

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Fylogeneze a sekvenování topotypového materiálu rodu**  
***Bujurquina***

Diplomová práce

**Bc. Kateřina Boubertlová**

**Školitel: doc. Mgr. Oldřich Říčan, Ph.D.**

České Budějovice 2024

Bouberlová, K., 2024: Fylogeneze a sekvenování topotypového materiálu rodu *Bujurquina* [Phylogeny and sequencing of the topotype material of the genus *Bujurquina*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

#### Anotace

*Bujurquina* is the most widespread and species-rich genus of cichlids in the western Amazon of South America, yet based on recent studies it remains poorly known. In this thesis, based on analyses of molecular data (mtDNA cytochrome b marker) a new phylogenetic hypothesis for the genus is provided, with a review of its species diversity, and biogeographic interpretation of its evolution. In this thesis a total of 45 species-level taxa were included, including 20 valid species (out of 21) and 25 putative new species. New sequences were generated for 25 species and 17 putative new species. Most of the included species and putative new species are confirmed by the molecular analyses. The phylogeny of the genus is well resolved and well supported. A high degree of endemism in *Bujurquina* is confirmed and extended to all basins of its distribution. The high endemism together with the well resolved and well supported phylogeny enabled a very detailed biogeographic reconstruction of the genus which confirms and even significantly extends our knowledge of the biogeographical evolution of the Western Amazon and Western South America.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 11.4. 2024

Bc. Kateřina Boubertová

### Poděkování

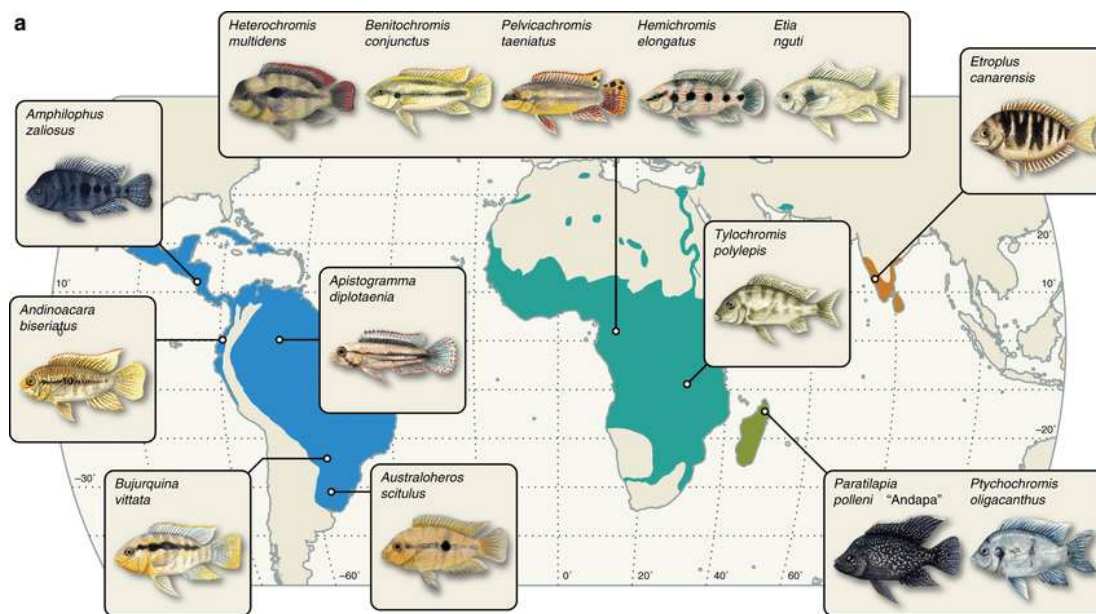
Ráda bych zde poděkovala svému školiteli doc. Mgr. Oldřichu Říčanovi, Ph.D. za celkové vedení této práce. Dále bych chtěla RNDr. Radce Piálkové, Ph.D. za pomoc, trpělivost, přátelský přístup, cenné rady a pomoc v laboratoři. Velký dík patří mým rodičům za umožnění studia a podporu při studiu.

## Obsah:

Úvod .....	6
Rod <i>Bujurquina</i> .....	11
Cíle práce .....	19
Materiál a metodika .....	19
Původ vzorků .....	19
Izolace DNA .....	19
Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	20
Gelová elektroforéza, izolace PCR produktů, sekvenování .....	20
Úprava a zpracování sekvencí .....	21
Fylogenetické analýzy .....	21
Analýzy fylogenetické inference a molekulárního datování v programu BEAST .....	21
Analýzy vymezení druhů pomocí metod GMYC a PTP .....	22
Biogeografické analýzy .....	23
Výsledky .....	23
Fylogenetické analýzy .....	25
Druhová diverzita rodu <i>Bujurquina</i> v celém rozsahu rozšíření na základě morfologického a molekulárního vymezení .....	27
Endemismus rodu <i>Bujurquina</i> v celém rozsahu rozšíření .....	29
Fylogenetické vztahy druhů <i>Bujurquina</i> na základě analýz mtDNA .....	33
Časový rámec evoluce a biogeografie <i>Bujurquina</i> na základě fylogenetických analýz mtDNA .....	35
Diskuse .....	38
Endemismus v rodě <i>Bujurquina</i> .....	40
Biogeografie a datování diverzifikace <i>Bujurquina</i> se zaměřením na nově přidané druhy a oblasti .....	41
Formace říčních povodí v severní části Západní Amazonie na základě nové fylogeneze <i>Bujurquina</i> s se zaměřením na teritorium Ekvádoru .....	45
Nerozpoznaná druhová diverzita v rodě <i>Bujurquina</i> .....	47
Citace .....	49

## Úvod

Rod *Bujurquina* Kullander, 1986 zahrnuje sladkovodní ryby, které patří do čeledi Cichlidae (česky cichlidy nebo vrubozubcovití). Cichlidy jsou nejpočetnější čeleď sladkovodních ryb s nejméně 1700 druhů (Kullander, 2003), ale odhady se blíží až ke 3000 druhům. Patří do podtřídy Actinopterygii a podle tradiční klasifikace do řádu Perciformes (Nelson a kol. 2016, Fricke a kol. 2020, Helfman a kol. 2009). Většina druhů je sladkovodní, jen pár se jich vyskytuje v prostředí s brakickou vodou. Cichlidy se vyskytují v Africe, ve Střední a Jižní Americe, na Madagaskaru, a několik druhů je známo i Středního východu, Srí Lanky, jižní Indii a z Nearktické oblasti (Kullander, 1986, Keenleyside, 1991, Berra, 1981, Barlow 2000, McConnell, 2021, Obr. 1)

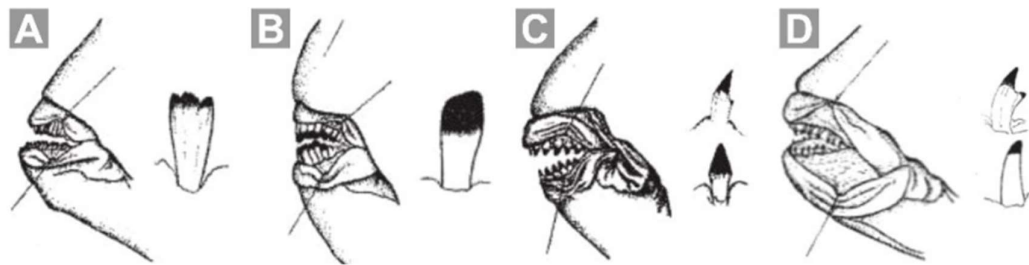


Obrázek 1: Rozšíření cichlid na Zemi, upraveno (Matschiner a kol. 2020).

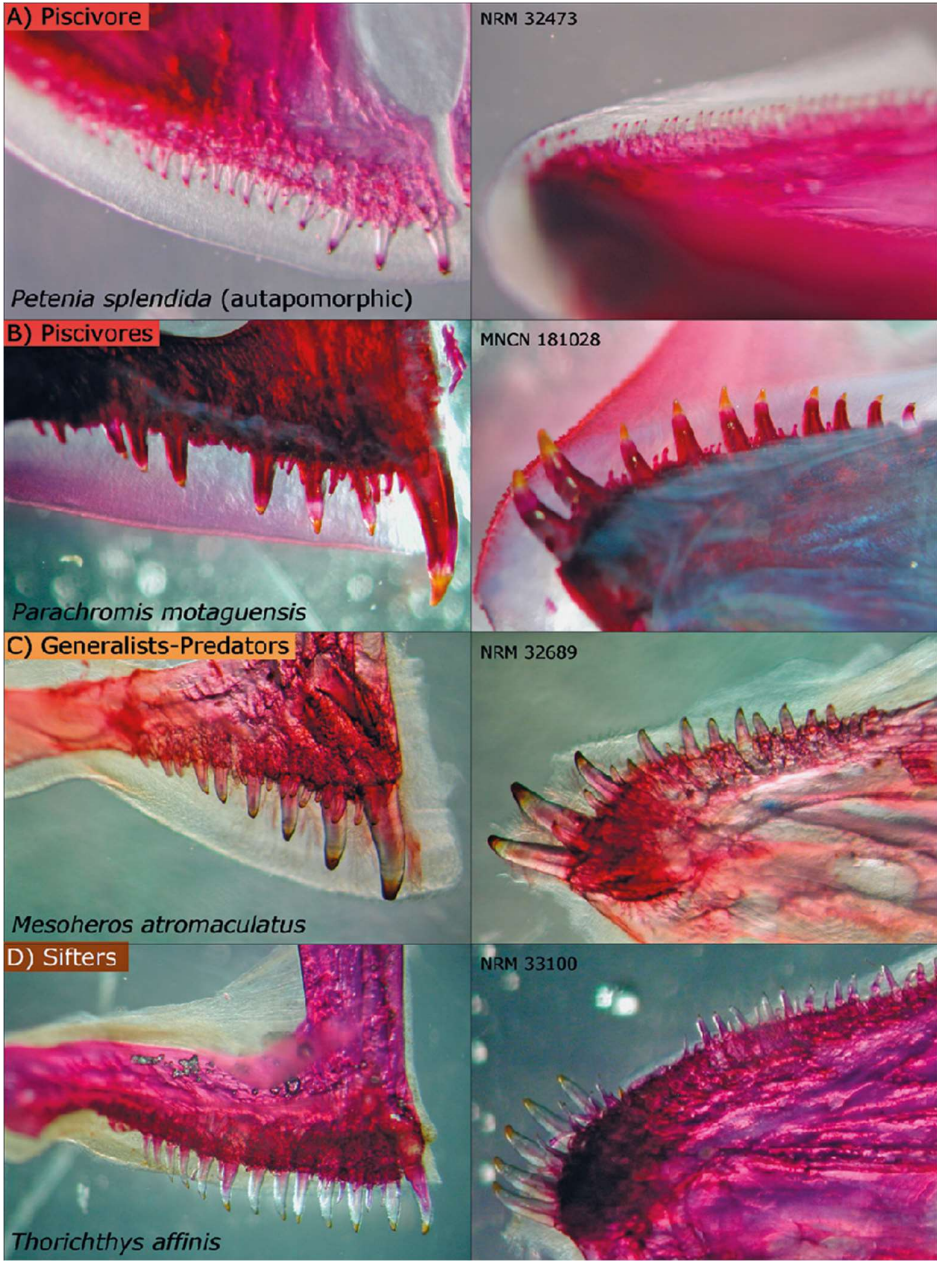
Mezi ostatními rybami lze cichlidy rozpoznat podle jen jedné nosní dírky na každé straně hlavy, podle rozdělené postranní čáry, 7-24 (obvykle 13-16) trnů v hřbetní ploutvi, a 2-12 (obvykle 3, zřídka více než 5) trnů řitních ploutví. Délka v dospělosti se pohybuje od několika cm do 1 metru. V dospělosti jejich tělo pokrývají malé ktenoidní šupiny (Kullander, 1998, Kullander, 2003). Cichlidy mají typicky úzké kraniální postranní kanálky, ale některé rody je mají redukované nebo rozšířené. Souvislý systém postranní čáry, který je jinak běžný u kostnatých

ryb, je u cichlid vzácný. Mají typicky rozdělený systém postranní čáry na dvě části (nebo jeho variace), který je jinak vzácný u jiných čeledí kostnatých ryb (Webb a kol. 2021).

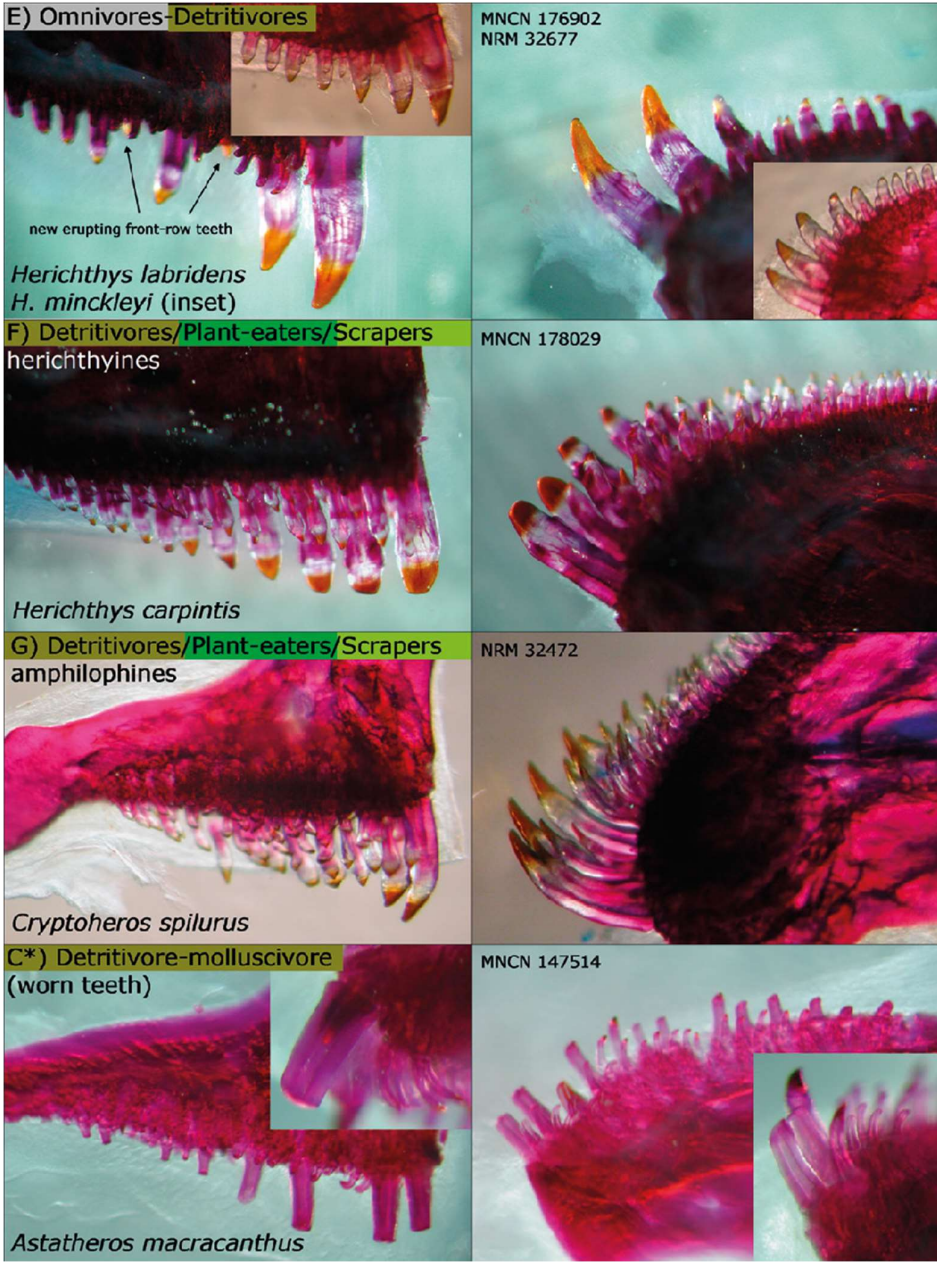
Velká rozmanitost cichlid se vysvětluje pokročilou péčí o potomstvo a různými adaptacemi ústní dutiny (příjem potravy) a trávicí soustavy. Velké rozdíly jsou hlavně ve tvaru chrupu, což koreluje se specializací na stravu (Obr. 2, 3). Většina cichlid se živí bezobratlými nebo rostlinami, ale velké druhy se živí jinými rybami (Kullander, 1998).

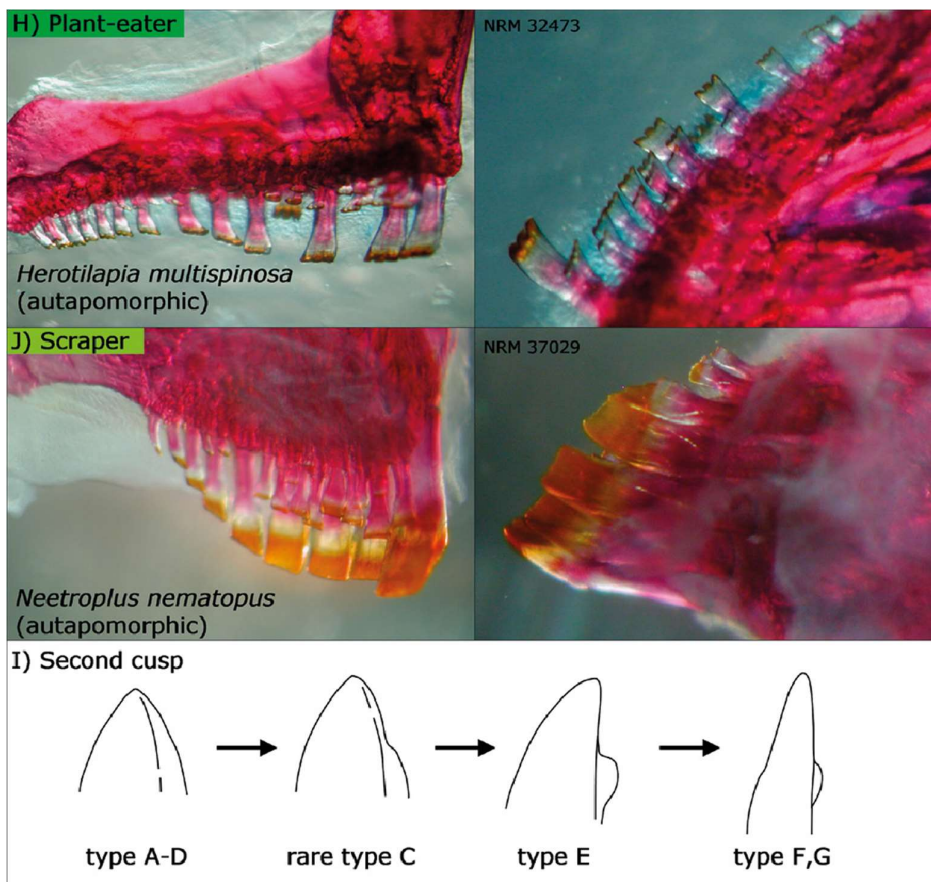


Obrázek 2: Nákresy typů chrupu u zástupců čeledi Cichlidae (Angulo a San Gil-León 2022).









Obrázek 3: Typy zubů u středoamerických cichlid (Řičan a kol. 2016)

Většina cichlid je pohlavně dimorfních (především ve zbarvení) a samice jsou většinou menší než samci (Nelson, 1995, Kullander, 1986). Způsob, jakým se cichlidy starají o svá mláďata, se u různých druhů a skupin liší. Některé druhy se starají o mláďata jen několik dní, jiné se o mláďata starají týdny až měsíce. Nejčastěji se rozmnožují v párech, ale existuje u nich celá škála zahrnujících téměř kompletní spektrum rodičovské péče známé u obratlovců od monogamie po polygynandrii (Balshine a Abate, 2021) U některých druhů, které se rozmnožují monogamně, se rozmnožuje jeden samec a jedna samice spolu. Pro cichlidy je typické, že jsou jejich jikry kladeny na substrát a oba rodiče hlídají své potomky po dobu několika dní až týdnů, vzácně měsíců. U mnoha druhů takto se rozmnožujících je známá i orální inkubace jiker nebo plůdku v ústní dutině samice i samce (Kullander, 1986, Barlow, 2000). Při polygynii se samec rozmnožuje se dvěma a více samicemi. V polyandrii se jedna samice rozmnožuje s více samci.

Velikost jiker cichlid se od sebe rod od rodu i druhově liší. Velikost jiker je ovlivněna mnoha faktory, jako je vnější prostředí, velikost snůšky nebo fenotyp samice. Jikry určují velikost plůdku a dobu jeho vývoje. Ti, kteří se vylíhnou z větších jiker, mají vyšší pravděpodobnost přežití a rychlejší růst (Coleman a Galvani 1998, Balshine a Abate, 2021).

Cichlidy jsou velmi dobře známé akvaristům hlavně díky svému zajímavém zbarvení a rodičovské péči a zároveň často poměrně nenáročnému chovu. Nechovají se jenom jako okrasné ryby, ale také se chovají pro sportovní rybolov a na maso (Kullander, 2003, Kelber, 1999).

Výskyt většiny cichlid je často omezen na povodí jedné řeky nebo dokonce jednoho z přítoků. To odráží jak jejich ekologické omezení, tak historii povodí. V Neotropické oblasti se cichlidy vyskytují ve všech říčních tocích, typicky do nadmořské výšky okolo 1500 m (Kullander, 1986).

### Rod *Bujurquina*

Patří do podčeledi Cichlasomatinae a zahrnuje v současnosti 21 popsáných druhů (Kullander, 1986, Říčan a Říčanová, 2023, Careaga, Miranda a Carvajal-Vallejos, 2023). Jedná se o nejrozšířenější a druhově nejbohatší rod cichlid v západní Amazonii v Jižní Americe (Říčan a kol., 2023a, Říčan a Říčanová, 2023). Vyskytují se především v přítocích řeky Amazonky, dále v povodí řek Orinoco, Paraguay a Paraná (Kullander, 2003, Tabulka 1). Jedná se o středně velké cichlidy do délky 110 mm. Od ostatních podobných rodů se ve vnějším vzhledu liší především často šikmým postranním pruhem táhnoucím se od hlavy k hornímu okraji ocasního násadce, výraznou ornamentací především na hlavě a hřbetní ploutvi a uspořádáním šupin před hřbetní ploutví. Počet obratlů je 24-26 (Kullander, 1986).

Rodové jméno pochází z místního názvu bujurqui, což je nejčastěji používané peruánské jméno pro ryby z čeledi Cichlidae (Kullander, 1986). Typovým druhem rodu *Bujurquina* je *Bujurquina moriorum* (Kullander, 1986) (Obr. 4).



Obrázek 4: Typový druh rodu *Bujurquina moriorum* z typové lokality (Říčán a Říčánová, 2023).

Ryby z rodu *Bujurquina* mají světle zbarvené břicho, boky nažloutlé a hřbet tmavší. Přes tělo se táhnou tmavé příčné pruhy, které končí na ocasním násadci. Na hlavě mají tmavé pole mezi okem a nosní dírkou. Důležité pro tento rod je zbarvení hlavy a hřbetní ploutve, s různými typy skvrn a pruhů. Na predorsální linii je jediná řada 8 (zřídka 7 nebo 9) šupin (oproti tzv. triseriálnímu typu uspořádání šupin u některých jiných rodů). Zbarvení těchto ryb je velmi citlivé na konzervaci (Kullander, 1986, Říčán a kol., 2023a, Tabulka 1).

Znaky užitečné pro identifikaci druhů v rámci rodu zahrnují především:




- 1) orientace postranního pruhu (zda vede k hřbetní ploutvi nebo k ocasnímu násadci, Kullander, 1986),
- 2) suborbitální pruh dospělých a juvenilních stádií,
- 3) barevný vzor hřbetní ploutve (Kullander, 1986, Říčán a kol., 2023a, b, Říčán a Říčánová, 2023).





U rodu *Bujurquina* se oba rodiče starají o svá mláďata. V době tření se ryby vytřou na substrát, kde následně o oplozené jikry pečují. Přihánějí jikrám kyslík. Mohou i nosit list s jikrami. Očišťují je. Když se z jiker vykulí plůdek, tak ho některé druhy chrání ve své ústní dutině (Kullander, 1986).




Rod *Bujurquina* je biogeograficky nejinformativnější skupinou západoamazonských cichlid, díky svému rozšíření. Jedná se rod, jehož druhy se vyskytují na omezených areálech, tedy jde z velké části o endemity. Díky tomu se jedná o nejlepší modelovou skupinu ke studiu andské




a západní amazonské biogeografie a evoluce krajiny a její přímý vliv na utváření biodiverzity. Jejich rozšíření a endemismus sleduje předpokládaný a rekonstruovaný průběh paleo-Amazonky (Kullander, 1986, Říčan 2017, Říčan a kol. 2023a).

Tabulka 1: Seznam popsáných druhů rodu *Bujurquina*.




Druh (pořadí dle data popisu)	Typová lokalita	Délka těla (SL mm)	Obrázek	Popis/Ref erence/ info/ foto
<i>Bujurquina vittata</i> ( <i>Acara vittatus</i> ) ( <i>Aequidens paraguayensis</i> )	povodí řeky Paraguay, Cuiaba, Mato Grosso, Brazil	53,8-65,6		Heckel, 1840 / Kullander, 1986/ foto: Říčan a Říčanová, 2023
<i>Bujurquina sypilus</i> ( <i>Acara sypilus</i> )	Peru, povodí Amazonky, řeka Ambyiacu a přítoky	32,3-103,0		Cope, 1872, Eigenmann a Kennedy, 1903 / foto: Říčan a Říčanová, 2023
<i>Bujurquina zamorensis</i> ( <i>Acara zamorensis</i> )	Ekvádor, povodí Amazonky, Rio Zamora	Max 74		Regan, 1905/ Kullander, 2003/ foto: Říčan a Říčanová, 2023



<i>Bujurquina mariae</i> ( <i>Aequidens mariae</i> )	Kolumbie, povodí Orinoko, povodí Meta	150 TL		Eigenman n, 1922/ Kullander, 2003/ foto: Říčan a Říčanová, 2023
<i>Bujurquina moriorum</i>	Peru, povodí Amazonky, Quebrada Carahuayte, cesta Jenaro Herrera- Colonia Angamos	6,0-97,1		Kullander, 1986/ foto: Říčan a Říčanová, 2023
<i>Bujurquina apoparuana</i>	Peru, Ucayali department, povodí Amazonky, Ucayali, 4 km z Pucallpy po cestě do Limy	17,8- 77,0		Kullander, 1986/ foto: Říčan a Říčanová, 2023
<i>Bujurquina cordemadi</i>	Peru, povodí Amazonky, povodí Madre de Dios, Near Lago Tupac	32,0- 61,8		Kullander, 1986




	Amaru, poblíž Puerto Maldonado			
<i>Bujurquina eurhinus</i>	Peru, Cuzco department, Río Hospital, povodí Río Madre de Dios.	17,4- 88,5		Kullander, 1986 / foto: Říčan a Říčanová, 2023
<i>Bujurquina hophrys</i>	Peru, Huánuco department, přítok Río Pachitea, 2- 3 km po proudu od Tournavista .	21,7- 84,7		Kullander, 1986/ foto: Říčan a Říčanová, 2023
<i>Bujurquina huallagae</i>	Peru, Huánuco department, povodí řeky Amazonky, povodí Huallaga poblíž Tingo Maria, ca. 1/4 míle nad.	12,0- 82,8		Kullander, 1986 / foto: Říčan a Říčanová, 2023

<p><i>Bujurquina labiosa</i></p>	<p>Peru, Ucayali department, povodí Amazonky, povodí Ucayali, přítok Río Chinipo, ca. 10 km jižně od Chicosa.</p>	<p>55,4</p>		<p>Kullander, 1986 / foto: Říčan a Říčanová, 2023</p>
<p><i>Bujurquina megalospilus</i></p>	<p>Peru, Huánuco department, povodí Amazonky, Río Pachitea, ca. 1 km severně od Tournavista .</p>	<p>29,9- 53,8</p>		<p>Kullander, 1986 / foto: Říčan a Říčanová, 2023</p>
<p><i>Bujurquina ortegai</i></p>	<p>Peru, San Martin department, povodí Amazonky, povodí Huallaga, povodí Río Mayo, Puerto Juan Antonio, Moyomam ba.</p>	<p>60,4- 70,7</p>		<p>Kullander, 1986 / foto: Říčan a Říčanová, 2023</p>



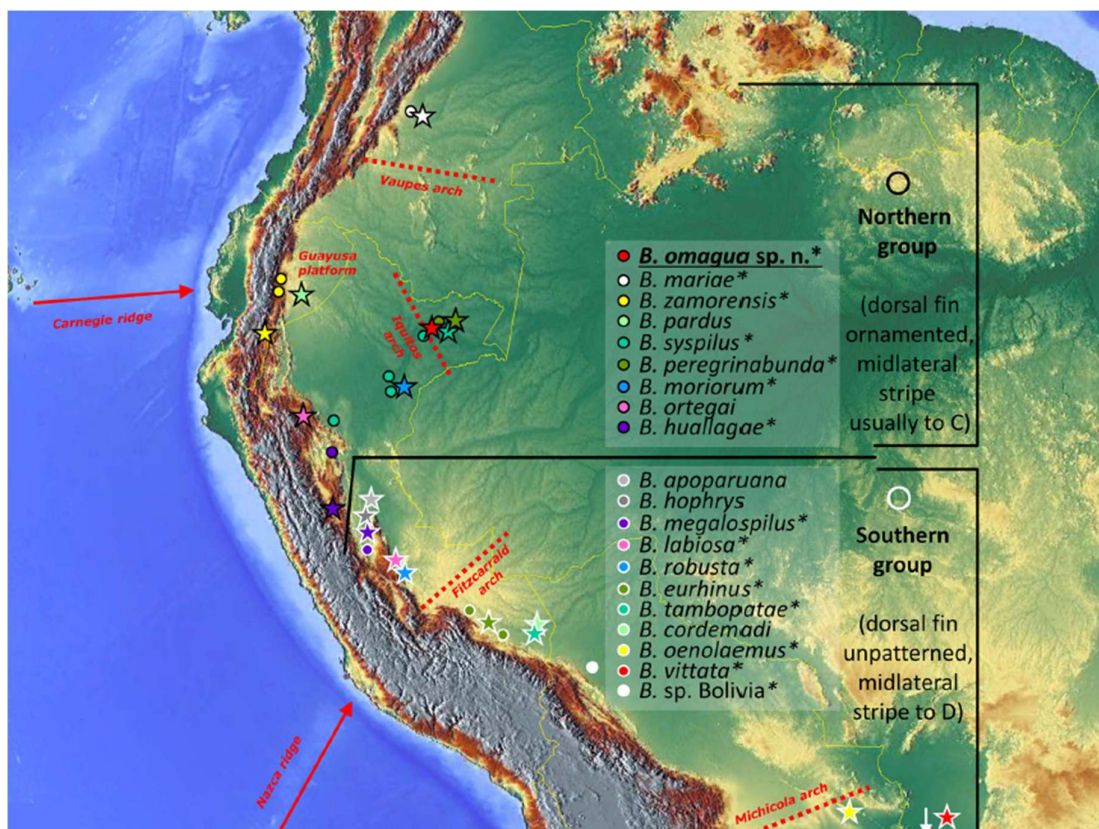
<p><i>Bujurquina peregrinabunda</i></p>	<p>Peru, Loreto department, povodí Amazonky, povodí Rio Ampiyacu, přítok Rio Yaguasyacu tributary, pod Esperanza.</p>	<p>63,2- 101,7</p>		<p>Kullander, 1986 / foto: Říčan a Říčanová, 2023</p>
<p><i>Bujurquina robusta</i></p>	<p>Peru, Ucayali department, povodí Amazonky, povodí Ucayali, přítok Río Chinipo, ca. 10 km jižně od Chicosa.</p>	<p>25,7- 87,6</p>		<p>Kullander, 1986 / foto: Říčan a Říčanová, 2023</p>
<p><i>Bujurquina tambopatae</i></p>	<p>Peru, Madre de Dios Department, povodí Amazonky, povodí Tambopata, Puerto Maldonado, Quebrada San Roque</p>	<p>36,4- 81,5</p>		<p>Kullander, 1986 / foto: Říčan a Říčanová, 2023</p>

	na silnici Puerto Maldonado -Cuzco.			
<i>Bujurquina oenolaemus</i>	Bolívie, Santa Cruz departamen t, povodí Paraguay, Río Aguascalie ntes v Aguascalie ntes, ca. 25 km východně od Roboré.	31,4- 67,2		Kullander, 1987 / foto: Říčan a Říčanová, 2023
<i>Bujurquina pardus</i>	Ekvádor, Pastaza provincie, Río Danta, přítok Río Shionoyacu , povodí Río Tigre, 01°59'08" S, 76°52'30" W.	54,9- 76,9		Arbour, Barriga Salazar a López- Fernández , 2014

<p><i>Bujurquina omagua</i></p>	<p>Peru, Loreto department, povodí Amazonky, vesnice Oran, Quebrada Sabalillo, 3°27'08.4" S, 72°29'11.8" W</p>	<p>69,7- 98,9</p>		<p>Řičan a Řičanová, 2023</p>
<p><i>Bujurquina mabelae</i></p>	<p>Bolívie, Cochabamb a department, povodí Amazonky, Río Mamoré, Río San Pedro, 16°48'47.7 2"S 65°21'33.6 3</p>	<p>50,1- 71,2</p>		<p>Careaga, Miranda a Carvajal- Vallejos, 2023</p>
<p><i>Bujurquina beniensis</i></p>	<p>Bolívie, La Paz department, povodí Amazonky, Río Beni, 15°20'58.9 3"S</p>	<p>50,5- 92,2</p>		<p>Careaga, Miranda a Carvajal- Vallejos, 2023</p>

	67°10'40.5 9"W		
--	-------------------	--	--

Rod *Bujurquina* se podle fylogeneze dělí na dvě fylogenetické linie. Tyto linie jsou od sebe oddělené areálově. Podle toho jsou nazývány jako severní a jižní linie. Dále je lze od sebe odlišit rozdílným zbarvením hřbetní ploutve. Severní linie má zdobené hřbetní ploutve a na boku pruh, který vede více horizontálně až k dorzálnímu okraji ocasního násadce. Na rozdíl od toho jižní linie nemá zdobené hřbetní ploutve a jejich boční pruh vede více vzhůru k zadnímu úponu hřbetní ploutve. Dalším znakem oddělující tyto dvě linie je zbarvení spodního rtu. U většiny druhů severní skupiny je spodní ret výrazně azurově modrý, zatímco u druhů jižní skupiny má vždy stejnou barvu jako horní ret (Řičan a kol. 2023a).



Obrázek 5: Místa výskytu severní a jižní fylogenetické linie (Řičan a kol. 2023a). Potenciálně nové druhy nejsou v mapě zahrnuty.



Obrázek 6: Srovnání zástupců *Bujurquina mariae* ze severní linie a *Bujurquina tambopatae* z jižní linie. Je zde vidět rozdíl ve zbarvení hřbetní ploutve i rtu (Říčan a kol. 2023a).

### **Cíle práce**

Osekvenovat na jednom mtDNA genu, cytochrom b (cytb), nové vzorky rodu *Bujurquina* zahrnující jak potenciálně nové druhy, tak druhy, jejichž vzorky nebyly pro předchozí práce k dispozici. Dále zasadit nově získaná data do kontextu již publikované fylogeneze. Hlavní přínos práce bude posunout poznání druhové diverzity, fylogeneze a biogeografie v tomto rodu s důrazem na fylogenetickou a taxonomickou pozici materiálu, který zahrnuje téměř všechny doposud popsané druhy a velké množství druhů potenciálně nových.

### **Materiál a metodika**

#### **Původ vzorků**

Za účelem zkoumání diverzity cichlid rodu *Bujurquina* bylo v rámci mé práce odebráno 96 vzorků ploutví. Tyto vzorky pocházely z ryb z povodí řeky Amazonky a byly dodány mým školitelem. Jedná se o nové vzorky, které nebyly zahrnuty v práci Říčan a kol. (2023a). Popsané druhy byly odchyceny na nebo poblíž typových lokalit (Tabulka 1), a dále také dle možností na dalších lokalitách. Potenciálně nové druhy byly objeveny rozsáhlým a dlouhodobým studiem celé oblasti výskytu rodu během více jak 15 let (Říčan a kol., 2023a). Části ploutví byly rybám odebrány před jejich fixací ve 4% roztoku formaldehydu. Tyto tkáňové vzorky byli fixováni v 96% alkoholu.

## Izolace DNA

Izolace DNA probíhala za pomoci komerčního kitu GENE AID izolačního kitu (Genomic DNA Tissue Mini Kit). DNA byla izolována s části ploutve. Ke vzorku bylo přidáno 200  $\mu$ l lyzačního pufru GT buffer a 20  $\mu$ l. proteinasy K. Následovala inkubace při 60 °C na 30 min. V průběhu inkubace byl vzorek několikrát zvortexován. Následně bylo ke vzorku přidáno 200  $\mu$ l lyzačního pufru GBT buffer a vzorek byl zvortexován. Poté byly vzorky inkubovány při 60 °C na 20 min. Po uplynutí této doby bylo ke vzorku přidáno 200  $\mu$ l 96 % etanolu a vzorky byly zvortexovány. Celý objem vzorku byl přenesen na mikrocentrifugační kolonku (GS column) umístěnou ve sběrné nádobce (Collection tube) a byl stočen v centrifuze na 2 minuty při 15 000 otáček (g). Obsah sběrné nádoby byl vylit. Bylo přidáno 400  $\mu$ l promývacího pufru W1 buffer a vzorek byl centrifugován při 15 000 otáček po 30 sekund. Sběrná nálevka byla vylita. K vzorku bylo přidáno 600  $\mu$ l promývacího pufru Wash buffer a byl stočen na centrifuze při 15 000 otáček po 30 s. Obsah sběrné nálevky byl vylit. Následovala centrifugace při 15 000 otáček na 3 minuty. Mikrocentrifugační kolonka byla přendána do nové 1,5 ml mikrozkušky. Na střed membrány centrifugační kolonky bylo napipetováno 100  $\mu$ l přehřátého elučního pufru Elution buffer, který byl přehřát na 60 °C. Vzorek se nechal 5 minut odstát, aby se eluční pufr mohl vstřebat do membrány mikrocentrifugační kolonky. Následně byl vzorek zcentrifugován na 15 000 otáček na 30 sekund. Znovu byla mikrocentrifugační kolonka přendána do druhé nové 1,5 ml mikrozkušky. Zde bylo dáno na membránu 50  $\mu$ l přehřátého elučního pufru Elution buffer. Opět byl vzorek ponechán na 5 minut odstát a taktéž proběhla centrifugace při 15 000 otáček na 30 sekund. Tímto způsobem získané vzorky byly uskladněny při 4 °C.

## Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR byla provedena jedнокrokově za využití již publikovaných primerů specifických pro cichlidy rodu *Bujurquina* amplifikujících mitochondriální cytochrom b: GLuDGL (Palumbi 1991) a H15915 (Yu a kol. 2000). PCR byla prováděna za pomoci komerčně dodávané mastermix polymerázy (Top-Bio: [www.top-bio.cz](http://www.top-bio.cz))(12,5  $\mu$ l). Jedná se o směs chemikálií, která obsahuje hot-start Taq DNA polymerázu, PCR pufr, barviva a dNTP. K směsi byly přidány primery (0,5  $\mu$ l každého primeru o koncentraci 25 pmol/ $\mu$ l), DNA (1  $\mu$ l odpovídající koncentraci 50–200 ng) a voda (8,5  $\mu$ l).

## Gelová elektroforéza, izolace PCR produktů, sekvenování

5 µl produktu amplifikovaného pomocí PCR bylo rozděleno gelovou elektroforézou na 1 % agarózovém gelu pufru obsahujícím Syber SAFE o koncentraci 0,1 µg/ml. Pro srovnání velikosti ampliconů byl použit vhodný velikostní standard (1Kb Puls Expres DNA Ladder, Invitrogen) o koncentraci 0,1 µg/µl. Elektroforéza probíhala při 90 V po dobu přibližně 30 minut. Poté byly výsledky vizualizovány pomocí UV transiluminátoru Azure 200 (Azure Biosystems). U ampliconů očekávané velikosti byl vyjmut produkt a vyextrahován s za pomoci komerčního kitu GenepHlow PCR Cleanup Kitu (Geneaid Biotech Ltd, New Taipei, Taiwan) dle pokynů výrobce. Následně byly komerčně osekvenovány (SeqMe, Česká republika) pomocí Sangerovy metody s využitím shodných F a R primerů jako při samotné PCR a za dodání maximálního možného objemu PCR produktu (10 µl).

## Úprava a zpracování sekvencí

Kvalita získaných sekvencí byla zkontrolována vyhodnocením chromatogramů v programu Bioedit. Identita získaných sekvencí byla ověřena v databázi GenBank pomocí algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, blast.ncbi.nlm.nih.gov), konkrétně jeho varianty BLASTN. Ověřené forwardové a reverzní sekvence každého produktu byly spojeny do výsledného konsenzu v programu Geneious Prime v. 2019.0.4.

## Fylogenetické analýzy

Analýzy Bayesovské inference (BI) pro fylogenetickou rekonstrukci byly provedeny v programu BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees) ve verzi v.1.10.0 (Drummond a Rambaut, 2007). Neighbour joining (NJ) analýza v programu PAUP\* 4b.10 (Swofford, 2003) byla použita pro prvotní kontrolu sekvencí a určení jejich předběžné fylogenetické pozice.

## Analýzy fylogenetické inference a molekulárního datování v programu BEAST

BI analýzy v BEAST byly spuštěny s rozdělením podle pozice v kodonu (1. + 2. vs. 3.). Optimální model evoluce podle Akaikeho kritéria byl vybrán pomocí programů MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004) a PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2003). Pro datování byl použit model uvolněných molekulárních hodin s lognormálním rozložením rychlostí a jako prior stromu byl použit koalescenční model s konstantní velikostí. Kalibrace molekulárních hodin byla provedena pomocí sekundární kalibrace z kolektivní studie (Musilová a kol. 2015), která byla

zaměřena na datování neotropických cichlid obecně a cichlid tribu Cichlasomatini zvláště, s důrazem na rod *Andinoacara*, sesterskou skupinu kladu *Bujurquina-Tahuantinsuyoa*. Kolektivní studie (Musilová a kol. 2015) použila kalibraci pomocí sady fosilních druhů neotropických cichlid a je dosud jedinou studií, která zahrnuje rod *Bujurquina* a jeho nejbližší příbuzné rody do datované fylogeneze. Pro kalibraci byly použity tři uzly z této studie:

1) základní uzel *Andinoacara*, odhadovaný analýzou (Musilová a kol. 2015) na 19,33 milionu let (95 % HPD 15,03–24,25 Ma),

2) uzel *Bujurquina-Tahuantinsuyoa-Andinoacara*, odhadovaný na 31,51 milionu let (95 % HPD 26,22–37,17 Ma),

3) uzel *Bujurquina-Tahuantinsuyoa-Andinoacara* vs. zbytek cichlasomatinních cichlid, odhadovaný na 46,47 milionu let (95 % HPD 40,96–52,62 Ma).

BI analýza v BEAST s využitím Markovových řetězců Monte Carlo (MCMC) simulace byla spuštěna po dobu 10 milionů generací, přičemž byly vzorkovány a ukládány stromy každých 3 000 generací. Byly provedeny čtyři dobře konvergující běhy. Analýzy byly spuštěny na volně dostupném serveru Cipres (<https://www.phylo.org/>). Prvních 10 % stromů z každého běhu bylo zahozeno jako burnin na základě kontroly konvergence (grafické vizualizace a diagnostik, zejména efektivní velikost vzorku, ESS) v programu Tracer v. 1.5 (Rambaut a Drummond 2007). Zbývající stromy (po odstranění burnin stromů) byly sloučeny v programu LogCombiner v.1.10.0 s burninem 10 % pro každý z datových partičních schémat a použity ke konstrukci 50 % konsenzuálního stromu s hodnotami posteriorové pravděpodobnosti (PP) větví (bpp). Konečný strom pro každé datové partiční schéma byl vygenerován z těchto dat pomocí programu TreeAnnotator v.1.10.0. Stromy byly zakořeněny reprezentativním vzorkem cichlid tribů Heroini a Cichlasomatini, včetně nejbližších příbuzných rodů *Tahuantinsuyoa* a *Andinoacara*.

Analýzy vymezení druhů pomocí metod GMYC a PTP

Pro molekulární vymezení druhů byly použity analýzy General Mixed Yule Coalescent (GMYC) a Poisson tree processes (PTP) s využitím markeru cyt b. Oba přístupy byly navrženy pro vymezení druhů především na základě jediných molekulárních markerů (nejsou vhodné pro aplikaci vícelokusových koalescenčních metod).

Model General Mixed Yule Coalescent (GMYC) (Pons a kol. 2006, Fujisawa a Barraclough 2013) je často používán v empirických studiích (Fontaneto a kol. 2007, Monaghan a kol. 2009, Carstens a Dewey 2010, Vuataz a kol. 2011, Powell 2012), a novější model Poisson tree



processes (PTP) (Zhang a kol. 2013) byl prokázán dokonce překonávající GMYC metodu v případech, kde jsou vzdálenosti mezi druhy malé. Oba přístupy překonávají metody založené na výběru OTU (operational taxonomic units) (spoléhající se na jednoduché prahové hodnoty podobnosti sekvencí) a jsou odolnější v případech, kde není přítomna tzv. barcoding gap (Zhang a kol. 2013). Oba přístupy modelují speciaci (události větvení mezi druhy) pomocí procesu zrodu (pure birth process) a větvení v rámci druhů jako neutrální koalescenční procesy. Metody identifikují body přechodu větvení mezi druhy a uvnitř druhů maximalizací věrohodnostního skóre modelu. Zatímco metoda GMYC využívá čas k identifikaci bodů přechodu mír větvení (a je tedy závislá na časově kalibrovaném ultrametrickém stromu), metoda PTP využívá počet substitucí a nevyžaduje časově kalibrovaný ultrametrický strom. Obě metody předpokládají, že všechny větve vedoucí od kořene k bodům přechodu jsou různé druhy.

Analýzy PTP a GMYC byly spuštěny pomocí webového rozhraní (<http://species.h-its.org/>). Analýzy bPTP i GMYC byly provedeny na ultrametrickém stromu vytvořeném v BEASTu.

#### Biogeografické analýzy

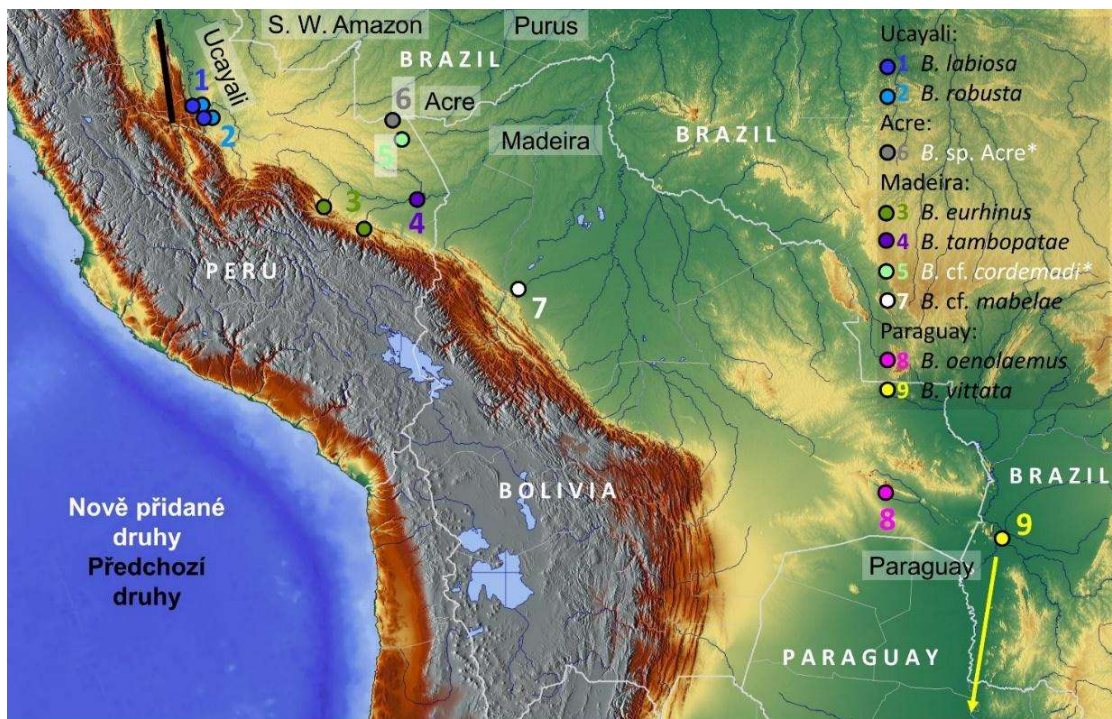
Rekonstrukce oblastí předků pro všechny uzly ve fylogenetickém stromu byla provedena pomocí Bayesovské statistické disperzní a vikarianční analýzy (S-DIVA, implementováno v RASP 2.0, Yu a kol. 2015). Biogeografickými jednotkami použitými pro analýzy byla současná povodí. Pokud nebylo druhové rozšíření omezeno pouze na jedno povodí, druhový areál byl zakódován jako součet říčních povodí. Analýzy byly provedeny pomocí maximální možnosti 'maxareas' pro daný dataset.

#### Výsledky

Celkově bylo v této práci analyzováno 96 nových vzorků z tkání cichlid rodu *Bujurquina* z povodí řeky Amazonky. Z nich bylo úspěšně získáno 91 sekvencí. Nově přidané sekvence zahrnovaly celkem 25 druhů, 17 z nich potenciálně nových (Obr. 7, 8). V těchto vzorcích bylo nově zahrnuto 6 popsáných druhů a 9 potenciálně nových druhů (Obr. 7, 8, 9) oproti práci Říčan a kol. (2023a), na kterou tato práce navazuje.



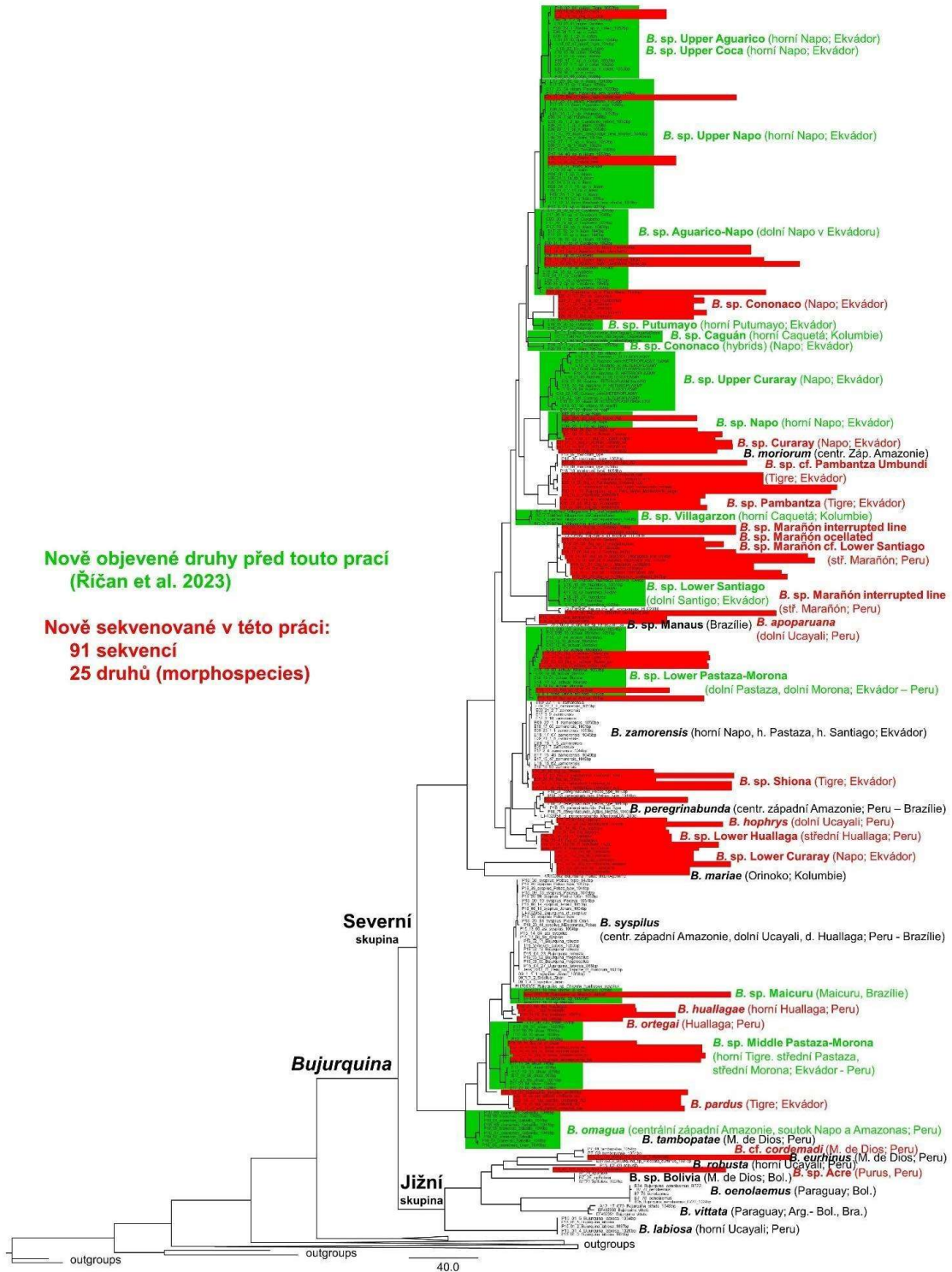
Obrázek 7a: Mapa výskytu severní skupiny rodu *Bujurquina* s vyznačením míst odchytu ryb a sběru vzorků. Bílým písmem a podbarvením v mapě jsou označeny druhy (a vzorky) nově přidané v této práci.



Obrázek 7b: Mapa výskytu jižní skupiny rodu *Bujurquina* s vyznačením míst odchyty ryb a sběru vzorků. Bílým písmem a podbarvením v mapě jsou označeny druhy (a vzorky) nově přidané v této práci.

### Fylogenetické analýzy

Pro NJ fylogenetickou vizualizaci byly zahrnuty všechny sekvence pro kontrolu jejich předběžné fylogenetické pozice, zatímco pro konečné fylogenetické analýzy v programu BEAST byly zahrnuty pouze sekvence delší než 950 bp. Celková délka data matrix obsahovala 1 055 znaků markeru cytb. Nejlepším modelem evoluce pro daný datový soubor je model GTR+I+G. Běhy v programu BEAST ukazovaly velmi dobrou konvergenci po vizualizaci v programu Tracer (ESS >200 pro všechny parametry). Konečná BI (BEAST) analýza a předběžná NJ topologie ukazují velmi podobné fylogenetické vztahy (Obr. 8, 9). Většina uzlů ve stromu BEAST je silně podporována (bpp  $\geq 0,95$ ) (Obr. 9).



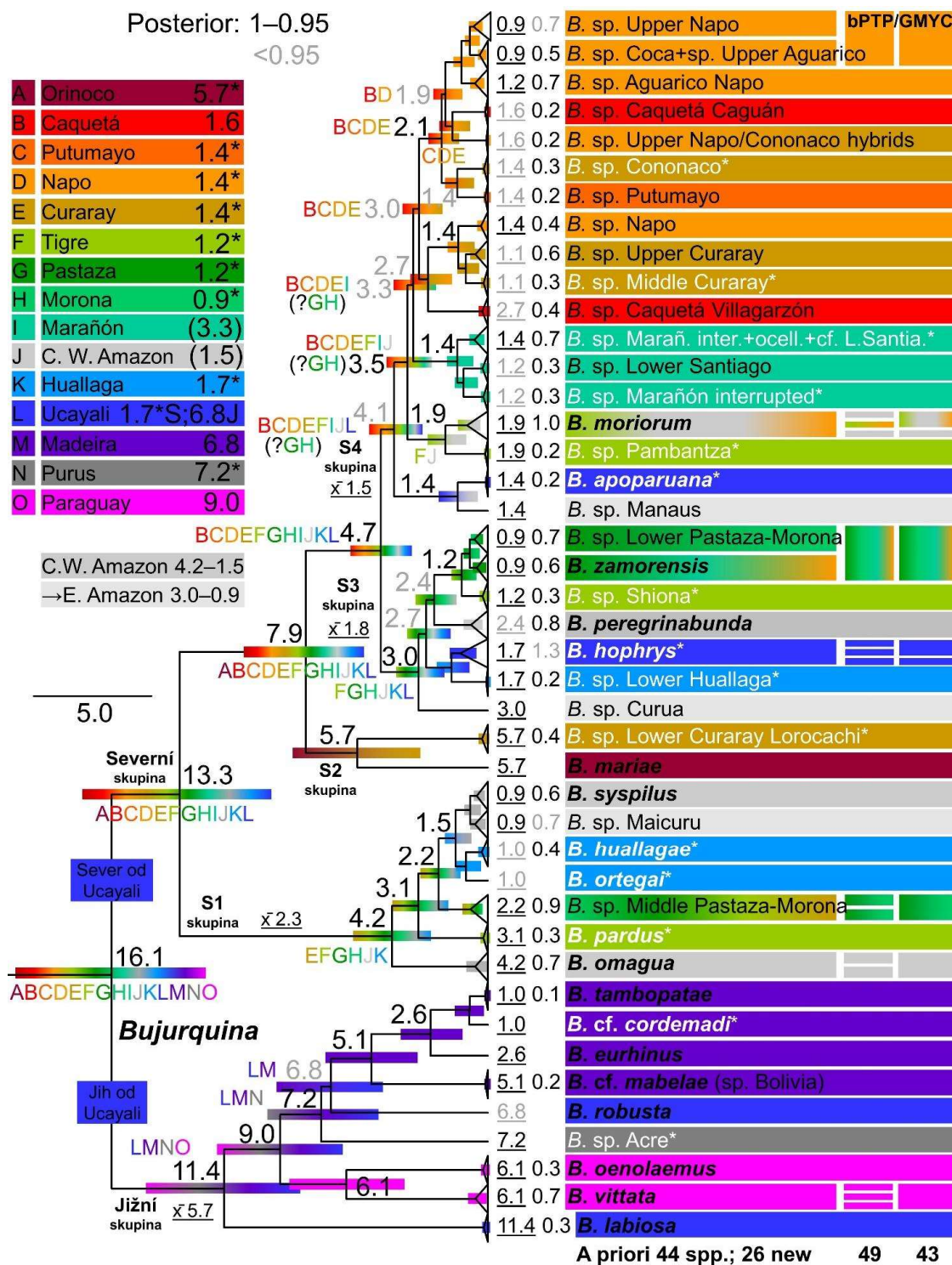
Obrázek 8: Výsledek předběžné fylogenetické analýzy pomocí NJ sloužící především k vyznačení nově přidaných vzorků v této práci (vyznačeno červeně).

Druhová diverzita rodu *Bujurquina* v celém rozsahu rozšíření na základě morfologického a molekulárního vymezení

Na základě morfologické determinace datový soubor zahrnuje 45 druhů rodu *Bujurquina* v celém jeho areálu rozšíření (Obr. 9). Šest popsaných nově zahrnutých druhů rodu *Bujurquina* (*B. apoparuana*, *B. cordemadi*, *B. hophrys*, *B. huallagae*, *B. ortegai*, *B. pardus*) je stejně jako většina z 9 nově přidaných potenciálních nových druhů (*B. sp. Acre*, *B. sp. Lower Curaray Lorocachi*, *B. sp. Lower Huallaga*, *B. sp. Marañón cf. Lower Santiago*, *B. sp. Marañón interrupted line*, *B. sp. Marañón ocellated*, *B. sp. Middle Curaray*, *B. sp. Pambantza*, *B. sp. Shiona*) podpořena molekulárními analýzami. Jedinou výjimkou jsou druhy z povodí Marañónu nad Pongem (kaňonem) del Manserinche, které nejsou nalezeny jako vzájemně monofyletické. Pro potenciálně nový druh *B. sp. Cononaco* byly přidány nové sekvence z více jedinců (původně pouze jedna) které potvrzují samostatnost toho druhu.

Dvě použité metody molekulární delimitace (GMYC a bPTP) našly mezi 43 a 49 druhovými jednotkami, což velmi dobře odpovídá 45 morfologicky vymezeným druhům a potenciálně novým druhům (Obr. 9). Mezi zahrnutými platnými druhy (20) molekulární delimitace podporuje všechny kromě jednoho, *B. megalospilus*, který je nalezen vnořený uvnitř *B. syspilus* (jako některé sekvencované exempláře *B. robusta*). Toto není nový výsledek a důvody jsou již popsány v Říčan a kol. (2023a).

Mezi potenciálně novými druhy se morfologická a molekulární druhová vymezení liší pouze ve třech případech, z nichž jeden případ jsou nově zahrnuté druhy z povodí Marañónu jak uvedeno výše, a dva již byly popsány Říčan a kol. v roce 2023a (*B. sp. Lower Pastaza-Morona* s *B. zamorensis* a *B. sp. Coca* s *B. sp. Upper Napo* a s *B. sp. Upper Napo*). U pěti morfologicky vymezených druhů (*B. hophrys*, *B. moriorum*, *B. omagua*, *B. vittata* a *B. sp. Middle Pastaza-Morona*) molekulární analýzy nalézají vyšší počet potenciálních druhových taxonů (dva nebo tři), ale tato údajná dělení nemají opodstatnění z pohledu morfologické determinace.



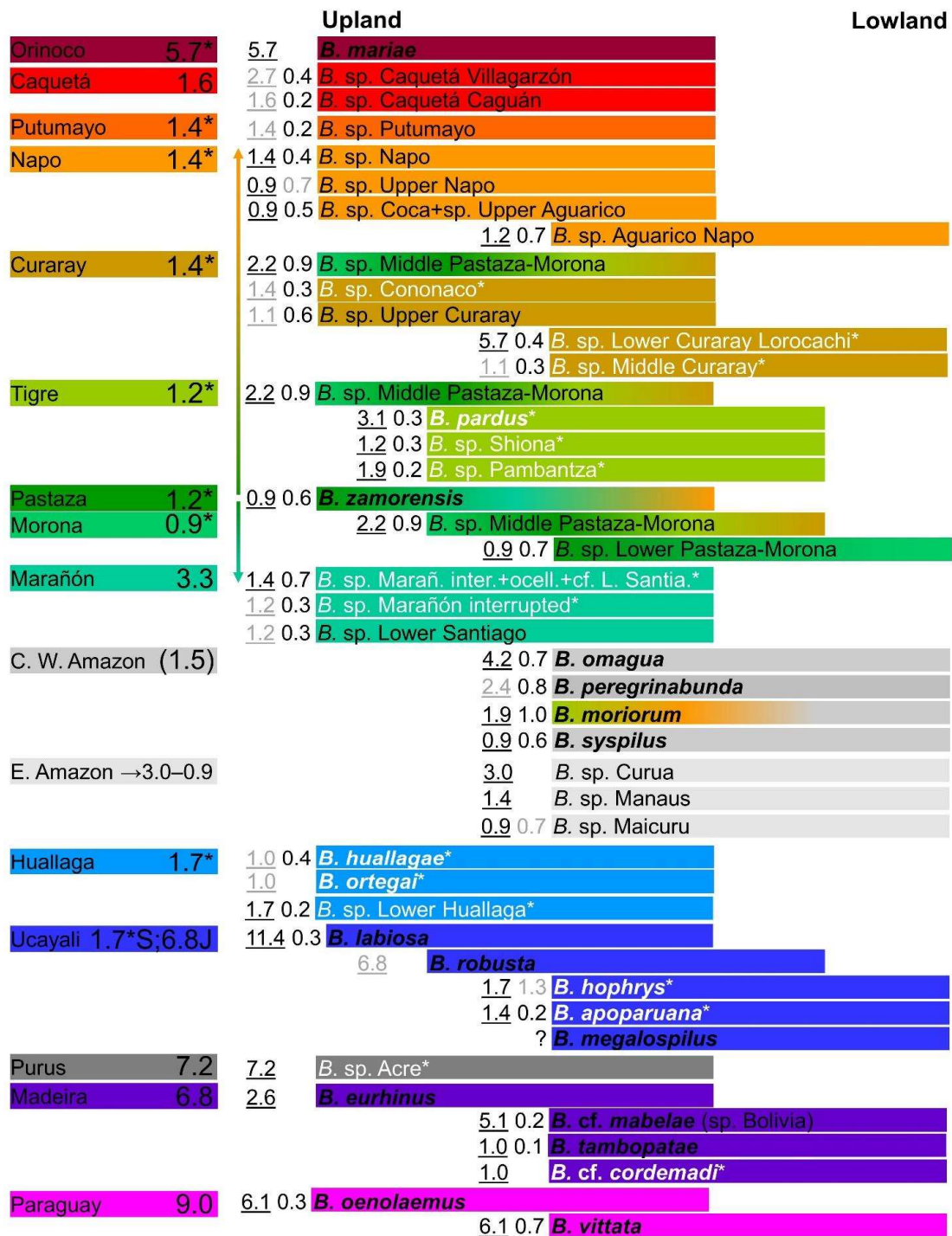
Obrázek 9: Fylogenetické vztahy, datování divergence, biogeografická rekonstrukce a druhové vymezení v rámci rodu *Bujurquina* na základě cyt b markeru z analýzy BEAST. Outgroupové taxony jsou z obrázku vynechány. Číslo v uzlech ukazuje věk v milionech let, černé písmo

ukazuje silně podpořené uzly ( $bpn \geq 0,95$ ), šedé písmo méně podpořené uzly. Čísla před druhy ukazují jejich stáří divergence (první číslo) a datování nejstaršího vnitrodruhového uzlu (druhé číslo). Popsané druhy jsou vyznačeny tučně. Nově přidané potenciálně nové druhy v této práci jsou vyznačeny bílým písmem. Barva intervalů spolehlivosti odhadu věků (95 % HDP) ukazuje rekonstruované areály pro každý uzel. Rekonstruované areály jsou též vyznačeny písmeny, písmenné kódy v přehledu areálů, řek, vlevo nahoře (písmenné kódy a areály jsou zde v pořadí od severu k jihu, Obr. 10, 11). Vymezení molekulárních druhů pomocí metod bPTP a GMYC je vyznačeno v levé části obrázku. Podkladová barva druhů značí území výskytu dle biogeografického kódování pomocí říčních povodí. Měřítko ukazuje 5 My.

Endemismus rodu *Bujurquina* v celém rozsahu rozšíření

Druhy rodu *Bujurquina* jsou na základě morfologické a molekulární druhové delimitace vysoce lokalizované a tedy endemitní pro poměrně malé oblasti. Jediným široce rozšířeným druhem je nejjižnější druh *B. vittata* (většina povodí Paraguay-Lower Paraná, jediný druh v povodí) a možná i nejsevernější druh *B. mariae* (většina Andských podhorských pánví povodí Orinoka na základě současných znalostí).

Všechny ostatní druhy jsou vysoce lokalizované, nacházejí se nejčastěji pouze v části jednotlivých povodí nebo pouze v částech sousedních povodí (Obr. 9, 10). Na základě současných poznatků získaných v této studii je distribuční situace znázorněna na Obr. 10. Popisuje distribuci druhů v rámci jednotlivých říčních povodí od severu k jihu.



Obrázek 10: Distribuce druhů v rámci jednotlivých říčních povodí od severu k jihu. Vlevo jsou druhy z podhorských oblastí, vpravo z nížinných oblastí, v některých povodích jsou podél výškového gradientu i více než dva druhy.



V povodí Caquetá jsou dosud známy 2 potenciálně nové druhy (*B. sp. Caquetá Villagarzón*, *B. sp. Caquetá Caguán*), každý nalezen v jiném horním přítoku povodí.

V povodí Putumayo dosud známe pouze jeden potenciálně nový druh (*B. sp. Putumayo*), nalezený v části řeky San Miguel, přítoku povodí, v pohraniční oblasti mezi Ekvádorem a Kolumbií.

V povodí Napo dosud známe největší diverzitu druhů rodu *Bujurquina*. Celkový počet druhů v povodí je jedenáct (kromě jednoho jsou všechny potenciálně nové druhy), ale kvůli charakteristikám endemismu bylo povodí rozděleno na dvě části, samotné Napo a Curaray, jeho hlavní přítok, neboť žádný druh nebyl nalezen v obou povodích. V Napo samotném bylo nalezeno pět endemických druhů a jeden více rozšířený (*B. zamorensis*), pět v horních částech (*B. zamorensis*, *B. sp. Coca*, *B. sp. Napo*, *B. sp. Upper Aguarico*, *B. sp. Upper Napo*) a jeden (*B. sp. Aguarico Napo*) v nížinné části Ekvádoru a na pomezí s Peru. Situace v povodí v Peru je málo známá, ale *B. sp. Aguarico Napo* pokračuje morfologicky i geneticky do střední části peruánského Napo, kde se na základě morfologie i mtDNA (Obr. 7, 8) kříží s *B. moriorum*. *Bujurquina zamorensis* je nalezena alopatricky od ostatních druhů v nejhornějších a nejjihnějších částech horního Napo (horní toky Anzu a Arajuno) a její distribuce zahrnuje také horní části sousedních povodí Pastaza a Santiago. *Bujurquina sp. Upper Napo* a *B. sp. Napo* jsou nalezeny pod *B. zamorensisem* v horním povodí Napo až na úroveň soutoku s řekou Coca. *Bujurquina sp. Coca* a *B. sp. Upper Aguarico* jsou nalezeny alopatricky v severní části horního povodí Napo.

Povodí Curaray zahrnuje podle současných znalostí pět druhů, čtyři z nich jsou endemické pro toto povodí. Dva druhy jsou nalezeny v dolní části povodí (*B. sp. Lower Curaray Lorocachi*, *B. sp. Middle Curaray*) a tři v horní části, dva v samotném povodí Curaray (*B. sp. Upper Curaray*, *B. sp. Middle Pastaza-Morona*) a jeden v jeho hlavním přítoku, Cononaco (*B. sp. Cononaco*).

*Bujurquina sp. Middle Pastaza-Morona* se nachází nejvýše v horním povodí Curaray, a dále se nachází také jižněji v sousedním povodí horního Tigre a v povodích střední Pastazy a střední Morona.

V povodí Tigre jsou dosud známy čtyři druhy, tři z nich jsou endemické. Kromě *B. sp. Middle Pastaza-Morona* nalezené v horním toku Tigre jsou zbývající tři endemické druhy nalezeny v povodí středního Tigre (*B. pardus*, *B. sp. Pambantza*, *B. sp. Shiona-Umbundi*), a jejich distribuční oblasti jsou nalezeny v těsné blízkosti a překrývají se. V současné době nejsou dostatečně přesná data k těmto druhům, aby bylo možné popsat jejich distribuční oblasti v rámci povodí.

V povodí Pastazy se nacházejí tři druhy, z nichž žádný není endemický, dva se také nacházejí v sousedním povodím Morony a jeden v povodí Napo a Santiago. Nejhornějším druhem je *B. zamorensis*, ve středním povodí byl nalezen *B. sp. Middle Pastaza-Morona* a ve spodním povodí byl nalezen *B. sp. Lower Pastaza-Morona*.

V povodí Maraňónu nad Pongem del Manserinche bylo nalezeno pět morfologických druhů, čtyři z nich jsou endemické (*B. sp. Lower Santiago* a *B. sp. cf. Lower Santiago*, *B. sp. Maraňón interrupted*, *B. sp. Maraňón ocellated*) a pátý, nalezený v horním přítoku Santiaga, je *B. zamorensis*.

Čtyři morfodruhy jsou endemické pro povodí Maraňónu nad Pongem del Manserinche, ale tři z nich (*B. sp. cf. Lower Santiago*, *B. sp. Maraňón interrupted*, *B. sp. Maraňón ocellated*) nejsou podle mtDNA vzájemně monofyletické (Obr. 8, 9) a také jejich distribuční limity v rámci povodí nejsou momentálně dobře poznány.

Povodí Maraňónu je hlavní osou Amazonky a pod Pongem del Manserinche vstupuje do rozlehlé rovinné oblasti až k ústí řeky Napo, kterou zde považujeme za samostatnou zónu endemismu, Západní centrální Amazonii. Tato zóna endemismu zahrnuje čtyři endemické nebo téměř endemické druhy (*B. moriorum*, *B. omagua*, *B. peregrinabunda*, *B. syspilus*) a dále po proudu řeky Amazonky jsou tři další druhy (*B. sp. Curua*, *B. sp. Maicuru*, *B. sp. Manaus*) nalezeny v povodí Východní Amazonie.

V povodí Huallaga se nachází tři endemické druhy. *Bujurquina huallagae* je nalezena v horním povodí Huallaga, *B. ortegai* v hlavním přítoku řeky, řece Mayo, a *B. sp. Lower Huallaga* je nalezena v hornaté dolní části povodí nad prvním pongem na řece, pod kterým povodí vstupuje do oblasti Západní centrální Amazonské nížiny.

V povodí řeky Ucayali nad Západní centrální Amazonskou nížinou bylo nalezeno pět endemických druhů *Bujurquina*. Tři jsou nalezeny na západě povodí západně od hřbetu

Cordillera El Sira (*B. apoparuana*, *B. hophrys*, *B. megalospilus*) a dva (*B. labiosa*, *B. robusta*) východně od hřbetu Cordillera El Sira v horní části samotného povodí Ucayali.

V rozsáhlém povodí Madeiry je v současné době známo pět druhů, *B. beniensis*, *B. cordemadi*, *B. eurhinus*, *B. mabelae* a *B. tambopatae*. Kromě prvního druhu byly všechny zahrnuty do této studie. Oblasti rozšíření u těchto pěti druhů v rámci povodí nejsou dobře ohraničeny. *Bujurquina eurhinus* je jediný druh, který se vyskytuje v podhorské oblasti, všechny ostatní druhy se nachází v nížinách (*B. beniensis* je nejednoznačný a má nejistý taxonomický status). *Bujurquina beniensis* a *B. mabelae* jsou známy pouze z bolivijské části povodí, zatímco ostatní tři druhy mají typové lokality v peruánské části.

V povodí Purus byl nalezen jeden potenciálně nový druh *Bujurquina* z horní části povodí řeky Acre (*B. sp. Acre*).

V nejjihnějším povodí, kde je rozšířen rod *Bujurquina*, v povodí Paraguay, se vyskytují dva druhy, *B. oenolaemus* a *B. vittata*. První druh je endemitem oblasti horkých pramenů v malé oblasti východní Bolívie, zatímco druhý druh má velký areál rozšíření v povodích řek Paraguay a dolní Paraná.

#### Fylogenetické vztahy druhů *Bujurquina* na základě analýz mtDNA

Níže popsané fylogenetické vztahy jsou založeny na datovaném stromu BEAST (Obr. 9). Fylogenetické vztahy mezi druhy a na vyšších úrovních jsou obecně dobře podporovány ve stromu BEAST (bpp  $\geq 0,95$ ). Pokud není uvedeno jinak, vztahy popsané níže jsou dobře podporovány (Obr. 9). Fylogeneze rodu *Bujurquina* je rozdělena do dvou hlavních linií, jižní a severní skupiny, s biogeografickou hranicí v povodí řeky Ucayali, severní skupina zahrnující druhy z její západní části na sever a jižní skupina z její východní části na jih (Obr. 7–10). Cordillera El Sira je tedy hlavní biogeografickou hranicí u rodu *Bujurquina*, což je nové zjištění této práce.

Jižní skupina zahrnuje devět druhů (*B. cordemadi*, *B. eurhinus*, *B. labiosa*, *B. mabelae*, *B. oenolaemus*, *B. robusta*, *B. tambopatae*, *B. vittata*). *Bujurquina beniensis* nebyla zahrnuta do analýzy, pravděpodobně také patří do jižní skupiny, neboť je velmi podobná *B. mabelae* (chybí odlišující diagnostické znaky). Do jižní skupiny patří ještě jeden potenciálně nový druh (*B. sp. Acre*). Většina druhů rodu *Bujurquina* patří do severní skupiny. Všechny fylogenetické vztahy uvnitř jižní skupiny kromě *B. robusta* jsou dobře podporovány (Obr. 9).

Severní skupina zahrnuje většinu druhové rozmanitosti rodu *Bujurquina*, jak z hlediska popsaných druhů (11) tak i z hlediska potenciálně nových druhů (24). Severní skupina je podle současných výsledků a taxonomického vzorkování nejlépe rozdělena do čtyř následujících skupin, označovaných zde jako skupiny S1 až S4.

Skupina S1 zahrnuje sedm taxonů na úrovni druhů, pět z nich jsou popsány druhy (*B. huallagae*, *B. omagua*, *B. ortegai*, *B. pardus*, *B. sypilus*) a dva potenciálně nové druhy (*B. sp. Maicuru*, *B. sp. Middle Pastaza-Morona*). Všechny vztahy ve skupině kromě sesterského vztahu mezi *B. ortegai* a *B. huallagae* jsou dobře podporovány.

Skupina S2 zahrnuje pouze dva vysoce odlišné a geograficky vzdálené druhy, *B. mariae* a *B. sp. Lower Curaray Lorocachi*.

Skupina S3 je počtem druhů a také biogeografií velmi podobná skupině S1. Zahrnuje také sedm taxonů na úrovni druhů, z nichž tři jsou popsány druhy (*B. hophrys*, *B. peregrinabunda*, *B. zamorensis*) a čtyři potenciální nové druhy (*B. sp. Curua*, *B. sp. Lower Huallaga*, *B. sp. Lower Pastaza-Morona*, *B. sp. Shiona-Umbundi*). Většina fylogenetických vztahů v rámci této skupiny je dobře podpořena, výjimkou jsou dva vnitřní uzly mezi *B. peregrinabunda*, *B. hophrys* a *B. sp. Lower Huallaga*.

Skupina S4 je zdaleka druhově nejbohatší skupinou. Zahrnuje 19 morfodruhů, z těchto pouze dva popsány druhy (*B. apoparuana*, *B. moriorum*) a tedy 17 potenciálně nových druhů. Bazální uzel této skupiny (*B. apoparuana* a *B. sp. Manauus* vs. zbytek skupiny) není dobře podpořen a mnoho dalších vnitřních uzlů v této skupině s těsně rozmístěnými internody také není dobře podporováno.

Časový rámeček evoluce a biogeografie *Bujurquina* na základě fylogenetických analýz mtDNA  
Biogeografická analýza s maximálním povoleným počtem oblastí rekonstruuje fylogenezi *Bujurquina* jako převážně vikariantní, tedy fragmentaci široké ancestrální oblasti v bazálním uzlu. Bazální uzel zahrnoval všechny kódované oblasti a je rekonstruován jako vikariantní událost rozdělující rod na jižní a severní skupiny v Cordillera El Sira v povodí Ucayali. Bazální uzel byl analýzami datován na 16,1 milionů let (Ma) (Obr. 9, 95 % HPD 12,1–20,2 Ma). Jižní a severní skupiny jsou tedy ve své distribuci zcela alopatrické s biogeografickou hranicí v

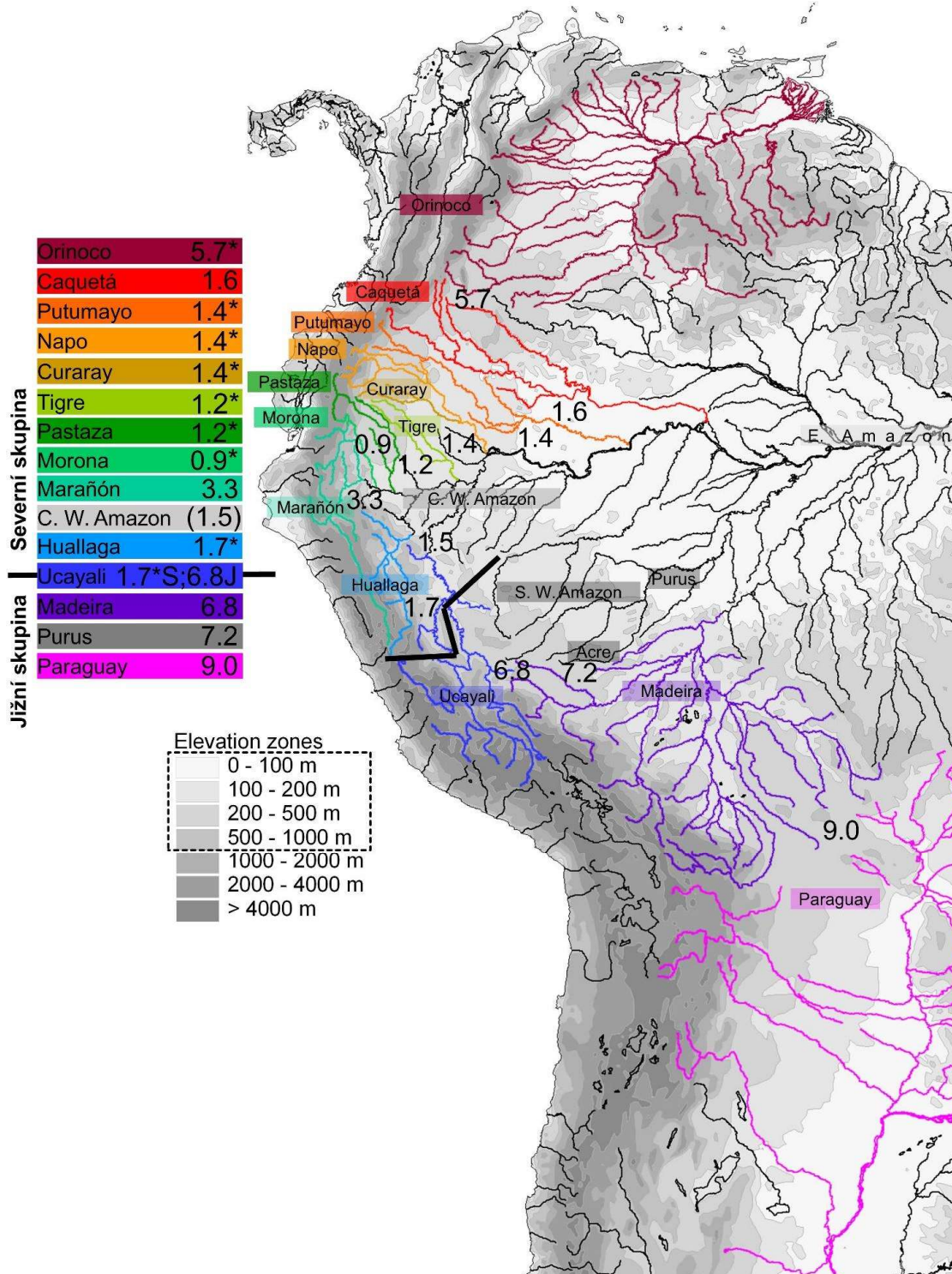
povodí Ucayali. Jižní skupina byla tedy původně rozšířena od současné pánve Ucayali do povodí Paraguaye. Bazální uzel jižní skupiny je datován na 11,4 Ma (95 % HPD 8,1–14,7 Ma, Obr. 9). Jižní skupina se poté rozpadla vikariantními událostmi v pořadí od jihu k severu do svých současných povodí mezi 9 a 6,8 Ma (Obr. 9). První oblastí, která se oddělila, byla Paraguayská pánev před 9 Ma (95 % HPD 6,3–11,6 Ma, Obr. 9, 11), po níž následovalo povodí Acre před 7,2 Ma (95 % HPD 4,8–9,5 Ma, Obr. 9, 11), a vikariance mezi povodím Madeiry a Ucayali před 6,8 Ma (95 % HPD 4,6–9,1 Ma, Obr. 9 a 11).

Severní skupina byla také rekonstruována jako ancestrálně široce rozšířená. Společný předek se tedy vyskytoval ve všech oblastech západní Amazonie a Orinoka severně od západní části současné pánve Ucayali a biogeografický vývoj skupiny byl také většinou formován vikariantními událostmi. Bazální uzel v severní skupině je ve skutečnosti starší než u obecně dříve divergujících druhů jižní skupiny, datovaný na 13,3 Ma (95 % HPD 9,3–17,4 Ma, Obr. 9), kdy diverguje nejstarší skupina v severní skupině, skupina S1, s bazálním uzlem datovaným na 4,2 Ma (95 % HPD 2,5–5,0 Ma, Obr. 9). Nejstarší uzel ve skupinách S1 až S4 se však nachází ve skupině S2, která se od široce rozšířeného předka oddělila před 7,9 Ma (95 % HPD 5,4–10,5 Ma, Obr. 9). Tento nejstarší uzel v rámci skupin S1 až S4 je datován na 5,7 Ma (95 % HPD 3,0–8,4 Ma, Obr. 9) a představuje oddělení pánve Orinoka od západní Amazonie (Obr. 9, 11). Sesterské skupiny S3 a S4 divergovaly až po oddělení povodí Orinoka, a to před 4,7 Ma (95 % HPD 3,3–6,0 Ma) a v široké oblasti západní Amazonie. Bazální uzly těchto skupin jsou datovány na 3,0 (95 % HPD 2,0–4,0 Ma), respektive 4,1 Ma (95 % HPD 2,9–5,2 Ma).

Skupiny S1 a S3 mají podobnou biogeografii (ačkoli ne biogeografickou historii), protože se nacházejí v jižní části centrální západní Amazonie, mezi pánví Ucayali a pánví Tigre, s výjimkami dále na sever až po Napo (kolonizace později než 0,6 Ma v *B. zamorensis*, skupina S3, Obr. 9) a nejhořejší povodí Curaray (vikariance v rámci *B. sp.* Middle Pastaza-Morona později než 0,9 Ma). Skupina S4 má největší zdokumentovanou oblast rozšíření v západní Amazonii, která se nachází mezi nejižnější pánví Ucayali a nejsevernější pánví Caquetá, a je to jediná ze všech čtyř skupin, která se ancestrálně (původně) nachází v povodích Napo, Putumayo a Caquetá a také v Maraňónu, nad Pongo del Manserinche (Obr. 9).

Všechny čtyři severní podskupiny byly založeny na biogeografické rekonstrukci formované převážně vikariantními událostmi. Jednotlivá povodí řek v západní Amazonii se na základě těchto rekonstruovaných vikariantních událostí postupně vytvořila z dříve široké ancestrální oblasti mezi 1,6 a 1,2 mil. let (Obr. 9, 11), přičemž pouze povodí Morony se oddělilo později

před 0,9 mil. let a povodí Marañón dříve, před 3,3 Ma. Všechny tyto nejmladší vikariantní události jsou však závislé na stále nekompletním taxonomickém a geografickém vzorkování.



Obrázek 11: Mapa areálu rodu *Bujurquina* s barevným vyznačením dnešních povodí západní Amazonie, Orinoka a Paragvaye. Barvy povodí jsou na barevné škále od severu k jihu, jak

ukazuje legenda (Obr. 9, 10). Čísla mezi povodími ukazují rekonstruované datování jejich formace ze širokého ancestrálního areálu (Obr. 9). Na mapě je černou čarou vyznačena hranice mezi severní a jižní skupinou v povodí Ucayali. Legenda k výškovému stínování mapy ukazuje rozšíření cichlid z nížin až po typicky 1000 m n. m., výjimečně až 1500 m n. m.

## Diskuse

Říčan a spol. (2023a) představili komplexní studii diverzity rodu *Bujurquina*, která zahrnovala 13 platných a 19 potenciálních nových druhů a představila mnoho nových vhladů do biogeografie rodu a biogeografického vývoje západní Amazonie. Dva potenciálně nové druhy z Říčan a kol. (2023a) byly od té doby popsány jako nové druhy, *B. mabelae* (*B. sp.* Bolivia) a *B. omagua* (*B. sp.* Oran).

V této studii bylo rozšířeno množství vzorků o šest dalších již popsaných druhů (*B. apoparuana*, *B. cordemadi*, *B. hophrys*, *B. huallagae*, *B. ortegai*, *B. pardus*) oproti práci Říčan a kol. (2023a). Tato studie tedy zahrnuje všechny platné druhy kromě jednoho (nedávno popsaného *B. beniensis*). Dále je zahrnuto devět dalších potenciálně nových druhů (*B. sp.* Acre, *B. sp.* Lower Curaray Lorocachi, *B. sp.* Lower Huallaga, *B. sp.* Marañón cf. Lower Santiago, *B. sp.* Marañón interrupted line, *B. sp.* Marañón ocellated, *B. sp.* Middle Curaray, *B. sp.* Pambantza, *B. sp.* Shiona). Navíc tato práce obsahuje sekvence ze sedmi dalších dříve zahrnutých (Říčan a kol. 2023a) pravděpodobných nových druhů (*B. sp.* Aguarico-Napo, *B. sp.* Lower Pastaza-Morona, *B. sp.* Maicuru, *B. sp.* Middle Pastaza-Morona, *B. sp.* Napo, *B. sp.* Upper Coca, *B. sp.* Upper Napo), a upřesňuje v několika případech jejich areály rozšíření.

Nejdůležitějšími nově přidanými druhy v této práci jsou dva dříve chybějící druhy ze západní části povodí Ucayali (*B. apoparuana* a *B. hophrys*). Na základě fylogenetické analýzy mtDNA (Obr. 8, 9) jsou *B. apoparuana* a *B. hophrys* součástí severní skupiny (nejsou si blízké příbuzné, první se nachází ve skupině S4 a druhý ve skupině S3). Na základě jejich zahrnutí byla v této studii identifikována přesnější poloha biogeografické bariéry mezi severními a jižními skupinami rodu *Bujurquina*, Cordillera el Sira, která dělí povodí Ucayali na dvě oblasti. Je zajímavé, že sesterský rodu *Bujurquina*, rod *Tahuantinsuyoa*, je endemický pouze pro stejnou část povodí Ucayali jako oba nově zahrnuté druhy. Třetí druh *Bujurquina* nalezená v západní části povodí Ucayali, *B. megalospilus*, byl doposud i po všech snahách o sekvenování nalezen zanořený v druhu *B. syspilus*, což pravděpodobně souvisí se sweepem mtDNA mnohem hojnějším a širěji rozšířeným *B. syspilus* (Říčan a kol., 2023a). Stejný mtDNA sweep zahrnuje

také některé jedince *B. robusta*, z jižní skupiny. U tohoto druhu se ale podařilo osekvenovat u některých exemplářů i jejich původní mtDNA (Říčan a kol., 2023a, Obr. 8, 9).

Rozdělení severní a jižní skupiny rodu *Bujurquina* na základě jejich charakteristického zbarvení je méně jasné, než bylo původně zjištěné (Říčan a kol., 2023a), protože *B. apoparuana* a *B. hophrys* jsou podle mtDNA fylogeneze druhy severní skupiny, přestože nemají vzorované hřbetní ploutve (stejně jako všechny druhy v jižní skupině a na rozdíl od všech ostatních druhů v severní skupině).

Dalším důležitým přírůstkem v této studii jsou druhy z povodí Huallaga (*B. huallagae*, *B. ortegai*, *B. sp.* Lower Huallaga) a povodí Tigre (*B. pardus*, *B. sp.* Pambantza, *B. sp.* Shiona). Tyto druhy a říční povodí nebyly zastoupeny v předchozí studii (Říčan a kol., 2023a). *Bujurquina huallagae* a *B. ortegai* jsou sesterskými druhy ve skupině S1, zatímco *B. sp.* Lower Huallaga je sesterským druhem *B. hophrys* ve skupině S3.

Druhy z povodí Tigre, i když se vyskytují v rozsáhlé míře sympatricky a dokonce v týchž malých potocích parapatricky, nejsou na základě mtDNA blízce příbuzné (Obr. 8, 9). *Bujurquina pardus* se nachází ve skupině S1, *B. sp.* Shiona ve skupině S3 a *B. sp.* Pambantza ve skupině S4.

Nově zařazené druhy z povodí Marañón (*B. sp.* Marañón interrupted, *B. sp.* Marañón ocellated, *B. sp.* Marañón cf. Lower Santiago) na rozdíl od výše uvedených situací v povodí Ucayali a Huallaga, tvoří monofyletickou skupinu. Ale v tomto případě druhy nejsou vzájemně monofyletické, kromě geograficky nejvzdálenějšího druhu (*B. sp.* Lower Santiago) z povodí Santiaga v severní části povodí.

Geneticky nejvzdálenějším druhem nově zařazeným do severní skupiny je morfologicky velmi odlišný pravděpodobně nový druh *B. sp.* Lower Curaray Lorocachi, který je sesterskou skupinou *B. mariae*, jediný známý druh z povodí Orinoka. Tyto dva druhy tvoří vlastní linii v rámci severní skupiny, skupiny S2 (Obr. 9).

Do jižní skupiny patří dva nově přidané druhy, *B. cf. cordemadi* a *B. sp.* Acre z jednoho z pramenů v povodí řeky Rio Acre, které je součástí samostatného povodí jihozápadní Amazonie, povodí Purus. Tyto druhy přinášejí nové zajímavé poznatky o vývoji západní Amazonie, stejně jako všechny nově zahrnuté druhy z povodí Ucayali, Huallaga a Tigre.



### Endemismus v rodě *Bujurquina*

Endemismus v rodě *Bujurquina* je překvapující svou mírou, druhy jsou vysoce endemické, zřídka se vyskytují v celých povodích nebo dokonce v několika povodích, ale naopak se typicky vyskytují pouze v částech jednotlivých povodí nebo vzácněji v částech sousedních povodí (Obr. 7, 10). Přidání nových vzorků v této studii dokonce tento biogeografický vzorec posiluje ve srovnání s Řičanem a kol. (2023a). Ze 45 zařazených druhů je skutečně široce rozšířen pouze jeden druh, ale stále pouze v jediném, přesto velkém povodí (*B. vittata* v povodí Paraguay-Dolní Paraná). Geografické limity rozšíření jediného druhu v povodí Orinoka (*B. mariae*) nejsou dobře známy, na základě současných znalostí se zdají být široké, ale nové druhy v této pánvi jsou známy (Řičan, nepublikovaná data, nejsou zahrnuta do této studie) a očekávány. Stále široce rozšířené jsou pak druhy ve střední západní Amazonii (*B. moriorum*, *B. syspilus*, pravděpodobně i *B. peregrinabunda*), což je přímým důsledkem nížinného charakteru této oblasti.

Čtyřicet ze 45 druhů je tedy vysoce endemických (Obr. 7, 9, 10). Geografický endemismus (podle povodí) je umocněn též endemismem ekologickým neboli stanovištním, neboť druhy v rodě *Bujurquina* lze rozdělit na dva ekologické typy jak na základě jejich ekologických stanovišť, tak i morfologie a zejména tělesných proporcí (Řičan a kol., 2023b). V tomto ohledu existují v rodě *Bujurquina* dvě samostatné skupiny endemismu, jedna v podhůří And (druhy endemické v horských oblastech, horních částech povodí nebo jejich částí) a druhá v nížinách (druhy endemické v nížinných částech povodí nebo jejich částí) (Obr. 7, 9, 10). Existují některé přechodné situace, jako například ve středních částech říčních povodí, především tam, kde jsou více než dva druhy nacházející se podél výškového gradientu v jednom říčním povodí (např. v Ucayali, Pastaza, Tigre nebo některých jiných povodích, Obr. 10), dále u druhů nalezených v habitatech terra firme (výše položené nezáplavové oblasti nížin) (které napodobují horské morfologie) oproti skutečným nížinným druhům v zaplavovaných oblastech nebo v nížinných habitatech nalezených v rovinatých plošinách horských oblastí (Řičan a kol., 2023b).

Biogeografie a datování diverzifikace *Bujurquina* se zaměřením na nově přidané druhy a oblasti

Biogeografická historie *Bujurquina* v západní části Jižní Ameriky, zejména v západní Amazonii, je rekonstruována jako sled převážně vikariantních událostí. Tento typ biogeografické historie je zvláště informativní o formování krajiny, v tomto případě ve zkoumané oblasti.

V biogeografické rekonstrukci v této práci je identifikováno několik významných událostí v biogeografickém vývoji západní Jižní Ameriky, které byly postulovány a doloženy na základě geologických a paleontologických informací, ale byly velmi zřídka studovány a potvrzeny biogeografickými studii živých organismů (Hoorn a Wesselingh 2010a, b, Albert a Reis, 2011, Wesselingh a Hoorn, 2011, Albert a kol., 2018). Cichlidy s nízkými schopnostmi šíření a vysokým endemismem jsou velmi vhodným modelovým organismem, jak je dobře známo (Řičan a kol., 2023a) a jak ukazují výsledky této práce.

V nejširším měřítku prošlo povodí Amazonky významnou paleogeografickou a paleohabitatovou proměnou. Povodí Amazonky se postupně přeměnilo z původně dlouho existujícího paleo-povodí Amazonky, které teklo z jihu na sever (J-S) podél východní strany stoupajících And, k dnešnímu povodí Amazonky tekoucímu západovýchodně (Z-V) (Hoorn a Wesselingh 2010a, b, Albert a Reis, 2011, Albert a kol., 2018, Řičan a kol., 2023a). Tato změna z dlouhodobě existující západní paleo-Amazonie do moderní Amazonie byla způsobena vlivem stoupajícího pohoří And a jejich sedimentů v amazonských nížinách. Tyto nánosy sedimentů, o mocnosti v západní centrální Amazonii několika kilometrů, postupně přes systém velkých mokřadů (Pebas, Acre) přetvořily západní Amazonii a změnily její sklon, až přibližně před 7 mil. let západní Amazonská pánev prolomila a přelila se přes prastaré bariéry v povodí Amazonky (oblouky mezi prastarými štíty) a tak postupně vytvořila moderní na východ tekoucí povodí řeky Amazonky. Tato transformace a následné odvodnění západní Amazonie je jasně viditelná v biogeografické rekonstrukci fylogeneze *Bujurquina* v této práci (Obr. 9, 11).

Původní paleo-povodí Amazonky tekoucí z jihu na sever bylo ohraničeno významnými geografickými a geologickými prvky Jižní Ameriky, starými štíty Guayanské a Brazílské vysočiny na východě, a stoupajícími Andami na západě. Konkrétně bylo povodí Amazonky ohraničeno tzv. strukturálními oblouky, což jsou nízko položené geologické spoje mezi starými štíty na východě a vůči stoupajícímu pohoří And na západě (Hoorn a Wesselingh 2010a, b, Albert a Reis, 2011, Wesselingh a Hoorn, 2011, Albert a kol., 2018).

Původní paleo-povodí Amazonky směřující z jihu na sever bylo podle geologických znalostí fragmentováno třemi strukturálními oblouky, které začaly určovat konfiguraci moderních povodí řek tím, že rozdělily paleo-povodí Amazonky na samostatné povodí Paraguy (na oblouku Michicola), na povodí Orinoka (na oblouku Vaupes), a západní Amazonie (mezi oblouky Michicola a Vaupes), s následným rozdělením západní Amazonie na jižní a severní části (na oblouku Fitzcarrald). Všechny tyto geologicky identifikované změny jsou jasně rekonstruovány ve fylogenezi rodu *Bujurquina*, jak již popsal Říčan a kol. (2023a), s některými doplňky a změnami způsobenými rozšířením vzorkování taxonů v této studii.

Rozdělení Paleo-povodí Amazonky na samostatné povodí Paraguy a Amazonky (na oblouku Michicola) se podle biogeografické rekonstrukce a molekulárního datování v rodu *Bujurquina* v této práci odehrálo před 9 miliony let (95 % HPD 6,3–11,6 milionu let, Obr. 9 a 11). V práci Říčan a kol. (2023a) to bylo datováno na 10,2 milionu let. Jak 9 milionů let, tak 10,2 milionu let s jejich intervaly spolehlivosti se velmi dobře shodují s geologickým datováním vzniku této přírodní bariéry (Lovejoy a kol., 2010, Carvalho, 2011).

Na severním konci původního paleo-povodí Amazonky se oddělení povodí Orinoka od povodí Amazonky (na oblouku Vaupes) odehrálo podle biogeografické rekonstrukce a molekulárního datování v rodě *Bujurquina* v této práci před 5,7 milionu let (95 % HPD 3,0–8,4 milionu let, Obr. 9), zatímco v Říčan a kol. (2023a) bylo datováno na 7,9 milionu let. Nové datum je způsobeno zahrnutím potenciálně nového druhu *B. sp. Lower Curaray Lorocachi*. Zatímco oddělení povodí Orinoka v práci Říčan a kol. (2023a) vypadalo geograficky velmi jednoduše díky izolované fylogenetické pozici jediného druhu z Orinoka *B. mariae*, s rozšířením vzorkování taxonů se tento scénář oddělení povodí Orinoka nyní stává složitější, protože oddělení povodí Orinoka se nyní nachází ve skupině pouze dvou biogeograficky velmi vzdálených druhů. Zřejmě je tedy tato skupina, která zahrnuje dosud pouze tyto dva druhy (skupina S2), z hlediska oddělení povodí Orinoka velmi zajímavá a vyžaduje další terénní

práci k nalezení potenciálně neobjevených druhů z této skupiny, které by mohly lépe definovat biogeografické oddělení povodí Orinoka a Amazonky. Nehledě na tyto komplikace, rekonstruovaná data oddělení stejně jako jejich intervaly spolehlivosti v této práci souhlasí s daty pro oddělení obou povodí postulovanými v geologické literatuře jako obecně počínající od data 8 milionů let (Mora a kol. 2010, Winemiller a Willis, 2011).

S oddělením povodí Paragvaje a Orinoka začalo vznikat nové povodí Amazonky, které začalo měnit svůj tok z původního J-S směru na nový Z-V směr. Tato změna směru toku byla doprovázena dalším rozpadáním areálu západní Amazonky, a tradičně výraznou roli v této fragmentaci bylo dělení povodí na oblouku Fitzcarrald, který nyní odděluje povodí řek Madeira, Purus, Jurua a Ucayali a tím rozděluje jižní (Madeira), východní (Purus, Jurua) a severní části (Ucayali) v rámci jižní části západní amazonky (Espurt a kol., 2007, Mora a kol., 2010, Roddaz a kol., 2010, Hoorn a kol., 2010a, b). V původní analýze rodu *Bujurquina* (Říčan a kol., 2023a) byly zahrnuty pouze druhy z povodí Ucayali a Madeiry a jejich rozdělení bylo datováno na 8,4 milionu let. V této studii je navíc přidán potenciální nový druh z povodí Purus (*B. sp. Acre*), díky kterému je identifikováno oddělení povodí Ucayali a Madeiry před 6,8 milionu let (95 % HPD 4,6–9,1 milionu let, Obr. 9, 11) a oddělení povodí Purus od těchto dvou před 7,2 milionu let (95 % HPD 4,8–9,5 milionu let). Podpora tohoto pořadí událostí v této fylogenezi není statisticky dostatečně silná ( $bpp < 0,95$ ) a obě události lze považovat za prakticky současné. Zatímco obě data jsou o něco mladší než v původním datování (8,4 milionu let, Říčan a kol., 2023a), tato data jsou stále starší než předpokládaný vznik oblouku Fitzcarrald, u kterého je obecně považováno, že se začal formovat před 4 miliony let (např. Espurt a kol., 2007, Regard a kol., 2009, Hoorn a kol., 2010a, b). Ale hřeben Nazca Ridge, který způsobuje vznik oblouku Fitzcarrald plochou subdukci pod Jižní Ameriku, začal svou subdukci mnohem dříve, přibližně před 11,2 miliony let na 11°S, s aktuální polohou subdukce na 15°S (Hampel, 2002). Geologické datování oblouku Fitzcarrald tedy není přesné, uvádí se jako ne starší než pliocén (2,6–5,3 milionu let) na základě kombinace datování ukončení sopečné aktivity v sousedních Andách (4 miliony let) a sedimentů a geomorfních markrů, které jsou pliocenní a pleistocenní (Espurt a kol., 2007). Pro málo disperzní ryby jako *Bujurquina* by již nižší změna nadmořské výšky na vznikajícím oblouku byla dostatečnou bariérou, než by mohly být takové změny detekovány u jiných organismů s vyšší schopností disperze nebo dokonce u změn sedimentace a dalších geologických indikátorů. Druhou možností je, že nedostatečné vzorkování taxonů způsobuje odlišná data divergence (výsledky o oddělení

povodí Orinoko). Další možností je, že kalibrace molekulárních hodin navrhuje datum události, které je příliš brzké (ale intervaly spolehlivosti se ve skutečnosti přibližují 4 miliony let geologického data). Zde je ale třeba upozornit na shodu výsledků datování v této práci a v literatuře u oblouků Vaupes a Michicola.

Kromě těchto tradičně diskutovaných geografických oblastí dělení původní J-S orientované paleoamazonky na moderní Amazonku fylogenetický strom rodu *Bujurquina* v této práci a rekonstruovaná biogeografie ve skutečnosti poskytují důkazy o dalších důležitých bariérách a také o formaci kompletního moderního říčního systému povodí západní Amazonie. Tyto rekonstrukce jsou tak detailní díky vysokému endemismu druhů v tomto rodu a také díky hustému biogeografickému vzorkování (Obr. 9, 11). Nově identifikované zóny divergencí v západní Amazonii ve fylogenezi *Bujurquina* jsou Guyuská plošina u severní skupiny *Bujurquina* a hraniční zóna mezi jižní a severní skupinou *Bujurquina* v povodí Ucayali. Nově identifikovaná bariéra v rámci povodí Ucayali, Cordillera el Sira, na základě datování rozdělila dvě hlavní skupiny rodu *Bujurquina* před 16,1 miliony let (95 % HPD 12,1–20,2 milionů let, Obr. 9, 11), a ukazuje, jak složitá byla formace povodí Ucayali, nejdelší současné osy řeky Amazonky. V časovém rámci mezi 16 miliony let a vznikem moderního říčního povodí kolem 4 až 8 milionů let zjevně Ucayali neexistovalo jako jedno povodí. Jeho východní a jižní části sdílely faunu *Bujurquina* (a tím pravděpodobně i hydrologické uspořádání) na jih od této oblasti, zatímco jeho západní a severní části tvořily samostatná říční povodí se spojením s faunou severní skupiny *Bujurquina*.

Formace říčních povodí v severní části Západní Amazonie na základě nové fylogeneze *Bujurquina* s se zaměřením na teritorium Ekvádoru

Nejhustší vzorkování rodu *Bujurquina* v této práci pochází z Ekvádoru, ale na rozdíl od předchozí studie (Říčan a kol., 2023a) se nyní zdá stále více pravděpodobné, že velká diverzita druhů *Bujurquina* v Ekvádoru není pouhým výsledkem malého vzorkování v sousedních zemích, ale reálným jevem, protože v této studii bylo zlepšeno vzorkování zejména v sousedním Peru, ale nebyla nalezena tak velká a lokalizovaná diverzita druhů *Bujurquina* jako v Ekvádoru. Zatímco současná říční síť ekvádorské Amazonie má jasný směr toku západovýchodní, rekonstrukce paleogeografie na základě biogeografie *Bujurquina* je směrem jih-sever. Na základě datování molekulárních hodin restrukturalizace původně jižně-severního povodí do sítě řek směřujících západovýchodně nastala před 8 miliony lety mimo

Ekvádor (oddělení okolních povodí na sever a na jih) a před 4,7 miliony lety v rámci Ekvádoru (Obr. 9). Konečné zformování moderních řek a povodí proběhlo mezi 3,3 a 0,9 miliony lety (Obr. 9, 11). V Říčan a kol. (2023a) je diskuse o spojení mezi říčními povodími s ještě mladšími daty na základě fylogeografie v rámci druhů, ale v tomto ohledu data v této práci neposkytují mnoho nových poznatků.

Hlavní příčinou přeměny říčního povodí v Amazonce je zřejmě obecné zvedání se And (Hoorn a Wesselingh 2010a, b, Albert a Reis 2011, Albert a kol. 2018) a v případě Ekvádoru Guayusa platformy s tím spojené (Longo a Baldock 1982, Říčan a kol. 2023a). Guayusa platforma je výsledkem podsouvání Carnegieova hřebene (Carnegie Ridge, běžícího od Galapážského hřbetu na východ pod Jižní Ameriku) pod západní Jižní Ameriku a pod Andy v oblasti, která v podstatě definuje území Ekvádoru (Říčan a kol., 2023a). Guayusa platforma sdílí stejný mechanismus původu a je tak podobnou strukturou jako lépe známý Fitzcarrald Arch v Peru (Espurt a kol. 2007, Regard a kol. 2009, Hoorn a kol. 2010a, b). Datování subdukce Carnegieova hřebene pod Jižní Ameriku není přesné, datuje se od asi středního miocénu (15 Ma, Spikings a kol., 2001) po pleistocén (2 Ma, Gutscher a kol., 1999), a nepodařilo se nám najít žádné přesné datování původu Guayusa platformy samotné v literatuře, ale sedimenty nalezené na vrcholu Guayusa platformy jsou miocénní/pliocenní (5 Ma) až pleistocenní, na rozdíl od okolních miocénních sedimentů v přilehlých nížinách. Sedimentologická situace je tedy stejná jako u Fitzcarrald archu (Espurt a kol. 2007).

Podobně jako lépe známé Fitzcarrald nebo Vaupes oblouky, Guayusa platforma také odděluje pramenné oblasti hlavních přítoků a zdrojových oblasti Amazonky (Longo a Baldock 1982, Říčan a kol., 2023a). Odděluje pánve Napo od pánve Pastaza, dále odděluje pánvi Morona od pánve Pastaza, a v oblasti mezi Napo a Pastaza také odděluje horní toky řeky Napo a jejího hlavního přítoku, řeky Curaray, a odděluje pánvi Tigre. Díky Guayusa platformě a současné konfiguraci pánví Napo a Pastaza nemají pánve Curaray a Tigre spojení s Andami a vznikají na Guayusa platformě. Vliv reliéfu platformy pravděpodobně pokračuje tak daleko na sever, že může být zodpovědný za oddělení pánve Napo od pánve Putumayo (miocénní/pliocenní sedimenty Guayusa platformy pokračují na sever do pánve Aguarico) a dokonce za oddělení pánve Putumayo od pánve Caquetá. Pokud tomu tak je, pak je Guayusa platforma, nebo subdukce Carnegieova hřebene obecně, nejdůležitějším biogeografickým faktorem v celém severozápadní Amazonii, protože odděluje největší počet hlavních přítoků Amazonky od sebe.

Datování vikariantních událostí na Guayusa platformě (Obr. 9) je téměř totožné jako v Řičan a kol. (2023a) a naznačuje, že nejstarší události proběhly v jižní části platformy mezi 4,7 a 3,5 miliony lety, oddělovajícími pánve Santiaga, Morony a Pastaza od sebe a od Napo (včetně Curaray). Výsledky této práce také zahrnují pánvi Tigre do těchto událostí, s trochu mladšími daty, které jsou mezi těmi více na jih a více na sever. Oddělení pánví na sever probíhalo postupně na sever, jak je lze očekávat od subdukce Carnegieova hřebene směrem k severovýchodu (Gutscher a kol. 1999). Směrem k severovýchodu je nadmořská výška Guayusa platformy postupně nižší a subdukce mladší, a tudíž vliv na oblast musí být mladší. Konečné oddělení Curaray od Napo, Tigre, Putumayo a Caquetá proběhlo podle datování v této práci téměř ve stejný čas (nízká fylogenetická spolehlivost v pořadí mnoha relevantních uzlů, Obr. 9) v úzkém časovém okně mezi 3,3 a 1,2 miliony lety (Obr. 9, 11).

