

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Molekulární fylogeneze a sekvenování topotypového
materiálu amazonských cichlid**

Bakalářská práce

Jana Suchá

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

Suchá J., 2024. Molekulární fylogeneze a sekvenování topotypového materiálu amazonských cichlid. [Molecular phylogeny and sequencing of Amazon cichlids topotype material. Bc. Thesis in Czech] – 28 p., Faculty of science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech republic.

Annotation

The content of this work is the expansion of knowledge about species diversity and phylogeny in the genera *Krobia* and *Aequidens* using sequencing on one mtDNA gene. Based on the obtained data, a dated phylogenetic analysis and biogeographical analysis were developed and the results were compared with previous studies.

Čestné prohlášení

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

V Českých Budějovicích, dne 12. dubna 2024

.....
Suchá Jana

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli za vedení této práce. Za cenné rady a doporučení, které mi vždy poskytl a nesmírnou ochotu a trpělivost, kterou se mnou po celou dobu práce měl. Dále bych také chtěla poděkovat Radce Piálkové, která mi pomohla s veškerou prací v laboratoři a vše mi ochotně vysvětlila a poradila vždy, když bylo třeba. Nakonec patří poděkování i mé rodině, která mě ve studiu vždy podporovala, ať už finančně, tak společně s mým přítelem hlavně psychicky.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	<i>Cichlasomatini</i>	2
1.1.1	<i>Krobia</i>	2
1.1.2	<i>Aequidens</i>	4
2	Cíle práce	6
3	Metodika	7
3.1	Určení druhů	7
3.2	Původ vzorků, taxonomické a biogeografické pokrytí	7
3.3	Molekulární metody	8
3.4	Fylogenetické analýzy	9
3.4.1	Analýzy datování a fylogenetické inference v programu BEAST	9
3.4.2	Analýzy vymezení druhů pomocí GMYC a PTP	10
3.4.3	Biogeografické analýzy	11
4	Výsledky	12
4.1	Fylogenetické analýzy	12
4.2	Druhová diverzita v rodech <i>Krobia</i> , <i>Aequidens</i> a <i>Cichlasoma</i>	12
4.2.1	<i>Krobia</i>	12
4.2.2	<i>Aequidens</i>	15
4.2.3	<i>Cichlasoma</i>	15
4.3	Fylogenetické vztahy mezi a uvnitř rodů <i>Krobia</i> , <i>Aequidens</i> a <i>Cichlasoma</i>	15
4.4	Datovaná fylogeneze a biogeografická rekonstrukce rodů <i>Krobia</i> , <i>Aequidens</i> a <i>Cichlasoma</i>	17
5	Diskuze	20
5.1	Druhová diverzita <i>Krobia</i> , <i>Aequidens</i> a <i>Cichlasoma</i>	20
5.2	Biogeografie a datování rozšíření areálu v souladu s amazonskou paleogeografií	22
6	Zdroje	24

1 Úvod

Cichlidy představují jednu z největších skupin ryb ve sladkovodních ekosystémech tropických oblastí světa. Jejich druhová početnost zahrnuje minimálně 1700 druhů (Kullander, 2003) a odhadovaný počet se blíží spíše ke 3000 druhům.

Jejich rozšíření zahrnuje jak stojaté, tak tekoucí sladkovodní oblasti a některé obývají i prostředí s brakickou vodou. Jsou však velmi často omezeny pouze na jednu zátoku (jezerní druhy), jednu řeku, či dokonce pouze na přítok této řeky. Je tomu tak z důvodu jejich přizpůsobení na určitý typ prostředí a historii povodí (jezer). Nejvíce druhů se vyskytuje ve sladkých vodách v Africe a Jižní a Střední Americe. