo 37 zaznamenáno nad 800 m n. m. Z těchto 37 druhů jich 12 obývá zónu mezi 800 až 1600 m n. m., 14 bylo nalezeno pouze nad 1200 m n. m. a 9 je známo z poloh vyšších než 1600 m n. m (Bergl et al. 2007). U obojživelníků je také ve srovnání s jinými živočišnými skupinami častý velmi roztroušený areál výskytu, způsobený omezenou schopností šířit se (Hofer et al. 1999). Některé zdejší druhy jsou proto známy z mnoha lokalit (např. *Pedropedetes parkeri* a *Wolterstorffina parvipalmata*), jiné byly zaznamenány pouze na jediném místě (např. *Cardioglossa trifasciata* a *Phrynobatrachus manengoubensis* z Mt. Manengouba) (Bergl et al. 2007).

Tropek et Konvička (2010) zkoumali stanovištní preference tří hojných motýlů endemických pro pohoří Guinejského zálivu (*Colias electo manengoubensis*, *Bicyclus anisops* a *Mylothris jacksoni knutsoni*). Výzkum byl realizován v oblasti Mendong Buo, asi 5 km jihovýchodně od Big Babanki v pohoří Bamenda v severozápadním Kamerunu. Šlo o časově standartizovaný průzkum ve čtyřech typických horských habitatech této oblasti: uzavřený zapojený les, křoviny a řídké lesní okraje, mýtiny s převahou hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) a neintenzivní pastviny. Z výsledků je patrné, že všechny tři zkoumané druhy se vyhýbají stinnému zapojenému lesu a kapradinovým porostům, přičemž *C. electo manengoubensis* preferuje travní habitaty a *B. anisops* a *M. jacksoni knutsoni* dávají přednost okrajům lesa a křovinám. Jelikož jde ve všech třech případech o striktně endemické druhy horských lokalit pohoří Guinejského zálivu, autoři usuzují, že mozaikovitá krajina a otevřená nelesní společenstva musela být přítomna v době, kdy se tyto druhy vyvíjely a dementují tím všeobecně rozšířenou představu, že původním stanovištěm na drtivě většině horských lokalit pohoří Guinejského zálivu jsou pouze uzavřená lesní společenstva (Flenley 1998).

Co se rostlinných druhů týče, tak oblast západoafrických lesů představuje území s nejbohatší diverzitou na Africkém kontinentu (Myers et al 2000). Všechny

rostlinné rody endemické pro tropickou Afriku, jako Huaceae, Lepidobotryaceae, Medusandraceae, Octoknemantaceae, či Hoplestigmataceae jsou koncentrovány právě v této oblasti a v jiných částech tropické Afriky buďto chybí, nebo jsou zde zastoupeny pouze malým počtem druhů. Jen na samotném Mt. Cameroon a jeho úpatí se vyskytuje 50 druhů a 3 celé rody zcela endemické a dalších více než 50 druhů známých jen z několika málo dalších lokalit (*Cheek et al. 1996*).

3.5. Ochrana a ohrožení

V Africe byly první národní parky a rezervace zřizovány nadšenci, obvykle z řad příslušníků koloniálních armád, či sportovních lovců a odůvodnění jejich vzniku byla často podivná (*Neumann 1996*). Nejčastějšími oblastmi, kde byla tato chráněná území zřizována jsou savany za účelem ochrany megafauny zajímavé pro sportovní lov (*Fjeldsa et al. 2004*). Jiné rezervace byly zřizovány podél státních hranic, kam nesměřovaly velké investice do ekonomického rozvoje a v některých případech i na místech, kde bylo potřeba z politických důvodů vytvořit řídce osídlené zóny (*Asiwaju 1985; Sandwith et al. 2001*). *Fjeldsa et al. (2004)* testovali, jak efektivně odpovídá současná síť chráněných území rozšíření ohrožených a endemických Afrických savců. Z tohoto výzkumu vyplývá, že současná síť chráněných území velmi dobře odpovídá rozšíření 194 velkých savců, z toho 51 ohrožených vyhynutím, ale již méně optimálně pokrývá rozšíření všech 197 ohrožených druhů savců, pokud zahrneme menší druhy s tělesnou hmotností pod 3 kg, často s roztroušeným areálem výskytu. Nedostatečné pokrytí ohrožených druhů současnou sítí chráněných území můžeme vyzorovat i u jiných taxonů, jako jsou ptáci, obojživelníci, či bezobratlí (*Bergl et al. 2007; Sedlacek et al. 2007; Tropek et Konvička 2010*). Z tohoto důvodu je potřeba efektivně rozšířit stávající síť chráněných území tak, aby odpovídala výskytu dalších Afrických druhů, zvláště pak těm bezprostředně ohroženým vyhynutím, vyskytujícím se velmi často v horských oblastech (*Bergl et al. 2007*). Problém ovšem je, že mnohé z těchto ochranných atraktivních oblastí se nacházejí v místech vysokého zalidnění, nebo jde o oblasti s dobrým zemědělským potenciálem (*Fjeldsa et al. 2004*).

Jedním z těchto ochranných atraktivních míst s vysokým počtem endemických druhů je i pohoří Guinejského zálivu s přilehlými nížinnými lesy (*Fjeldsa et al.*

2004; *Bergl et al. 2007*). Tato oblast vymezená řekami Cross a Sanaga včetně ostrova Bioko představuje region neobyčejného ekologického bohatství a diverzity (*Oates et al. 2004*). Tento region dále zahrnuje nejvýše položené horské oblasti západní Afriky s nejvyšším vrcholem Mt. Cameroon (4090 m n. m.) (*Marzoli et al. 2000*), které představují významné primární bezlesí tropické Afriky (*Tropek et Konvička 2010*) a jeden z největších relativně neporušených souvislých lesů v západní Africe rozprostírající se na ploše přibližně 26 000 km² (*Oates et al. 2004*). Navzdory tomu, je ochrana těchto ekosystémů nedostačující (*Bergl et al. 2007; Tropek et Konvička 2010*). Degradace přírodních stanovišť je způsobena stále se stupňujícím antropogenním tlakem, který je umocněn tím, že tento region patří k nejhustěji zalidněným oblastem tropické Afriky (*Fjeldsa et al. 2004; Bergl et al. 2007*). V důsledku toho dochází k fragmentaci a degradaci souvislých lesních porostů, způsobenou těžbou dřeva, či vypalováním za účelem získání zemědělské plochy (*Bergl et al. 2007*). V horských oblastech může být za určitých podmínek neintenzivní lidská činnost přínosem, protože nahrazuje nedávno vyhynulé velké býložravce, kteří disturbancemi vytvářeli a udržovali mozaikovitost krajiny, na kterou je vázáno mnoho druhů (*Tropek et Konvička 2010*). Ovšem tato činnost je ve většině případů příliš intenzivní a dlouhodobě neudržitelná, čímž vznikají zcela uniformní celky plantáží, velkých intenzivních pastvin, a druhově chudých a velmi obtížně regenerujících vypálených mýtin. Tyto plochy jsou navíc velmi náchylné na další průvodní jevy antropogenních činností, jakými jsou invaze nepůvodních rostlin, rozsáhlá eroze, či vysušování krajiny (*Tropek et Konvička 2010*). Přesto, že mnohé vzácné druhy jsou vázané na horskou mozaikovitou krajinu, či bezlesí (*Sedláček et al. 2007; Tropek et Konvička 2010*), dosavadní (ač nedostatečné) ochrannářské úsilí se prakticky zcela zaměřuje na oblasti nížinných a horských lesů (*Bergl et al. 2007*). Je tedy třeba, aby byly ochrannářské snahy rozšířeny také na horské oblasti s mozaikovitou krajinou a primárním bezlesím (*Fjeldsa et al. 2004; Bergl et al. 2007; Reif 2007; Tropek et Konvička 2010*).

3.6. Vliv klimatických změn v období čtvrtohor

Horské i nížinné lesy Guinejského zálivu jsou známé jako důležité centrum Africké biodiverzity a je pravděpodobné, že obě tyto lokality představovaly refugia

tropického lesa během Plio-Pleistoceního období, kdy byla sub-Saharská Afrika prokazatelně cyklicky aridnější, než v současnosti (*Fjeldsa et Lovett 1997; Brooks et al. 2002*). Jedním z takových refugií byl i region zahrnující hory Guinejského zálivu a i díky svému relativně stabilnímu prostředí po tisíce, ne-li desetitisíce let (*Fjeldsa et Lovett 1997; Maley 1998*) se stal významnou oblastí druhového bohatství a endemismu (*Myers et al. 2000*). Ovšem i přes relativní klimatickou stabilitu regionu, se zde projevil vliv glaciálních výkyvů klimatu (*Maley et Brenec 1998; Zimkus 2009; Missoup et al. 2012*). Během období posledního glaciálního maxima, které je prostudováno již relativně dobře, došlo k úbytku srážek v důsledku snížení teplot a rozšíření dnešních horských biotopů do nižších nadmořských výšek (*Maley et Brenec 1998*). Díky tomu se horské dřeviny rozšířily do dnešních oblastí nížinného lesa, a došlo i k výraznému zvětšení oblastí přirozeného horského bezlesí. Tím došlo k propojení do té doby izolovaných horských oblastí a velmi pravděpodobně i rozšíření horských druhů do nových lokalit, či kontaktu izolovaných populací (*Smith et al. 2000*). Tento jev je významný zejména pro špatně dispergující skupiny organismů, jako jsou někteří drobní savci, obojživelníci, nebo některých skupin motýlů (*Zimkus 2009; Tropek et Konvička 2010; Missoup et al. 2012*). Po skončení glaciálního období došlo k opětovnému návratu horských ekosystémů do vyšších nadmořských výšek a s tím spojenou opětovnou izolaci jednotlivých suboblastí. Tím vznikly ekologické ostrovy, které se dále vyvíjely samostatně (*Myers et al. 2000; Zimkus et Gvozdík 2013*).

3.7. Biogeografie

Vlastnosti organismů úzce reflektují specifickou historii prostředí, ve kterém se vyskytují. To platí zvláště silně pro druhy s malým areálem rozšíření, které se vyvinuly tak, že jsou schopni přežít jen díky specifickým podmínkám jejich přirozeného prostředí. Proto historický vývoj, vlastnosti a stanovištní nároky endemických druhů mohou poskytnout cenné informace, použitelné k odvození historického vývoje určité oblasti. Tento přístup je použitelný obzvláště dobře pro ostrovní biotu, včetně druhů z izolovaných horských lokalit, protože ostrovní endemické druhy nemohou uniknout nepříznivým vlivům prostředí a takovéto vlivy trvale ovlivní vývoj jejich populace (*Fattorini 2007; Tropek et Konvička 2010*).

Pohoří Guinejského zálivu je domovem celé řady takových druhů, endemických pro tento region s mnohdy velmi úzce vymezeným areálem rozšíření (Bergl et al. 2007; Zimkus et Gvoždík 2013), který je navíc značně izolován od ostatních horských oblastí Afrického kontinentu (Fattorini 2007; Tropek et Konvička 2010). Tato izolace je způsobena ca 1500 km širokým pásem nížinného lesa dělícím je od nejbližších východoafrických hor a ca 1500 km širokým pásem nížinné savany mezi nimi a Guinejskou vysočinou na západě (Graham et al. 2005; Fattorini 2007). Poznáme-li tedy vývoj zdejší bioty, můžeme získat mnoho užitečných informací o historii této oblasti, či poznatky klíčové pro ochranu přírody.

V současnosti jsou nejlépe prozkoumanou skupinou živočichů pohoří Guinejského zálivu ptáci (Graham et al. 2005; Bergl et al. 2007; Sedláček et al. 2007). Kromě nich je relativně dobře prozkoumaná také fauna drobných savců (Missoup et al. 2012), motýlů (Larsen 2005; Tropek et Konvička 2010), obojživelníků a plazů (Jesus et al. 2007; Zimkus 2009; Zimkus et Gvoždík 2013).

Ptákům se věnovali Graham et al. (2005), kteří se ve své studii zabývali současnými a historickými faktory ovlivňujícími strukturu zdejších horských společenstev. Zaměřili se na ptačí druhy s areálem výskytu nad 1200 m. n. m., jež pro potřeby studie rozdělili do tří kategorií: horské druhy s širším rozšířením (53 druhů), horské druhy endemické pro hory Guinejského zálivu (22 druhů) a horské endemické poddruhy, jejichž příbuzní se vyskytují v jiných horských oblastech Afriky (68 poddruhů). Z této studie je patrné, že nejvyšší biodiverzitu horských ptáků v rámci celého pohoří najdeme na jihozápadě, přičemž nejvýznamějšími lokalitami jsou Mt. Cameroon, Mt. Manengouba a ostrov Bioko. To je podle autorů způsobeno tím, že tyto lokality se nacházejí blíže k rovníku, což přináší zvýšené srážky, vyšší primární produkci a větší klimatickou stabilitu. Výskyt velkého množství endemických druhů a poddruhů na Mt. Cameroon a ostrově Bioko je pak zřejmě způsoben větší izolovaností od ostatních částí pohoří Guinejského zálivu.

Jinou studii provedli Smith et al. (2000), kteří se zabývali srovnáním fylogeografické struktury dvou ptačích druhů bulbula horského (*Andropadus tephrolaemus*) a strdimila kamerunského (*Nectarinia oritis*) na šesti horských lokalitách v Kamerunu a na ostrově Bioko. Studované druhy byly vybrány tak, aby jejich ekologické nároky a rozšíření nebyly zcela totožné. *A. tephrolaemus* je druh,

vyskytující se v horském lese nad 1500 m n. m. a je známý z mnoha horských oblastí západní Afriky (Roy 1997). *N. oritis* je oproti tomu endemickým druhem pohoří Guinejského zálivu a jde o sedentární druh obývající nižší vegetační patra zapojeného horského lesa (Mackworth-Praed et Grant 1973). Na základě analýzy mitochondriálních genů z krve jedinců odchycených na šesti různých lokalitách jsou populace studovaných druhů rozděleny do třech biogeografických oblastí: 1. Bioko, 2. Mt. Cameroon a 3. Ostatní hory ve střední a severní části studovaného území (Mt. Kupe, Mt. Oku, Bakossi Mountains a Tchabal Mbabo). Genetická odlišnost ptačích populací jednotlivých oblastí je způsobena dlouhodobou izolovaností. Například Mt. Cameroon a Mt. Kupe, nejsou příliš vzdálené vrcholy, ale díky absenci biokoridorů horského lesa je mezi těmito lokalitami migrace druhů významně omezena. Podobná situace je v současnosti k vidění i mezi populacemi na Mt. Cameroonu a ostrově Bioko. Bioko se oddělilo od pevniny během Pleistocénu (Worobey et al. 2010) a dá se předpokládat, že ptačí populace na Bioku a Mt. Cameroonu se v této době alopatricky odlišily (Smith et al. 2000).

Další skupina, jejíž fylogenetická struktura je v cílové oblasti dobře zmapována, jsou drobní savci. Missoup et al. (2012) porovnali dva mitochondriální geny, dva jaderné geny a kranio-metrická data, aby otestovali systematické zařazení a fylogenetickou příbuznost tří druhů drobných hlodavců rodu *Praomys* (*P. hartwigi*, *P. morio*, *P. obscurus*), endemických pro pohoří Guinejského zálivu. Rod *Praomys* zahrnuje asi 16 druhů, rozdělených do pěti komplexů (Musser et Carleton 2005). Zkoumané druhy patří do komplexu *P. tullbergi*, který zahrnuje ještě čtyři další druhy, obývající jiné části Afriky (Musser et Carleton 2005). Co se rozšíření cílových druhů týká, tak *P. morio* je znám pouze z Mt. Cameroon a z ostrova Bioko, *P. hartwigi* byl zaznamenán na Mt. Oku, Mt. Muanenguba, Bamboutos Mts., Mt. Lefo a Bambilli a *P. obscurus* obývá horské oblasti jihovýchodní Nigérie (Mambilla Plateau a Gotel Mts.). Výzkum v této studii potvrzuje, že *P. hartwigi* a *P. morio* jsou samostatnými druhy a dále mapuje vztah mezi populacemi *P. morio* z ostrova Bioko a z Mt. Cameroonu. Tato studie rovněž odhaluje, že mezidruhová procentuální sekvenční rozmanitost mezi *P. hartwigi* a *P. obscurus* je dvakrát nižší, než mezi jinými dvojicemi sesterských druhů. Uvádí ovšem, že výsledky mohou být ovlivněny tím, že vzorky, které byly zpracovány, od *P. hartwigi* pocházejí z Mt. Oku a v případě *P. obscurus* z Gotel Mts, mezi nimiž je vzdálenost pouze asi 80 km a bylo

by tedy potřeba výzkum rozšířit na celý areál rozšíření obou druhů. Autoři dále odhadují, že oba horské druhy, tedy *P. hartwigi* a *P. morio* jsou pravděpodobně bazálními druhy v rámci komplexu *P. tullbergi*. Podle závěrů *Missoup et al.* (2012) se zdá, že *P. tullbergi* komplex se objevil ve čtvrtohorách, během posledních dvou a půl milionu let, ovšem na potvrzení této hypotézy je potřeba provést ještě další výzkum. Tato studie dále zdůrazňuje roli glaciálních a interglaciálních period a s tím spojené fluktuace lesních habitatů v průběhu celého pleistocénu (*de Menocal 2004*). Molekulární data ukazují, že předci *P. hartwigi* a *P. obscurus* byly v kontaktu před 1 milionem let a pak se tyto populace alopaticky rozdělili. Dále se zdá, že fylogenetický výzkum u populace *P. morio* z Mt Cameroon a ostrova Bioko potvrzuje, že tento ostrov byl připojen k pevnině během Pleistocénu (*Lee et al. 1994*) a obě populace se rozdělili poměrně nedávno, před méně než 0,7 milionu let po alopatickém rozdělení horského lesa a zvýšení mořské hladiny, které mělo za následek izolaci Bioka od pevniny.

Fylogenetickou analýzu, která ukazuje, význam horských oblastí pohoří Guinejského zálivu jako centrum druhové rozmanitosti a dále dokumentuje, jakou roli hrají klimatické změny ve vývoji populací živočichů, endemických pro izolované horské oblasti provedla *Zimkus* (2009) a v pozdější studii *Zimkus et Gvoždík* (2013) výsledky z první práce rozšířila a upřesnila. V těchto studiích jsou zkoumány žáby rodu *Phrynobatrachus*. Obojživelníci jsou obecně velmi vhodnou skupinou živočichů pro rekonstrukci historie biodiverzity, protože jejich schopnost šířit se a adaptovat je oproti jiným skupinám obratlovců značně omezená (*Hofer et al. 1999*). K tomuto jevu se přidružuje výrazná stratifikace druhů podle nadmořské výšky (*Zimkus 2009*). Proto je možné zástupce nížinných druhů z rodu *Phrynobatrachus*, vyskytujících se v rámci pohoří Guinejského zálivu do 900 m n. m., nalézt pouze vzácně v podhorských lokalitách a naopak horské druhy prakticky nesestupují do nížin (*Hofer et al. 1999*). Molekulární analýza několika genů nížinného druhu *P. cornutus*, provedená *Zimkusem* (2009) odhalila, že populace z jihozápadního Kamerunu jsou příbuznější populacím z ostrova Bioko, než populacím z východních oblastí na pevnině. Tento fakt potvrzuje hypotézu, založenou na geologickém průzkumu, že Bioko bylo připojeno k Africkému kontinentu ještě přes asi 10 000 lety (*Juste et Ibañez 1993*). Z výsledků studie *Zimkus* (2009) a *Zimkus et Gvoždík* (2013) také vyplývá, že fylogenetické analýzy, provedené na třinácti druzích potvrzují

monofyletický původ všech horských a podhorských druhů, obývajících pohoří Guinejského zálivu, společně s jedním nížinným druhem *P. batesii*. Nejbližším příbuzným této vývojové větve je *P. africanus*, známý z Kamerunu, Rovníkové Guineje, Gabonu, Konga a Středoafričké Republiky. *Zimkus et Gvoždík* (2013) navíc zjistili, že centrální části pohoří Guinejského zálivu, tedy Bamenda-Banso Highlands, které zahrnuje Bamboutos Mts., Mt. Lefo, Mt. Mbam a Mt. Oku, spolu s oblastmi, které tyto vrcholy spojují, jako historicky původní areál výskytu žab rodu *Phrynobatrachus*, přičemž předek dnes známých horských druhů pocházel z výše položených oblastí tohoto regionu. Během následné radiace tento předek nejprve sestoupil do nížinných oblastí, kde se rozštěpil do dvou linií, z nichž se jedna dále šířila v nížinách a druhá rekolonizovala horské oblasti. Po diverzifikaci nížinných druhů, nastala ještě jedna vlna kolonizace horských oblastí a není vyloučeno, že takových vln bylo více. Datové odhady naznačují, že se tento rod vyvinul někde v oblasti Bamenda-Banso Highlands v raném Miocénu před asi 22 miliony let, během období bohaté vulkanické aktivity v tomto regionu (*Marzoli et al. 2000*). K hlavní diverzifikaci pak došlo během Pliocénu a Pleistocénu před méně než 5,3 milionu let, což naznačuje, jak významnou roli hrály glaciální cykly ve tvarování vnitrodruhové genetické struktury a prostorovém rozšíření druhů.

Maley et Brenec (1998) analyzovali pylová zrna ze sedimentů jezera Barombi Mbo a na základě toho rekonstruovali biogeografický vývoj lesů západního Kamerunu v posledních 28 000 letech. K rekonstrukci historického vývoje lesa používají modelové taxony *Olea capensis* a rod *Podocarpus*. Pouze jediný druh *Podocarpus latifolius* roste v jižním Kamerunu a na několika horách středoatlantického regionu (Zaire, Angola, Kongo) (*Maley et al. 1990*). V blízkosti jezera Barombi Mbo je nejbližší výskyt znám v nejvyšších oblastech Mt. Kupe (25 km severovýchodně), ale nikdy nebyl nalezen na Mt. Cameroon (35 km jižně) ani Rumpi Hills (20 km severozápadně) (*Cable 1993; Thomas 1993*). *O. capensis* roste na Mt. Cameroon, ale ne na Mt. Kupe ani Rumpi Hills. Nicméně tyto dva druhy se v jižním Kamerunu občas vyskytují na jedné lokalitě zároveň, například na Mt. Ngoro, nebo Mt. Oku (*Maley et Brenec 1998*). Pokud jde o současnou ekologii těchto dvou druhů, tak data z Kamerunu i jiných hor tropické Afriky ukazují, že rostou hlavně v mlžných lesích (*White 1981*), přičemž *O. capensis* v sušších biotopech než *P. latifolius* (*Hamilton et Perrott 1981*). Pro tyto lokality je typickým

klimatickým jevem zvýšená oblačnost. Tyto mraky se často stávají mlhou a mnohdy nezpůsobují dešť, nebo vyvolávají pouze mrholení, ale jejich relativně stálá přítomnost způsobuje dlouhodobé snižování teploty vzduchu (*Maley et Elenga 1993*). Vývoj podobných horských vegetací je tedy výrazně spojen s tímto chladícím efektem (*Maley et Brenec 1998*). *Maley et Brenec (1998)* dále zdokumentovali velký nárůst výskytu pylových zrn horských druhů v sedimentech pocházejících z období chladnějších klimatických fází. Tento nárůst je pravděpodobně spojen s rozšířením areálu výskytu horských druhů do nížin během posledního glaciálního maxima před 26 000 až 19 000 lety. V dnešní době je možné nalézt zbytkové rozšíření horských druhů v oblastech mezi 300 až 800 m n. m. v jižním Kamerunu a dalších zemích (*Maley et al. 1990; White 1981*). Všechny tyto výskyty jsou reliktní oblasti korespondující s někdejší významným rozšířením horských druhů do nižších nadmořských výšek během sušších a chladnějších period (*White 1981; Maley 1996*).

Fylogeografickou studii afromontánního druhu *Prunus africana* zpracoval *Kadu et al. (2011)*. V této studii zkoumali sedm chloroplastových genů 582 jedinců z 32 populací napříč Afrikou. Zjistili genetickou provázanost populací jižní a východní Afriky a blízkou příbuznost populací západní Afriky a západní Ugandy, což naznačuje přítomnost někdejšího koridoru mezi východní a západní Afrikou. Předpokládá se, že rod *Prunus* má Laurasijský původ a během Pleistocénu kolonizoval Africkou desku přes Arabský poloostrov. Tuto domněnku ovšem není možné v současné době potvrdit, protože *Prunus africana* se na Arabském poloostrově v současné době nevyskytuje a paleobotanická studie v současnosti neexistuje. Co se týče vývoje populací na Africkém kontinentu, tak první populace, která se oddělila, byla populace na Madagaskaru, která je geneticky nejvíce rozdílná. Druhé odštěpení představuje osamostatnění populace západní Afriky, které mohlo nastat jen díky tomu, že historický areál rozšíření zaujímal i oblasti v centrální Africe, kde se ovšem žádné recentní populace nedochovaly (*Hall et al. 2000*). Tato kolonizační vlna napříč Afrikou, může mít spojitost s glaciálními výkyvy teplot, kdy byla horská flóra stlačena do nižších nadmořských výšek a je možné, že v této době vznikly vegetační pásy, spojující východní a západní Afriku (*Moreau 1966*). Přibližně ve stejné době docházelo také k rozšiřování populací podél Velké příkopové propadliny. Obě tyto kolonizační vlny pravděpodobně probíhaly v chladných klimatických obdobích čtvrtohor.

4. METODIKA

4.1. Popis druhu

Studovaným druhem v této práci byl *Bicyclus anisops* (Karsch 1892).

třída: *Insecta* – hmyz

řád: *Lepidoptera* – motýli

čeleď: *Nymphalidae* – babočkovití

4.1.1. Rod *Bicyclus*

Rod *Bicyclus* je velký rod zahrnující okolo 85 druhů, z nichž v západní Africe je možné potkat 50 z nich. Co se zbarvení týká, tak horní strana křídel všech druhů celého rodu je hnědá s několika skvrnami ve tvaru oka. Spodní strana mívá několik odstínů od černohnědé k takřka sytě šedé a s jasnou tenkou linkou přibližně vprostřed křídla. Vždy se vyskytují plně ohraničené kruhové skvrny poblíž okraje křídla na spodním křídle a minimálně dvě na křídle vrchním. Všichni samci mají androgenní orgány, které jsou ve velké míře významné jako jednoznačný určovací znak. Sexuální dimorfismus je poměrně silný. Samice bývají obvykle přidruženy sympatrickým samcům. Mnoho druhů se vyznačuje značnou sezónní variabilitou, kdy jindy nápadné skvrny na spodní straně jsou během suchých období více, či méně potlačeny. Zdá se také, že během období sucha se vyskytuje značná převaha samic. Co se týče stanovištních nároků, je rod rozdělen na tři hlavní ekologické skupiny. Většinou jde o lesní motýly, několik druhů ale obývá savany a jiné druhy jsou horské. Celý rod poměrně špatně létá a jen vzácně je možné vidět některého jedince výše než metr až dva nad zemí. Jedinou výjimkou je *B. xeneas*, který se dá nalézt v pastech zavěšených v deseti i více metrech (Larsen 2005). Podle fylogenetického výzkumu na základě analýzy DNA se zdá, že rod *Bicyclus* se osamostatnil od nejbližších příbuzných někdy v období před 15 až 20 miliony lety (Monteiro et Pierce 2001).

4.1.2. *Bicyclus anisops*

Popis:

Délka předního křídla je 20 mm. Horní strana je tmavá, černohnědá. Na předním křídle se vyskytují dvě skvrny a na zadním křídle několik menších skvrn ve tvaru oka, které mají na spodní straně červené obkruží, nevyskytující se u žádného jiného druhu tohoto rodu. Okraj zadních křídel je vlnitý. Napříč všemi čtyřmi křídly probíhá úzká bílá linie. Sezónní variabilita je zřejmě zanedbatelná, ale podrobná studie zatím chybí (Larsen 2005).

Habitat a rozšíření:

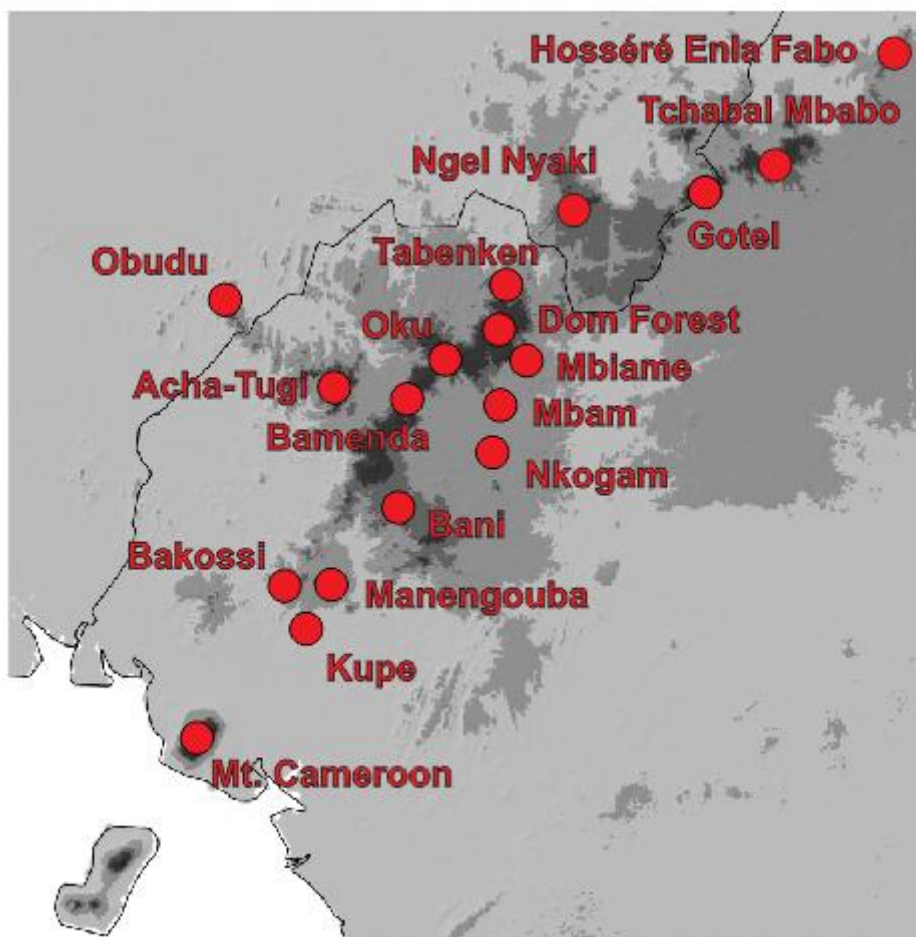
Jde o motýla endemického pro hory východní Nigérie a západního Kamerunu, kde je široce rozšířen s výjimkou Bioka a severní části pohoří (Alantika Mts., Jos Plateau a Mandara Mts.). Obývá okraje lesa, mozaikovitou krajinu, křoviny a horské bezlesí vnitrozemské části pohoří Guinejského zálivu v nadmořských výškách nad přibližně 1300 m n. m., s optimem mezi 1700 a 2200 m n. m. (Tropek, pers. com.). Jde o vikariantní druh s nejbližším příbuzným (*B. dentatus* Sharpe, 1898) vyskytujícím se v horách v oblasti Velké příkopové propadliny. Hostitelskou rostlinou larválního stádia jsou s největší pravděpodobností rostliny spadající do čeledi *Poaceae* – lipnicovité (Larsen 2005; Tropek et Konvička 2010). Tropek et Konvička (2010) zkoumali jeho stanovištní preference a z výsledků je patrná výrazná preference pro křoviny a řídké lesní okraje s vegetací vysokou od 0,2 do 10 m.

4.2. Sběr materiálu

Sběr převážné části materiálu byl proveden R. Tropkem, P. Janštou a D. Leštinou během terénních expedic, v letech 2009–2012. Během tohoto období bylo navštíveno 18 lokalit s výskytem *B. anisops*. Na každé lokalitě bylo odchyceno 5 jedinců (s výjimkou Hosséré Enla Fabo, kde je druh extrémně vzácný), vzorky tkáně (převážně hrudní svalovina) byl na místě konzervovány v 96,6% bioethanolu. Po převezení do ČR byly tkáňové vzorky dále uchovávány při teplotě -20 °C. Materiál z nigerijských lokalit (Obudu Plateau a Ngel Nyaki) byl získán od Dr. Oskara Brattströma (University of Cambridge), sbírán a konzervován byl stejným způsobem jako materiál z Kamerunu.

Jako outgroupy byly použity sekvence druhů *Bicyclus dentatus*, *B. dubia*, *B. angulosa* a *Melanitis leda*, jejichž sekvence byly získány z databáze GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.2.1. Přehled lokalit



Obr. 2: Přehled lokalit, ze kterých pocházejí vzorky zpracované v této práci, na mapě pohoří Guinejského zálivu. Červené body znázorňují orientační polohu lokalit.

1. Mt. Cameroon, JZ provincie. Relativně velmi izolovaný aktivní vulkán na břehu moře s horskými partiemi krytými mozaikou převážně primárního a sekundárního lesa. Materiál byl sbírán na dvou místech: Mann's Spring (N 4,1444 °, E 9,1207 °) a Musake Hut (N 4,1725 °, E 9,2134 °).

2. Bakossi Mts., JZ provincie, vesnice Njimbeng (N 5,0508 °, E 9,5672 °). Relativně nižší, ale rozlehlá horská oblast s několika vrcholy přesahujícími 2000 m.n.m. Lokalita v blízkosti vesnice Njimbeng je pokryta souvislým horským lesem.

3. Mt. Kupe, JZ provincie, vesnice Nyassosso (N 4,8070 °, E 9,7084 °). Izolovaný žulový blok pokrytý souvislým primárním lesem s několika drobnými enklávami přirozených travnatých porostů a křovin na nejvyšších vrcholech.

4. Mt. Manengouba, JZ provincie (N 5,0384 °, E 9,8270 °). Vulkanický masiv s biotopy silně poškozenými především intenzivní pastvou. Zbytkový horský les stále ještě místy zaujímá relativně velké plochy a je doplněn druhově bohatými křovinami. Velké části jsou ovšem pokryty velmi degradovanými, druhově chudými trávničky.

5. Acha-Tugi, JZ provincie, vesnice Tugi (N 6,0576 °, E 9,9160 °). Poměrně izolovaný horský hřeben s relativně velmi degradovanou krajinou. Zbytky degradovaného horského lesa se nacházejí pouze podél potoků a v hlubokých údolích.

6. Mt. Bani, Z provincie, vesnice Bani (N 5,3707 °, E 10,1712 °). Přelidněná oblast s mozaikou vesnic, polí, plantáží eukalyptů a trávníků s různou měrou degradace. Horský les je omezen do několika malých degradovaných zbytků.

7. Bamenda, SZ provincie (N 6,0902 °, E 10,2947 °). Mozaikovitá krajina, s vcelku velkými plochami, zbytkového, ale dobře zachovalého horského lesa. Odchyt motýlů se konal na území mezi vesnicí Big Banaki, vrcholem Mt. Lefo a kráterem Mbi.

8. Mt. Oku, SZ provincie, les Killum-Idjim (N 6,1993 °, E 10,5159 °). Největší souvislý horský les v oblasti Bamenda Highlands. Velké kontinuální plochy lesa jsou doplněny více otevřenými křovinatými habitaty a malými plochami trávníků a planází.

9. Mbiame forest, SZ provincie, město Mbiame (N 6,2080 °, E 10,8219 °). Silně izolované a zachovalé plochy primárního horského lesa s různě degradovanou mozaikou křovin a trávníků na okrajích.

10. Dom forest, SZ provincie, vesnice Dom (N 6,3570 °, E 10,6088 °). Poměrně dobře zachovalá mozaikovitá krajina zahrnující větší zbytky horského lesa, druhově bohaté křoviny, trávníky a menší plochy polí.

11. Mt. Tabenken, SZ provincie, vesnice Mbwat (N 6,5072 °, E 10,7517 °). Izolovaný horský les na úbočí hory Tabenken, obklopený různě degradovanými trávníky a plantážemi.

12. Mbam Massif, Z provincie, vesnice Koutoupi (N 5,9747 °, E 10,7213 °). Izolovaná hora s mozaikou stanovišť zahrnující zbytky horského lesa podél vodních toků a v hlubokých údolích a relativně degradovanými otevřenými habitaty.

13. Nkogam Massif, Z provincie, farma Nkounden (N 5,7357 °, E 10,6695 °). Izolovaný masiv s velmi degradovanou krajinou, pokrytou z převážné většiny druhově chudými trávníky doplněnými drobnými enklávami druhově bohatých křovin a zbytky degradovaného lesa.

14. Tchabal Gandoua (Gotel Mts.), nigerijsko-kamerunská hranice (N 7,0290 °, E 11,7028 °). Horský hřeben, pokrytý mozaikou silně degradovaných pastvin, doplněných zbytky křovinatých společenstev na Kamerunské straně hranice a různě zachovalého lesa na Nigérijské straně hranice.

15. Tchabal Mbabo, provincie Adamawa, vesnice Fungoy (N 7,2243 °, E 12,0565 °). Mozaikovitá krajina s velkými oblastmi poměrně degradovaného lesa, doplněného křovinami a pastvinami.

16. Hosséré Enla Fabo, provincie Adamawa, vesnice Gadjiwan (N 7,7561 °, E 12,4426 °). Nejsevernější známý výskyt *B. anisops*, tato lokalita je již na okraji pásu afrických savan. Jde o sušší oblast, se zbytky lesa obklopenými suchými trávníky.

17. Obudu Plateau, JV provincie, stát Cross-River, Nigérie. Relativně izolovaný nerozsáhlý (ca 100 km²) hřeben s nejvyšším vrcholem 1716 m n. m. Celá oblast je velmi intenzivně zemědělsky využívána a přirozené biotopy ustoupily do posledních malých fragmentů v nepřístupných údolích. Jde o lokalitu s nejvyšší známou diverzitou denních motýlů z celého pohoří (*Larsen 2005*).

18. Ngel Nyaki, JV provincie, vesnice Yelwa, Nigérie (N 7,05 °, E 11,04 °). Nadmořská výška se pohybuje od 1400 do 1600 m n. m. Oblast je hustě osídlená, tropické suché a horské lesy jsou fragmentovány na ploše přibližně 7,5 km², které jsou součástí relativně zachovalé rezervace.

4.3. Laboratorní analýza

4.3.1. Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna za pomoci komerčního kitu Qiagen (QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit). Tkáňové vzorky byly uskladněny odděleně v mikrozkuvkách s laboratorním bio-ethanolem o garantované čistotě 96,6 %. Jako vzorek byla použita nejčastěji část tkáně z hrudníku, případně končetina. Vzorek byl vyjmut pinzetou a následně byla odstřižena část vzorku určená pro izolaci DNA. Tato část byla usušena na buničině. Zbytek tkáně byl navrácen do mikrozkuvky a zachován jako záložní zdroj DNA. Po usušení byl vzorek přenesen do nové předem připravené mikrozkuvky. Zde byl homogenizován za pomoci mikronůžek a v souladu s návodem bylo připipetováno 180 µl bufru ATL a 20 µl enzymu proteinasa K-solution. Vzniklá směs byla důkladně promíchána za použití vortexu a uložena do inkubátoru, kde byla ponechána při teplotě 56°C po dobu 6 hodin na inkubaci. Po uplynutí této lhůty bylo do mikrozkuvky připipetováno 200 µl bufru AT a 200 µl laboratorního lihu a po opětovném zvortexování, byl celý obsah mikrozkuvky kvantitativně převeden do kolonky s filtrem a centrifugován při 8000 otáčkách RPM po dobu jedné minuty. Poté byla část kolonky s filtrem předána do nově připravených rezervoárů. Do kolonky bylo připipetováno 500 µl promývacího bufru AW1 a centrifugováno při 8 000 otáčkách RPM rovněž jednu minutu. Poté byla kolonka s filtrem přemístěna do dalšího rezervoáru a tentokrát bylo připipetováno 500 µl bufru AW2. Následně došlo k další centrifugaci tentokrát při 14 000 otáčkách RPM po dobu tří minut. Poté byla kolonka s filtrem opatrně přimístěna do sterilní mikrozkuvky a na radu školitele bylo připipetováno 75 µl elučního bufru AE a centrifugováno při 8 000 otáčkách jednu minutu. Aby bylo docíleno maximální výtěžnosti DNA, byl celý proces zopakován. Tímto postupem bylo získáno 150 µl DNA rozpuštěné v bufru AE, která byla připravena k dalšímu použití.

4.3.2. PCR

PCR byla provedena za použití následujících primerů: COI - Ron F (GGA TCA CCT GAT ATA GCA TTC CC) a Hobbes R (AAA TGT TGN GGR AAA AAT GTT A) (Monteiro & Pierce 2001); COII - leCOII_2792fw (ATA CCT CGA CGT TAT TCA GA) a leCOII_3812rv (CAT TAG AAG TAA TTG CTA ATT TAC TA) (Brower 1994); ND1 - ND1 fw (TTC AAA CCG GTG TAA GCC AGG) a ND1 rv (AAG CAT TTG TTT TGA AAA CTT AAG) (Nylin et al. 2001). Jako reakční prostředí byla použita směs PCR H₂O a PPP Mastermix (Top-Bio). Na jednu reakci bylo použito 12,5 µl PPP Mastermix, 9,5 µl H₂O, 1 µl reverse primeru, 1 µl forward primeru a 1 µl DNA. Vzniklá směs o objemu 25 µl byla smíchána ve speciálních PCR stripech, promíchána a stočena na stolní centrifuze. Poté byly stripy s PCR reakční směsí umístěny do XP cycleru (Bioer), ve kterém byl spuštěn program pro multiplikaci genu.

PCR program: 2 minuty, počáteční denaturace při 94°C, následně 40 cyklů střídání 94°C (1 min), 51,5°C (1 min) a 72°C (1 min), po dokončení multiplikačního cyklu došlo k finální elongaci při 72°C po dobu 10 min a schlazení na 4°C. Výsledný PCR produkt byl zkontrolován pomocí agarózové gelové elektroforézy. Purifikace a následná sekvenace DNA byla provedena komerční firmou Macrogen, Inc. (Soul, Jižní Korea).

Testovali jsme také tři jaderné markery (EFalpha, ITS1, ITS2), všechny však byly vyřazeny kvůli praktick nulové informativní variabilitě.

4.3.3. Fylogenetické a populačně-genetické analýzy

Sekvence byly zkontrolovány, ořezány a byl vytvořen alignment (ClustalW alignment s defaultním nastavením) v programu Geneious. Alignments byly exportovány do formátu nexus. Samostatné analýzy byly provedeny pro konkatenát všech tří genů, pro každý gen samostatně (z důvodu nekompletního pokrytí sekvencí všech genů u všech analyzovaných jedinců) a pro konkatenát COI a COII (protože pokrytí těchto dvou genů bylo zdaleka nejvyšší). Sekvence budou uloženy do databáze GenBank během práce na finální publikaci.

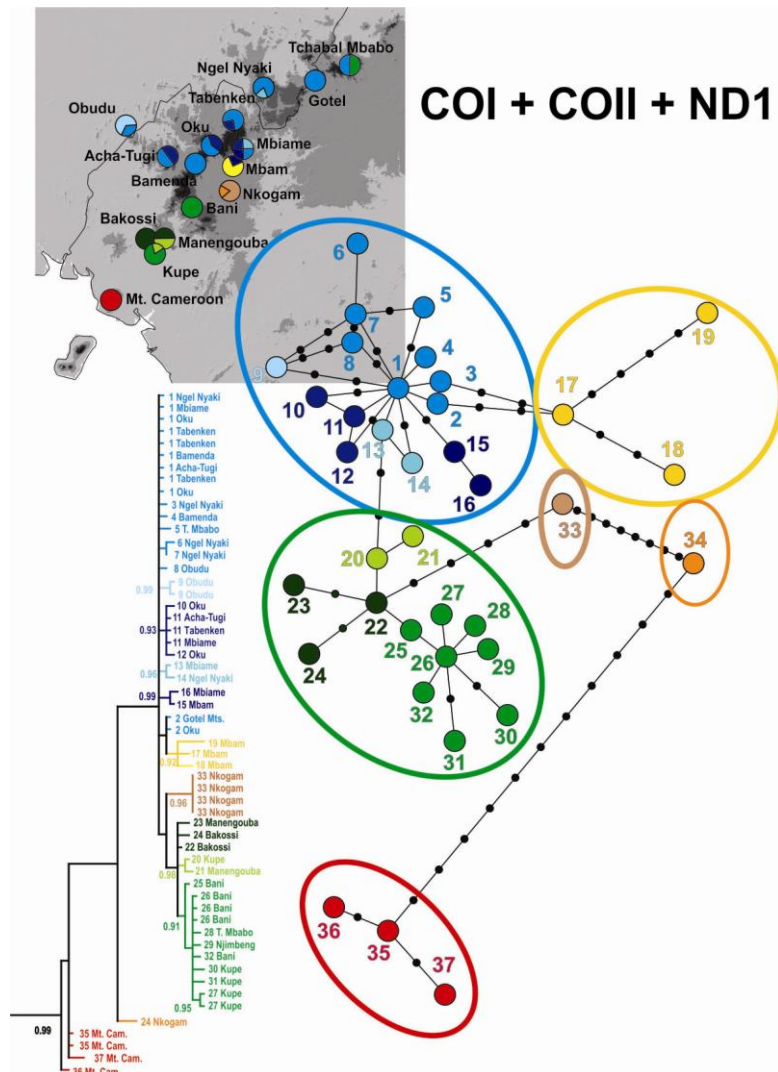
Rekonstrukce fylogenetických stromů byly provedeny bayesovským přístupem za použití programu MrBayes (*Ronquist et al. 2012*). Běh analýzy byl nastaven na 5 milionů generací za použití modelu předem navrženého programem jModeltest (*Darriba et al. 2012*). Výsledný strom byl získán tvorbou konsenzu s vyřazením prvních 25 % vzorkovaných stromů bayesovské analýzy. Podpory pro jednotlivé uzly stromu byly získány ve formě bayesovské posteriorní probability během tvorby konsenzu.

Pro rekonstrukci haplotypových sítí byly alignmenty uloženy ve formátu fasta, haplotypy byly identifikovány v programu DnaSP (*Librado et Rozas 2009*). Haplotypové sítě byly rekonstruovány v programu Arlequin (*Excoffier et Lischer 2010*) pomocí maximální parsimonie. Sítě byly vizualizovány v programu HapStar (*Teacher et Griffiths 2011*) a upraveny v CorelDraw X6 (*Corel Corporation 2012*).

5. VÝSLEDKY

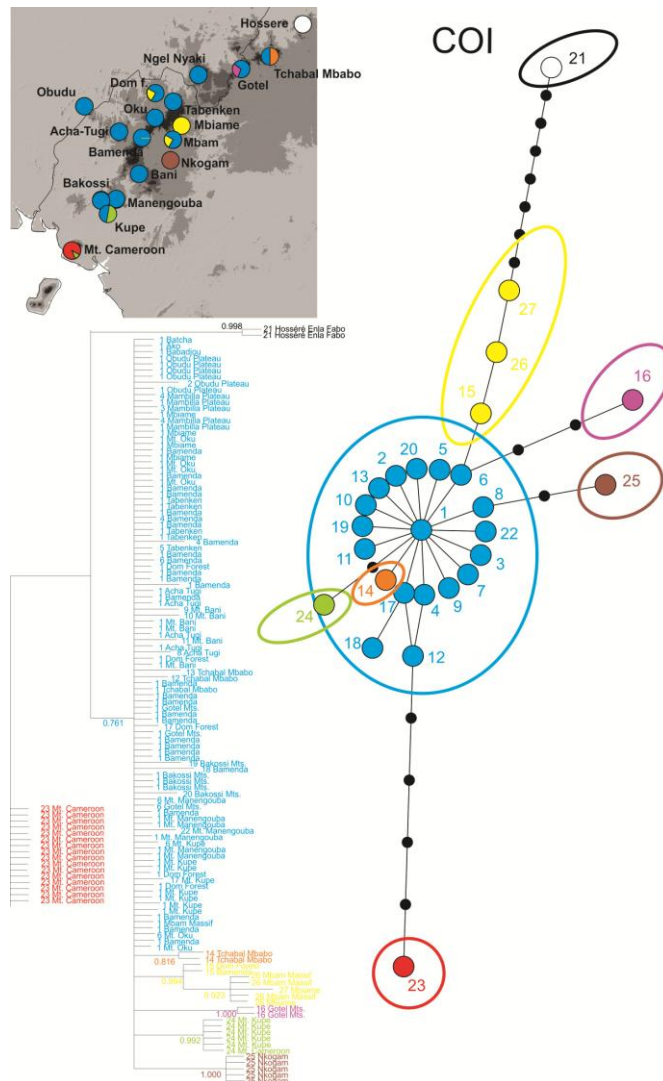
Celkem bylo osekvenováno 809 bp úsek COI (141 jedinců), 869 bp úsek COII (78 jedinců) a 753 bp úsek ND1 (65 jedinců). Variabilita ve studovaných genech byla relativně nízká.

Kladogram založený na konkatenátu všech genů (56 jedinců) odlišil některé studované populace, ale nevyřešil vztahy mezi nimi (Obr. 3). Haplotypové sítě rozdělily vzorky do šesti populací, které zhruba odpovídají podpořeným skupinám fylogenetickými stromy (Obr. 4,5,6,7). Většina těchto populací odpovídá geografii studované oblasti: 1. Mt. Cameroon, 2. Nkogam I, 3. Nkogam II, 4. Bakossi-Kupe-Manengouba-Bani, 5. Mbam, 6. Všechny ostatní lokality (tj. Bamenda-Banso Mts., Acha Tugi, Mbam, Ngel Nyaki, Gotel Mts.). Zajímavou výjimkou je lokalita Tchabal Mbabo s jedním haplotypem ze skupiny 6, což odpovídá i geografii, a jedním ze skupiny 4, z níž jsou všechny ostatní haplotypy ve velmi vzdálené oblasti.

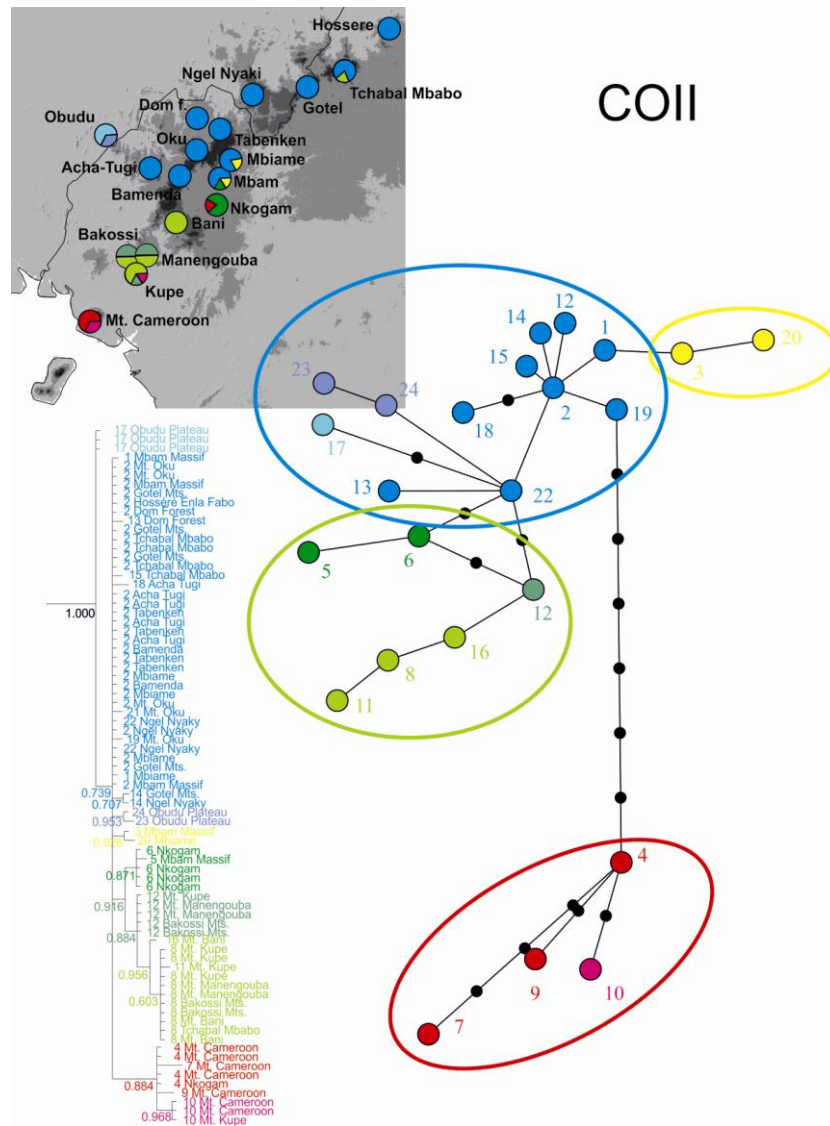


Obr. 3: Kladogram, haplotypová síť a mapa znázorňující distribuci šesti barevně odlišených haplotypových skupin rekonstruovaných na základě konkatenátu analýz genů COI, COII a ND1 u druhu *B. anisops* v rámci pohoří Guinejského zálivu. Na kladogramu je znázorněn vztah mezi jednotlivými haplotypy a lokalitami, rozdělené pro lepší přehlednost barevně. Kladogram rozděluje haplotypy do šesti skupin (čísla u jednotlivých větví kladogramu znázorňují statistickou průkaznost). Haplotypová síť naznačuje přítomnost stejných šesti haplotypových skupin, znázorněných velkými elipsami, nicméně s rozdílnými vzájemnými vztahy oproti kladogramu. Čísla u haplotypové síť znázorňují názvy jednotlivých haplotypů a síť čar představuje vztahy mezi nimi (Černé body mezi jednotlivými haplotypy znázorňují počet samostatných mutací, které proběhly v rámci diferenciace příslušných haplotypů). Na mapě jsou znázorněny lokality s poměrným zastoupením jednotlivých haplotypů.

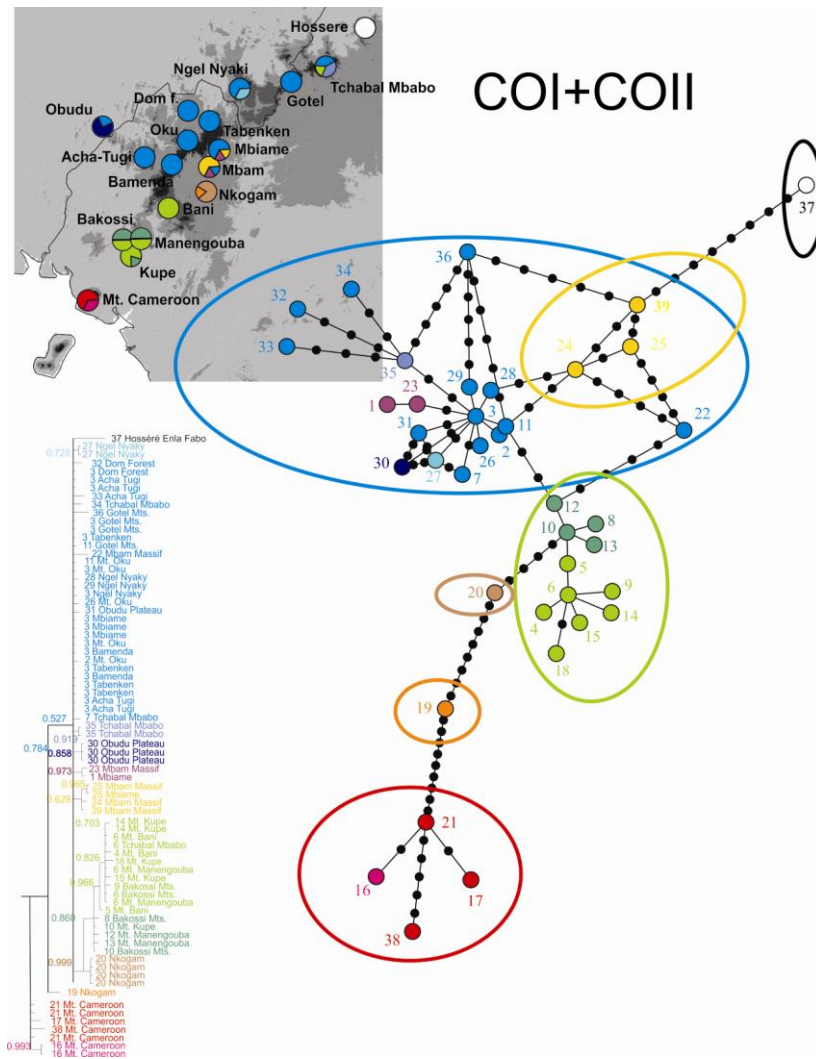
Samostatné analýzy jednotlivých genů výrazně doplňují analýzy konkatenátu o vzorky, u nichž se nepovedlo osekvenovat všechny tři geny. Tím se jednak zvýšil počet lokalit zastoupených v analýzách o Dom Forest a Hosséré Enla Fabo, jednak se zvýšil počet vzorků v některých zajímavých nebo problematických lokalitách. Fylogenetické analýzy vyřešily vztahy s dostatečnou podporou pouze u COII (Obr. 5), tam je však poměrně jasně vidět, že populace z Mt. Cameroon neležejí na bázi kladogramu, jak by naznačovala nepodpořená topografie kladogramu z konkatenátu všech třech genů. Jednotlivé skupiny podpořené fylogenetickými analýzami i detekovatelné v haplotypových sítích u COI (Obr. 4) i COII (Obr. 5) poměrně dobře odpovídají i výsledkům analýz konkatenátu. Skupiny vymezené haplotypy genu COII (Obr. 5) jsou téměř identické se skupinami z konkatenátu třech genů, lokality Hosséré Enla Fabo a Dom Forest měly haplotypy spadající do centrální skupiny haplotypů. Navíc jsou jasnější vazby populací z Mt. Cameroon k populacím na Mt. Kupé a Nkogam Massif. Analýzy COI ukazují výrazné oddělení vzorků z Hosséré Enla Fabo. Populace z Dom Forest má haplotypy patřící do hlavní skupiny haplotypů (tentokrát i včetně vzorků z Mt. Manengouby, Mt. Kupe, Bakossi Mts. a Mt. Bani) a do skupiny haplotypů z Mbam Massif a Mbiame. Jeden z haplotypů z Mt. Cameroon se vyskytuje i na Mt. Kupe. Opět se potvrdila výraznější odlišnost haplotypů z Nkogam Massif, odlišná je i část haplotypů z Gotel Mts. Gen ND1 ukázal velmi nízkou variabilitu, která byla dostačující pouze na odlišení populace z Mt. Cameroon od ostatních vzorků (Obr. 7). I díky tomu je významná analýza konkatenátu genů COI a COII (Obr. 6). Ta sice opět řadí vzorky z Mt. Cameroon na bázi kladogramu, ovšem s výrazně nižší podporou než samostatná analýza COI. Vztahy mezi haplotypy v rámci centrální části pohoří se po přidání vzorků, u nichž nebyly získány sekvence ND1 zkomplikovaly a již nelze s jistotou mluvit o jasně odlišitelných skupinách z Mbam a Mbiame a z centrální, západní a severní části pohoří, stále je však poměrně dobře vidět vzájemná blízká příbuznost populací z Mbam Massif a Mbiame. Dobře podpořené jsou však další skupiny z Hosséré Enla Fabo, Nkogam Massif, Mt. Cameroon a několika haplotypů z Bakossi Mts., Mt. Kupe, Mt. Manengouba a Mt. Bani.



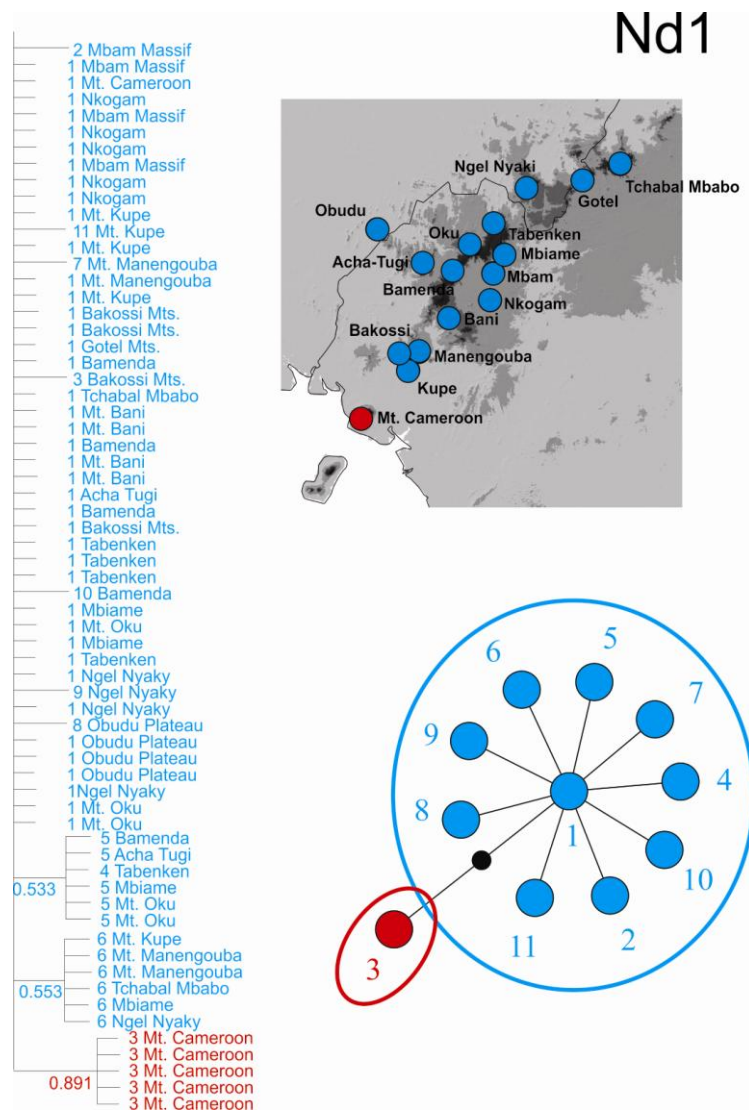
Obr. 4: Kladogram, haplotypová síť a mapa znázorňující distribuci osmi barevně odlišených haplotypových skupin rekonstruovaných na základě analýzy genu COI u druhu *B. anisops* v rámci pohoří Guinejského zálivu. Na kladogramu je znázorněn vztah mezi jednotlivými haplotypy a lokalitami, rozdělené pro lepší přehlednost barevně. Kladogram rozděluje haplotypy do osmi skupin (čísla u jednotlivých větví kladogramu znázorňují statistickou průkaznost). Haplotypová síť naznačuje přítomnost stejných osmi haplotypových skupin, znázorněných velkými elipsami, nicméně s rozdílnými vzájemnými vztahy oproti kladogramu. Čísla u haplotypové síti znázorňují názvy jednotlivých haplotypů a síť čar představuje vztahy mezi nimi (Černé body mezi jednotlivými haplotypy znázorňují počet samostatných mutací, které proběhly v rámci diferenciacce příslušných haplotypů). Na mapě jsou znázorněny lokality s poměrným zastoupením jednotlivých haplotypů.



Obr. 5: Kladogram, haplotypová síť a mapa znázorňující distribuci čtyř barevně odlišených haplotypových skupin rekonstruovaných na základě analýzy genu COII u druhu *B. anisops* v rámci pohoří Guinejského zálivu. Na kladogramu je znázorněn vztah mezi jednotlivými haplotypy a lokalitami, rozdělené pro lepší přehlednost barevně. Kladogram rozděluje haplotypy do čtyř skupin (čísla u jednotlivých větví kladogramu znázorňují statistickou průkaznost). Haplotypová síť naznačuje přítomnost stejných osmi haplotypových skupin, znázorněných velkými elipsami. Čísla u haplotypové sítě znázorňují názvy jednotlivých haplotypů a síť čar představuje vztahy mezi nimi (Černé body mezi jednotlivými haplotypy znázorňují počet samostatných mutací, které proběhly v rámci diferenciace příslušných haplotypů). Na mapě jsou znázorněny lokality s poměrným zastoupením jednotlivých haplotypů.



Obr. 6: Kladogram, haplotypová síť a mapa znázorňující distribuci sedmi barevně odlišených haplotypových skupin rekonstruovaných na základě konkatenátu analýz genů COI a COII u druhu *B. anisops* v rámci pohoří Guinejského zálivu. Na kladogramu je znázorňen vztah mezi jednotlivými haplotypy a lokalitami, rozdělené pro lepší přehlednost barevně. Kladogram rozděluje haplotypy do sedmi skupin (čísla u jednotlivých větví kladogramu znázorňují statistickou průkaznost). Haplotypová síť naznačuje přítomnost stejných sedmi haplotypových skupin, znázorněných velkými elipsami, nicméně s rozdílnými vzájemnými vztahy oproti kladogramu. Číslo u haplotypové sítě znázorňuje názvy jednotlivých haplotypů a síť čar představuje vztahy mezi nimi (Černé body mezi jednotlivými haplotypy znázorňují počet samostatných mutací, které proběhly v rámci diferenciace příslušných haplotypů). Na mapě jsou znázorněny lokality s poměrným zastoupením jednotlivých haplotypů.



Obr. 7: Kladogram, haplotypová síť a mapa znázorňující distribuci dvou barevně odlišených haplotypových skupin rekonstruovaných na základě konkatenátu analýz genů COI, COII a ND1 u druhu *B. anisops* v rámci pohoří Guinejského zálivu. Na kladogramu je znázorňen vztah mezi haplotypy a lokalitami, rozdělené pro lepší přehlednost barevně. Kladogram rozděluje haplotypy do dvou skupin (čísla u jednotlivých větví kladogramu znázorňují statistickou průkaznost). Haplotypová síť naznačuje přítomnost stejných dvou haplotypových skupin, znázorněných velkými elipsami. Čísla u haplotypové sítě znázorňují názvy jednotlivých haplotypů a síť čar představuje vztahy mezi nimi (Černý bod mezi jednotlivými haplotypy znázorňuje samostatnou mutaci, které proběhla v rámci diferenciacce příslušných haplotypů). Na mapě jsou znázorněny lokality se zobrazením barevného odlišení výskytu jednotlivých haplotypů.

6. DISKUSE

Variabilita ve studovaných genech byla relativně nízká, signál v jednotlivých genech však prakticky nebyl ve vzájemném rozporu, takže je i přesto možné rozlišit dvě relativně rozšířené skupiny haplotypů: 1/ „centrální populace“ zahrnující Bamenda-Banso Mts. (zejm. Bamenda, Oku, Dom, Tabenken), Acha-Tugi, Obudu Plateau, Ngel Nyaki, Gotel Mts a Tchabal Mbabo; a 2/ „jižní populace“ vyskytující se v Bakossi Mts., Mt. Kupe, Mt. Manengouba a Mt. Bani; a několik dalších dobře odlišitelných skupin haplotypů v okrajových částech areálu: 3/ Mt. Cameroon; 4/ Nkogam I; 5/ Nkogam II; 6/ Mbam a Mbiame; a 7/ Hosséré Enla Fabo (Obr. 3–7). Bohužel není zatím možné dostatečně spolehlivě rekonstruovat i vztahy mezi jednotlivými skupinami.

6.1. Fylogeografie a historie populací

Nejvíce geneticky odlišná se zdá být populace na Mt. Cameroon, která má relativně odlišné haplotypy u všech třech zkoumaných genů včetně málo variabilního ND1 (Obr. 6). Jeden z haplotypů COII zjištěný na Mt. Cameroon je sdílený s populací na Mt. Kupe, což svědčí o příbuznosti populací buď recentním kontaktem, nebo kolonizací z jedné lokality do druhé.

Přestože vztahy mezi jednotlivými skupinami haplotypů nejsou dostatečně rozřešeny použitými analýzami, nabízí se dvě hypotézy vztahů mezi populací na Mt. Cameroon a zbytkem areálu:

1/ *B. anisops* kolonizoval z populací na Mt. Cameroon zbytek oblasti, kde došlo později k radiaci populací.

2/ *B. anisops* kolonizoval z některé z populací ve zbytku areálu Mt. Cameroon, kde došlo působením kombinace silného bottleneck efektu a působením odlišných environmentálních faktorů k alopatrické divergenci.

Pro první hypotézu sice svědčí, že podle fylogenetických rekonstrukcí z konkatenátu všech třech genů, z konkatenátu COI a COII a ze samostatné analýzy COI se zdá, že populace na Mt. Cameroon je bazální. V žádné z těchto analýz však nebyly vztahy mezi hlavními uzly dostatečně spolehlivě podpořeny a může jít

o artefakt. Mt. Cameroon je navíc zdaleka nejmladší ze studovaných lokalit (1 milion let; *Déruelle et al. 2007*). Pro druhou hypotézu navíc svědčí, že jediná analýza s dostatečně podpořenými hlavními uzly (tj. COII) ukázala populace z Mt. Cameroon jako poměrně odvozené. Relativně malá velikost vhodného biotopu, často zmenšovaná vulkanickou činností (*Njome 2009*), také svědčí spíše pro druhotnou divergenci.

Relativně podobnou míru izolace lze vysledovat i u populací v Hosséré Enla Fabo a v Nkogam Massif (Obr. 3). V obou případech jde o relativně dobře izolované lokality. Obě se nacházejí na samé hranici rozšíření druhu, navíc jsou již v oblastech savan s výrazně sušším klimatem. Zejména v Hosséré Enla Fabo je *B. anisops* extrémně vzácný, odchytit se podařilo pouze dva jedince (*Tropek, pers. com.*).

6.2. Porovnání výsledků s jinými fylogeografickými studii

Po porovnání výsledků z této práce s autory, zabývajícími se fylogeografickými studii západoafrických hor, jsou zde patrné některé shody, ovšem i rozpory.

Smith et al. (2000) se zabývali srovnáním fylogeografické struktury dvou ptačích druhů (*A. tephrolaemus* a *N. oritis*) endemických na pohoří Guinejského zálivu. Podle jejich závěrů jsou populace těchto druhů separované do tří biogeografických oblastí: 1. ostrov Bioko 2. Mt. Cameroon 3. zbylé lokality (Mt. Kupe, Bakossi Mts., Mt. Oku, Tchabal Mbabo). V tomto případě se mnou zjištěné výsledky shodují v tom, že Mt. Cameroon je oblastí s unikátními populacemi ptáků i motýlů. Oproti výsledkům citované studie však analýza motýlů prokázala mnohem lepší rozlišovací schopnost mezi populacemi ve zbytku areálu. Zatímco u ptáků nebyly jednotlivé populace v rámci severnějších lokalit rozdílné, na základě mitochondriálních genů se populace *B. anisops* ze stejných lokalit rozdělily do dvou dobře podpořených částí (v tomto případě Mt. Kupe a Bakossi Mts.; Mt. Oku a Tabenken). Vysvětlují si to tím, že ptáci jsou oproti ostatním skupinám živočichů mnohem mobilnější a jejich migrace přes bariéry mezi jednotlivými lokalitami je pravděpodobnější než u relativně málo mobilního *B. anisops*.

Zimkus (2009) a Zimkus et Gvoždík (2013) ve svých studiích týkajících se žab rodu *Phrynobatrachus* odhalili velký význam Mt. Manengouba a Bamenda-Banso Highlands, přičemž nejdůležitějším centrem biodiverzity horských obojživelníků je v rámci celého pohoří Guinejského zálivu Mt. Oku s jezerem Oku, které představují jediný známý areál výskytu hned několika endemických druhů obojživelníků (*P. chukuchuku*, *P. njiomock*, *Xenopus longipes* a *Wolterstorffina chirioi*). Kromě těchto druhů se na Mt. Oku vyskytuje geneticky unikátní populace *P. steindachneri*. Význam lokality Mt. Manengouba je zase podmíněn přítomností endemického druhu *P. manengoubaensis*. V případě mnou studovaného motýla *B. anisops* nebyly populace žádné z těchto lokalit odlišné od okolních populací. Na druhou stranu je u okáce jasně viditelná odlišnost dvou skupin populací („centrální“ populace a „jižní“ populace), do kterých každá ze zmiňovaných lokalit patří. I přes relativně nízkou mobilitu *B. anisops* je disperzabilita tohoto motýla očividně vyšší než u žab, což způsobuje i praktickou nemožnost alopatrické divergence na tak malé škále, jaká byla zjištěna u žab rodu *Phrynobatrachus*.

Missoup et al. (2012) otestovali fylogenetickou příbuznost tří druhů drobných hlodavců rodu *Praomys*, endemických pro horské oblasti Guinejského zálivu. Z areálů jejich rozšíření vyplývají tři nejdůležitější oblasti 1. Mt. Cameroon a Bioko (*P. morio*) 2. Mt. Oku, Mt. Manengouba, Bamboutos Mts., Mt. Lefo a Bambilli (*P. hartwigi*) a 3. Mambilla Plateau a Gotel Mts. (*P. obscurus*). Výjimečnost populací z Mt. Cameroon je opět společná pro drobné savce i motýly. Hranice areálů výskytu fylogeneticky odlišných populací *P. hartwigi* a *P. obscurus* je ovšem oproti hranici areálu dvou hlavních skupin populací *B. anisops*, zasazena výrazně severněji. Je tedy možné, že bariéry mezi populacemi v centrální části pohoří, které jsou neprostupné pro motýly, nepředstavují takový problém pro migraci drobných savců, nebo že byla historie populací drobných savců ovlivněna jinými tlaky než populací *B. anisops*.

6.3. Aplikovatelnost výsledků pro ochranu přírody

Známe-li vnitrodruhové vztahy a míru izolovanosti jednotlivých populací, můžeme ochranářské snahy zaměřit na nejcennější oblasti z hlediska genetické variability druhu (Smith et al. 2000; Tropek et Konvička 2009; Zimkus 2009).

V případě této studie je možné z 18 zkoumaných lokalit vybrat takové, které reflektují maximální šíři genetické variability *B. anisops* a jsou proto z hlediska ochrany tohoto druhu nejvýznamnější. Zjištěno bylo sedm geneticky unikátních skupin haplotypů, přičemž pět představují populace vázané na jednu až dvě lokality a to 1. Mt. Cameroon, 2. Nkogam I, 3. Nkogam II, 4. Mbam Massif/Mbiame a 5. Hosséré Enla Fabo. Za předpokladu, že *B. anisops* je modelovým druhem pro endemické motýly (nebo i další skupiny), měl by být těmto lokalitám proto věnován prioritní zájem ochrany přírody. Z těchto lokalit je pouze Mt. Cameroon národním parkem a Mbiame oficiálním komunitním lesem, na ostatních lokalitách není v současnosti žádná ochrana ani plánována (www.wri.org), což je z hlediska ochrany tohoto druhu nežádoucí a bylo by třeba rozšířit plán územní ochrany přírody i na lokality Nkogam, Mbam Massif, Mbiame a Hosséré Enla Fabo.

Další dvě skupiny haplotypů jsou distribuovány na větším počtu lokalit, představují však větší část genetické diverzity celého druhu. V rámci těchto větších skupin můžeme vybrat takové lokality, které mají výraznější genetickou variabilitu. Takovými oblastmi jsou v rámci skupiny 5. Mt. Manengouba a Mt. Kupe a 6. Mbiame, Obudu a některá ze tří potenciálně geneticky stejně významných lokalit Acha Tugi, Mt. Oku a Tabenken. Na lokalitách Mt. Manengouba, Mt. Kupe a Bakossi jsou zřízeny rezervace (www.wri.org). Všechny tyto tři lokality ovšem představují stejnou haplotypovou skupinu a stávající síť rezervací tudíž opět neodpovídá potřebám ochrany *B. anisops*.

Aby bylo možné rozhodnout, která z lokalit Acha Tugi, Mt. Oku a Tabenken je ochranařsky významnější, je možné výsledky z této práce konfrontovat s ostatními autory, kteří prováděli podobný výzkum u jiných taxonů. Například *Zimkus* (2009) odhaluje jako nejvýznamější lokalitu z hlediska výskytu endemických obojživelníků Mt. Oku. Z tohoto důvodu je možné tuto lokalitu upřednostnit pro ochranu *B. anisops* na úkor Acha Tugi a Tabenken.

7. ZÁVĚR

- Celkem bylo osekvenováno 809 bp úsek COI (141 jedinců), 869 bp úsek COII (78 jedinců) a 753 bp úsek ND1 (65 jedinců). Variabilita ve studovaných genech byla relativně nízká.
- Fylogenetické analýzy odlišily 7 unikátních skupin haplotypů, ale dostatečně nevyřešily vztahy mezi nimi, což bohužel zamezuje věrohodným konfrontacím s geologickým vývojem oblasti. Skupiny popsané v této práci se s ostatními taxony shodují ve významu lokality Mt. Cameroon, ovšem nenacházejí průsečík s jinými taxony u unikátních linií na Nkogam a Mbam Massif.
- Z hlediska ochrany *B. anisops* v maximální šíři jeho genetické variability jsou nejvýznamějšími oblastmi výskytu Mt. Cameroon, Nkogam, Mbam Massif, Manengouba, Mt. Kupe, Mbiame, Obudu a Mt. Oku. Další oblast potenciálně významná pro ochranu druhu je Hosséré Enla Fabo, pro kterou ovšem nebyl získán dostatek studovaného materiálu.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Asiwaju, A. I. (ed.). (1985). *Partitioned Africans: Ethnic Relations Across Africa's International Boundaries, 1884–1984*. University of Lagos Press, Lagos, Nigeria.

Ayala, D., Costantini, C., Ose, K., Kamdem, G. C., Nkondjio, C. A., Agbor, J. P., Ambene, P. A., Fontenille, D. & Simard, F. (2009). Habitat suitability and ecological niche profile of major malaria vectors in Cameroon. *Malaria Journal*. 8, 307.

Bergl, R. A., Oates, J. F. & Fotso, R. (2007). Distribution and protected area coverage of endemic taxa in West Africa's Biafran forests and highlands. *Biological Conservation*. 134, 195–208.

Bergl, R. A. & Vigilant, L. (2007). Genetic analysis reveals population structure and recent migration within the highly fragmented range of the Cross River gorilla (*Gorilla gorilla diehli*). *Molecular Ecology* 16, 501–516.

Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonesca, G. A. B., Rylands, A. B., Konstant, W. R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G. & Hilton-Taylor, C. (2002). Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology*, 16, 909–923.

Brower, A. V. Z. (1994). Phylogeny of Heliconius Butterflies Inferred from Mitochondrial DNA Sequences (Lepidoptera: Nymphalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3, 159–174.

Burke, K. (1996). The African Plate. *South African Journal of Geology*, 99, 339–340.

Burke, K. (2001). Origin of the cameroon line of volcano-capped swells. *The Journal of Geology*, 109, 349–362.

Cable, S. (1993). A vegetative tree key for Mount Kupe, Cameroon. *Bach. Sci. Degree, Aberdeen Univ.*, 165 pp.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.

Déruelle, B., Moreau, C., Nkoumbou, C., Kambou, R., Lissom, J., Njonfang, E., Ghogumu, R. T. & Nono, A. (1991). The Cameroon Line: a review. *In* Kampunzu, A. B., and Lubala, R. T., eds. *Magmatism in extension structure settings: the Phanerozoic African Plate*. Berlin, Springer, p. 275–327.

Déruelle, B., Ngounouno, I. & Demaiffe, D. (2007). The ‘Cameroon Hot Line’ (CHL): A unique example of active alkaline intraplate structure in both oceanic and continental lithospheres. *Comptes Rendus Geoscience*, 339, 589–600.

DeMenocal, P. B. (2004). African climate change and faunal evolution during the Pliocene–Pleistocene. *Earth and Planetary Science Letters*, 220, 3–24.

Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.

Fattorini, S. (2007). Historical relationships of African mountains based on cladistic analysis of distributions and endemism of flightless insects. *African Entomology*, 15, 340–355.

Fitton, J. (1987). The Cameroon Line, West Africa: a comparison between oceanic and continental alkaline volcanism. *In* Fitton, J. G., and Upton, B. G. J., eds. *Alkaline igneous rocks*. Geological Society, 30: 273–291.

Fjeldsa, J., Burgess, N. D., Blyth, S. & De Klerk, H. M. (2004). Where are the major gaps in the reserve network for Africa’s mammals? *Oryx* 38, 17–25.

Fjeldsa, J. & Lovett, J. C. (1997). Geographical patterns of old and young species in African forest biota: the significance of specific montane areas as evolutionary centres. *Biodiversity and Conservation*, 6, 325–346.

Flenley, J. R. (1998). Tropical forests under the climates of the last 30,000 years. *Climatic Change* 39, 177–197.

Graham, C. H., Smith, T. B. & Languy, M. (2005). Current and historical factors influencing patterns of species richness and turnover of birds in the Gulf of Guinea highlands. *Journal of Biogeography*, 32, 1371–1384

- Hall, J. B., O'Brien, E. M. & Munjuga, M. (2000). Ecology and biology. In: *Prunus africana: A Monograph*. School of Agricultural and Forest Sciences. University of Wales, Bangor, 18, 3–25.
- Hamilton, A. C. & Perrott, R. A. (1981). A study of altitudinal zonation in the montane forest belt of Mt Elgon, Kenya and Uganda. *Vegetatio* 45, 107–125.
- Hofer, U., Bersier, L.-F. & Borcard, D. (1999). Spatial organization of a herpetofauna on an elevational gradient revealed by null model tests. *Ecology* 80, 976–988.
- Cheek, M., Cable, M., Hepper, F. N., Nadam, N. & Watts, J. (1996). Mapping plant biodiversity on Mount Cameroon. *The Biodiversity of African Plants*, 110–120.
- Jesus, J., Harris, D. J., Brehm, A. (2007). Relationships of *Afroablepharus* Greer, 1974 skinks from the Gulf of Guinea islands based on mitochondrial and nuclear DNA: Patterns of colonization and comments on taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45, 904–914.
- Juste, J., Ibañez, C. (1993). Geographic variation and taxonomy of *Rousettus aegyptiacus* (Mammalia: Megachiroptera) in the islands of the Gulf of Guinea. *Zoological Journal of the Linnean Society* 17, 117–129.
- Kadu, C. A. C., Schueler, S., Konrad, H., Muluvi, G. M. M., Eyog-Matig, O., Muchugi, A., Williams, V. G., Ramamonjisoa, L., Kapinga, C., Foahom, B., Katsvanga, C., Hafashimana, D., Obama, C. & Geburek, T. (2011). Phylogeography of the Afromontane *Prunus africana* reveals a former migration corridor between East and West African highlands, *Molecular Ecology*, 20, 165–178.
- Larsen, T. B. (2005). *Butterflies of West Africa*. Apollo Books, Stenstrup, 595 pp.
- Lee, D. C., Halliday, A. N., Fitton, J. G. & Poli, G. (1994). Isotopic variations with distance and time in the volcanic islands of the Cameroon line: evidence for a mantle plume origin. *Earth and Planetary Science Letters*, 123, 119–138.

- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452
- Mackworth-Praed, C. W., Grant, C. H. B. (1973). *Birds of West and West-Central Africa* (Vol. 2). Longman, London.
- Maley, J., Livingstone, D. A., Giresse, P., Thouveny, N., Brenac, P., Kelts, K., Kling, G., Stager, C., Haag, M., Fournier, M., Bandet, Y., Zogning, A., (1990). Lithostratigraphy, volcanism, paleomagnetism and palynology of Quaternary lacustrine deposits from Barombi Mbo (West Cameroon): preliminary results. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 42, 319–335.
- Maley, J., Elenga, H. (1993). Le rôle des nuages dans l'évolution des paléoenvironnements montagneux de l'Afrique tropicale. *Veille Climatique Satellitaire*. Lannion 46, 51–63.
- Maley, J. (1996). The African Rain Forest: main characteristics of changes in vegetation and climate from the upper Cretaceous to the Quaternary. In: Alexander, L. J., Swaine, M. D., Watling, R. (Eds.), *Essays on the Ecology of the Guinea-Congo Rain Forest*. Sciences. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, 104, 31–73.
- Maley, J. & Brenac, P. (1998). Vegetation dynamics, palaeoenvironments and climatic changes in the forests of western Cameroon during the last 28,000 years. *B. P. Review of Palaeobotany and Palynology*, 99, 157–187.
- Marzoli, A., Piccirillo, E. M., Renne, P. R., Bellieni, G., Iacumin, M., Nyobe, J. B. & Tongwa, A. T. (2000). The Cameroon Volcanic Line revisited: petrogenesis of continental basaltic magmas from lithospheric and asthenospheric mantle sources. *Journal of Petrology*, 41, 87–109.
- Mbowou, G. I. B., Lagmet, C., Nomade, S., Ngounouno, I., Deruelle, B. & Ohnenstetter, D. (2012). Petrology of the Late Cretaceous peralkaline rhyolites (pantellerite and comendite) from Lake Chad, Central Africa. *Journal of Geosciences*, 57, 127–141.

- Meyers, J. B.; Rosendahl, B. R.; Harrison, C. G. A.; and Ding, Z.-D. (1998). Deep-imaging seismic and gravity results, from offshore Cameroon Volcanic Line and speculation of African hot-lines. *Tectonophysics* 284, 31–63.
- Missoup, A. D., Nicolas, V., Wendelen, W., Keming, E., Bilong Bilong, C. F., Couloux, A., Atanga, E., Hutterer, R. & Denys, C. (2012). Systematics and diversification of *Praomys* species (Rodentia: Muridae) endemic to the Cameroon Volcanic Line (West Central Africa). *Zoologica Scripta*, 41, 327–345.
- Monteiro, A. & Pierce, N.E. (2001). Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) Inferred from COI, COII, and EF-1 α Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18, 264–281.
- Moreau, R. E. (1966). *The Birds Faunas of Africa and its Islands*. Academic Press, New York, 424 pp.
- Musser, G. G. & Carleton, M. D. (2005). Superfamily Muroidea. *In* D. E. Wilson & D. M. Reeder (2005). (Eds.) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (Vol. 12). Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press. 2145 pp.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities, *Nature*, 403, 853–858.
- National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: www.ncbi.nlm.nih.gov
- Njome, M. S., Suh, C. E., Sparks, R. S. J., Ayonghe, S. N., Fitton, J. G. (2009). The Mount Cameroon 1959 compound lava flow field: morphology, petrography, geochemistry. *Swiss Journal of Geosciences*, 101, 85–98.
- Neumann, R. P. (1996). Dukes, earls, and ersatz Edens: aristocratic nature preservationists in colonial Africa. *Environment and Planning*, 14, 79–98.
- Nylin, S., Nyblom, K., Ronquist, F., Janz, N., Belicek, J., & Källersjö, M. (2001). Phylogeny of *Polygonia*, *Nymphalis* and related butterflies (Lepidoptera:

Nymphalidae): a total-evidence analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 132, 441–468.

Oates, J. F., Bergl, R. A., Linder, J. M., (Eds.). (2004). Africa's Gulf of Guinea forests: Biodiversity patterns and conservation priorities. *Advances in Applied Biodiversity Science*, Conservation International, Washington D. C.

Rankenburg, K., Laeaiter, J. C. & Brey, G. (2005). The role of continental crust and lithospheric mantle in the genesis of Cameroon Volcanic Line lavas: constraints from isotopic variations in lavas and megacrysts from the Biu and Jos Plateaux. *Journal of Petrology*, 46, 169–190.

Reif, J., Sedlacek, O., Horak, D., Reigert, J., Pesata, M., Hrazsky, Z. & Janecek, S. (2007). Habitat preferences of birds in a montane forest mosaic in the Bamenda Highlands, Cameroon. *Ostrich*, 78, 31–36

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542.

Roy, M. (1997). Recent diversification in African greenbuls (Pycnonotidae: *Andropadus*) supports a montane speciation model. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 264, 1337–1344.

Sandwith, T., Shine, C., Hamilton, L. & Sheppard, D. (2001). *Transboundary Protected Areas for Peace and Cooperation*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

Sedláček, O., Reif, J., Horak, D., Rieger, T. J., Pesata, M. & Klvana, P. (2007). The birds of a montane forest mosaic in Big Babanki area, Bamenda Highlands, Cameroon. *Malimbus*, 29, 89–100.

Smith, T. B., Holder, K., Girman, D., O'Keefe, K., Larison, B. & Chan, Y. (2000). Comparative avian phylogeography of Cameroon and Equatorial Guinea mountains: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 9, 1505–1516.

Swaine, M. D. (1992). Characteristics of dry forest in West Africa and the influence of fire. *Journal of Vegetation Science*, 3, 365–374

Teacher, A. G. F. & Griffiths, D. J. (2011). HapStar: automated haplotype network layout and visualization. *Molecular Ecology Resources*, 11, 151–153.

Thomas, D. (1993). Provisional vascular plant species list for Mount Kupe. Unpubl. Rep., 15 pp.

Tropek, R., & Konvicka, M. (2010). Forest eternal? Endemic butterflies of the Bamenda highlands, Cameroon, avoid close-canopy forest. *African Journal of Ecology*, 48, 428–437.

Vick, G. S. (1999). A checklist of the Odonata of the South-west Province of Cameroon, with the description of *Phyllogomphus corbetiae* spec. nov. (Anisoptera: Gomphidae). *Odontologica*, 28, 219–256.

White, F. (1981). The history of the Afromontane archipelago and the scientific need for its conservation. *African Journal of Ecology*, 19, 33–54.

White, F. (1983). The vegetation of Africa, a descriptive memoir to accompany the UNESCO/AETFAT/UNSO Vegetation Map of Africa. Paris: UNESCO. 356 pp.

Worobey, M., Telfer, P., Souquière, S., Hunter, M., Coleman, C. A., Metzger, M. J., Reed, P., Makuwa, M., Hearn, G., Honarvar, S., Roques, P., Apetrei, C., Kazanji, M. & Marx, P. A. (2010). Island Biogeography Reveals the Deep History of SIV. *Science* 329, 1487.

World resources institute. Forest Atlas of Cameroon [online]. [cit. 2014-02-08]. Dostupné z: <http://www.wri.org/tools/atlas/map.php?maptheme=cameroon/>

Zimkus, B. M. (2009). Biogeographical analysis of Cameroonian puddle frogs and description of a new species of *Phrynobatrachus* (Anura: Phrynobatrachidae) endemic to Mount Oku, Cameroon. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 157, 795–813.

Zimkus, B. M. & Gvoždík, V. (2013). Sky Islands of the Cameroon Volcanic Line: a diversification hot spot for puddle frogs (Phrynobatrachidae: Phrynobatrachus). *Zoologica Scripta*, 42, 591–611.