Na základě nově přidaných druhů z povodí řeky Huallaga se tato pánev formovala jako samostatná jednotka ve stejné době jako ekvádorské říční pánve a pánve Putumayo a Caquetá na sever. Datování formace pánve Huallaga v této práci vychází na 2,2, 1,7 a 1,5 milionu let (Obr. 9, 11).

#### Nerozpoznaná druhová diverzita v rodě *Bujurquina*

Výsledky této práce jednoznačně ukazují, že druhová diverzita rodu *Bujurquina* napříč jeho geografickým rozšířením je významně podhodnocena, zejména v Ekvádoru, jehož území zahrnuje pouze tři platné druhy (*B. pardus* a *B. zamorensis* jsou aktuálně považovány za endemické, a *B. moriorum* je přítomen pouze okrajově, v této studii pouze díky jedné lokalitě z povodí Tigre na ekvádorském území). Výsledky této práce ukazují na přítomnost až 18 druhů v Ekvádoru. Nejbohatší zemí na druhy rodu *Bujurquina* zůstává Peru, s až 20 druhy ve výsledcích této práce, ale na mnohem větším území než má Ekvádor, a s mnohem nižším podílem potenciálně nových druhů (7 pravděpodobně nových, 13 již popsanych). U mnoha druhů, které jsou v současnosti známy pouze z Ekvádoru, je ale pravděpodobné, že budou nalezeny i v Peru, neboť velké části peruánského území Loreta jsou stále nedostatečně vzorkovány a u materiálu, který je sbírán, chybí vzorky DNA a fotografie živých ryb, což jsou oba nezbytné předpoklady pro robustní taxonomické řešení. Celkový poměr nově objevených druhů k počtu zahrnutých už popsanych druhů v této studii je velmi vysoký, 125 % (25 nových / 20 platných).

Tento poměr je vysoký, ale ve skutečnosti není výjimečný ve srovnání s jinými dobře studovanými skupinami jihoamerických cichlid (např. Kullander a Ferreira, 2006, Willis a kol., 2012, 2013, Říčan a kol. 2021, 2023a). U rodu *Crenicichla*, největšího rodu jihoamerických cichlid (něco přes 100 platných druhů), byl minimální procentní nárůst nepoznaných druhů 65–121 % v závislosti na druhové skupině v rodu (Říčan a kol., 2021). U některých druhových skupin *Crenicichla* byl nárůst druhů mnohem vyšší, 68–168 % (skupina *Saxatilis*), 125–200 % (skupina *Wallacii*) a 158–241 % ve skupině *Lugubris*. Stejně vysoký nárůst druhů byl i v nejlépe prostudované skupině *Lacustris*, což je jediná skupina tohoto velkého rodu, která recentně prošla mnoha studii a jejíž druhová diverzita tak byla z větší části objasněna díky studiu, jak morfologickými tak molekulárními přístupy (za použití mtDNA i jaderné nDNA, fylogenomiky), a poté taxonomicky popsána (viz seznam citací v Říčan a kol., 2021). Vyjímkou výrazného nárůstu druhové diverzity nejsou ani rody velkých cichlid jako *Cichla* (nárůst 150 %, ze šesti druhů na 15, Kullander a Ferreira, 2006, Willis a kol., 2012, 2013).

V přehledové studii od Reis a kol. (2016) založené na objevech druhů napříč všemi skupinami neotropických sladkovodních ryb bylo konzervativně odhadnuto, že 34–42 % neotropických sladkovodních ryb zůstává nepopsáno. Reis a kol. (2016) lokalizovali většinu nepoznané diverzity do povodí Amazonky.

Všechny tři hlavní vysvětlení uvedená Reism a kol. (2016) jako důvody nepoznané diverzity neotropických ryb se také vztahují na neotropické cichlidy, včetně této práce:

- 1) nedostatek systematického vzorkování napříč distribucí dané skupiny, zejména v oblastech s obtížným přístupem,
- 2) široce rozšířené taxony nebo heterogenní taxony s nedostatečným množstvím (nebo přemírou muzejního materiálu) nebo nevhodně zachovaným materiálem a informacemi,
- 3) kryptická nebo pseudokryptická (morfologické rozdíly zjevné, ale přehlížené) diverzita v široce rozšířených druzích. Cichlidy jsou barevné a vizuálně orientované ryby. Ztrácejí téměř všechny diagnostické barevné vzory při konzervaci pro muzejní účely, a to je důležitý faktor přispívající k omezení dostupných zachovaných diagnostických znaků. Podrobné fotografie dostatečného počtu živých jedinců pořízené v terénu ihned po odchytu jsou stále velmi zřídka pořizovány v obecných terénních průzkumech a v existujících sbírkách, tak obvykle chybí řádně zdokumentované zbarvení, což výrazně omezuje užitečnost těchto sbírek.



## Citace

- Albert, J. S., Reis, R. E., (eds.) (2011). Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. University of California Press, Berkeley CA.
- Albert, J. S., Val, P., Hoorn, C., (2018). The changing course of the Amazon River in the Neogene: center stage for Neotropical diversification. *Neotropical Ichthyology*, 16, e180033.
- Angulo, A., San Gil-León, J., (2022). Claves para la identificación de los peces de las aguas continentales e insulares de Costa Rica. Parte II: Cichliformes, Cichlidae (Mojarras, Guapotes, Tilapias y afines). *UNED Research Journal*. 12.
- Balshine, S., Abate, M. E., (2021). Parental care in cichlid fishes. The behavior, ecology and evolution of cichlid fishes, 541-586.
- Balshine, S., Abate, M., E., (2021). *Frontiers in Cichlid Research: A History of Scientific Advancement* str. 541.
- Barlow, G.W., (2000). The cichlid fishes: nature's grand experiment in evolution. Perseus, Cambridge, MA.
- Berra, T.M., (1997). Some 20th century fish discoveries. *Environmental Biology of Fishes* 50, 1–12.
- Careaga, M., Miranda, G., Carvajal-Vallejos, F. M., (2023). Description of two new species of Bujurquina (Teleostei: Cichlidae) from the Bolivian Amazon. *Neotropical Ichthyology*, 21, e220093.
- Carstens, B. C. Dewey, T. A., (2010). Species delimitation using a combined coalescent and information-theoretic approach: an example from North American *Myotis* bats. *Systematic Biology* 59: 400–414.
- Carvalho, T., (2011). The Amazon-Paraguay Divide. In Albert, J. S. & R. E. Reis (eds), *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. University of California Press, Berkeley CA: 193-202.
- Coleman, R. M., Galvani, A. P., (1998). Egg Size Determines Offspring Size in Neotropical Cichlid Fishes (Teleostei: Cichlidae). *Copeia*, 1998(1), 209–213.
- Drummond, A., J., Rambaut, A., (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Espurt, N., Baby, P., Brusset, S., Roddaz, M., Hermoza, W., Regard, V., Antoine, P. O., Salas-Gismondi, R., Bolaños, R., (2007). How does the Nazca Ridge subduction influence the modern Amazonian foreland basin? *Geology* 35 (6): 515.

- Fontaneto, D., Herniou, E. A., Boschetti, C., Caprioli, M., Melone, G., Ricci C., Barraclough, T. G., (2007). Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *PLoS Biology* 5: e87.
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N., Fongm, J. D., (2020) Eschmeyer's catalog of fishes: genera/species by family/ subfamily name.
- Fujisawa, T., Barraclough, T. G., (2013). Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Systematic Biology* 62: 707–724.
- Gutscher, M. A., Malavieille, J., Lallemand, S., Collot, J. Y., (1999). Tectonic segmentation of the North Andean margin: impact of the Carnegie Ridge collision. *Earth and Planetary Science Letters* 168 (3–4): 255–270.
- Hampel, A., (2002). The migration history of the Nazca Ridge along the Peruvian active margin: a re-evaluation. *Earth and Planetary Science Letters* 203 (2): 665–679.
- Helfman, G., Collette, B. B., Facey, D. E., Bowen, B. W., (2009) *The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology*. Wiley, Hoboken, NJ.
- Hoorn, C., Wesselingh, F. P., (2010b). Introduction: Amazonia, Landscape and Species Evolution. In In Hoorn C. & F. P. Wesselingh (eds), *Amazonia: Landscape and species evolution: a Look into the past*.
- Hoorn, C., Wesselingh, F. P., (eds.), (2010a). *Amazonia: Landscape and species evolution: a Look into the past*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK.
- Keenleyside, M., (1991). Care Parental. Pp. 191-208 in M Keenleyside, ed. *Cichlid Fishes: Behavior, Ecology and Evolution*. London: Chapman and Hall.
- Kelber, D., (1999). Tucunaré, uma paixão internacional. *Arte a Ciência*.
- Kullander, S. O., (1986). Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru. Department of Vertebrate Zoology, Research Division, Swedish Museum of Natural History, 428 p.
- Kullander, S. O., (1998). A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*.
- Kullander, S. O., Ferreira, E. J. (2006). A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 17(4), 289-398.
- Kullander, S.O., (2003). Cichlidae (Cichlids). p. 605-654. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.

- Longo, R., Baldock, J., (1982). National Geological Map of the Republic of Ecuador, 1:1 000 000.
- Lovejoy, N. R., Willis, S. C., Albert, J. S., (2010). Molecular Signatures of Neogene Biogeographical Events in the Amazon Fish Fauna. In Hoorn C. & F. P. Wesselingh (eds), *Amazonia: Landscape and Species Evolution*.
- Matschiner, M., Böhne, A., Ronco, F., Salzburger, W., (2020). The genomic timeline of cichlid fish diversification across continents. *Nature Communications*. 11. 5895.
- McConnell, M., (2021). *Frontiers in Cichlid Research: A History of Scientific Advancement* str.13.
- Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. G. J., Lees, D. C., Ranaivosolo, R., Eggleton, P., Barraclough, T. G., Vogler, A. P., (2009). Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology* 58: 298–311.
- Mora, A., Baby, P., Roddaz, M., Parra, M., Brusset, S., Hermoza, W., Espurt, N., (2010). Tectonic History of the Andes and Sub-Andean Zones: Implications for the Development of the Amazon Drainage Basin. In Hoorn C. & F. P. Wesselingh (eds), *Amazonia: Landscape and Species Evolution*.
- Musilová, Z., Říčan, O., Říčanová, Š., Janšta, P., Gahura, O., Novák, J., (2015). Phylogeny and historical biogeography of trans-Andean cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae). *Vertebrate Zoology* 65: 333–350.
- Nelson, C. M., (1995). Male size, spawning pit size and female mate choice in a lekking cichlid fish. *Animal Behaviour*. 50(6), 1587-1599
- Nelson, J. S., Grande, T. C., Wilson, M. V. H., (2016) *Fishes of the world*, 5th edn. John Wiley and Sons, Hoboken
- Nylander, J. A. A., (2004). MrModeltest 2.2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
- Palumbi, S., (1991). *Simple fool's guide to PCR*.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D., Vogler, A. P., (2006). Sequence based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55: 595–609.
- Powell, J. R., (2012). Accounting for uncertainty in species delineation during the analysis of environmental DNA sequence data. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 1–11.

- Rambaut, A., Drummond, A. J., (2007). Tracer 1.5.0. [Available on internet at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>].
- Regan, C. T., (1905) A revision of the fishes of the South-American cichlid genera Acara, Nannacara, Acaropsis, and Astronotus. *Annals and Magazine of Natural History*, 7 15: 329-347.
- REGARD, V., LAGNONS, R., ESPURT, N., DARROZES, J., BABY, P., RODDZ, M., CALDERON, Y., HERMOZA, W., (2009). Geomorphic evidence for recent uplift of the Fitzcarrald Arch (Peru): A response to the Nazca Ridge subduction. *Geomorphology* 107 (3–4): 107–117
- Reis, R. E., Albert, J. S., Di Dario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., Rocha, L. A., (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology* 89: 12–47.
- Roddaz, M., Hermoza, W., Mora, A., Baby, P., Parra, M., Christophoul, F., Brusset, S., Espurt, N., (2010). Cenozoic Sedimentary Evolution of the Amazonian Foreland Basin System. In Hoorn C. & F. P. Wesselingh (eds), *Amazonia: Landscape and Species Evolution*.
- Říčan O., Piálek L., Dragová K., Novák J., (2016) Diversity and evolution of the Middle American cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) with revised classification. *Vertebrate Zoology* 66(1): 1-102.
- Říčan, O. (2017). Sympatry and syntopy of cichlids (Teleostei: Cichlidae) in the Selva Central, upper Ucayali river basin, Peru. *Check list*, 13(3), 1-11.
- Říčan, O., Dragová, K., Almirón, A., Casciotta, J., Gottwald J., Piálek, L., (2021). MtDNA species-level phylogeny and delimitation support significantly underestimated diversity and endemism in the largest Neotropical cichlid genus (Cichlidae: *Crenicichla*). *PeerJ* 9: e12283.
- Říčan, O., Pangrácová, A., Haro, C. E. R., Říčanová, Š. (2023b). Repeated ecomorphological divergence in Bujurquina (Teleostei: Cichlidae) body shape. *Journal of Vertebrate Biology*, 72(23004), 23004-1.
- Říčan, O., Říčanová, Š. (2023). A new highly apomorphic species of Bujurquina (Teleostei: Cichlidae) from a reverse flowing river in the Peruvian Amazon, with a key to the species in the genus. *European journal of taxonomy*, 870, 167-201.
- Říčan, O., Říčanová, Š., Rodriguez Haro, L.R., Rodriguez Haro, C.E., (2023a). Unrecognized species diversity and endemism in the cichlid genus Bujurquina (Teleostei: Cichlidae) together with a molecular phylogeny document large-scale transformation of the western Amazonian river network and reveal complex paleogeography of the Ecuadorian Amazon. *Hydrobiologia*, 850 (10-11), 2199-2229.

- Spikings, R. A., Winkler, W., Seward, D., Handler, R., (2001). Along-strike variations in the thermal and tectonic response of the continental Ecuadorian Andes to the collision with heterogeneous oceanic crust. *Earth and Planetary Science Letters* 186 (1): 57–73.
- Swofford, D. L., (2003). PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Vuataz, L., Sartori, M., Wagner, A., Monaghan, M. T., (2011). Toward a DNA taxonomy of Alpine Rhithrogena (Ephemeroptera: Heptageniidae) using a mixed Yule-coalescent analysis of mitochondrial and nuclear DNA. *PLoS One*, 6(5), e19728.
- Webb, J.F., Maruska, K.P., Butler, J.M., Schwalbe, M.A.B. (2021). The Mechanosensory Lateral Line System of Cichlid Fishes: From Anatomy to Behavior. In: Abate, M.E., Noakes, D.L. (eds) *The Behavior, Ecology and Evolution of Cichlid Fishes*. Fish & Fisheries Series, vol 40. 401-442.
- Wesselingh, F. P., Hoorn, C., (2011). Geological Development of Amazon and Orinoco Basins. In: Albert, J. S. & R. E. Reis (eds), *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley CA: University of California Press: 59-67.
- Willis, S. C., Farias, I. P., Ortí, G. (2013). Multi-locus species tree for the Amazonian peacock basses (Cichlidae: Cichla): Emergent phylogenetic signal despite limited nuclear variation. *Molecular phylogenetics and evolution*, 69(3), 479-490.
- Willis, S. C., Macrander, J., Farias, I. P., Ortí, G. (2012). Simultaneous delimitation of species and quantification of interspecific hybridization in Amazonian peacock cichlids (genus Cichla) using multi-locus data. *BMC evolutionary biology*, 12, 1-24.
- Winemiller, K., Willis, S., (2011). The Vaupes Arch and Casiquiare Canal: Barriers and Passages. In Albert, J. S. & R. E. Reis (eds), *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. University of California Press, Berkeley CA: 225-242.
- Yu, N., Zheng, C., Zhang, Y. P., Li, W. H., (2000). Molecular systematics of pikas (genus Ochotona) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(1), 85-95.
- Yu, Y., Harris, A. J., Blair, C., He, X. J., (2015). RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 87: 46-49.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamatakis, A., (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29: 2869–2876.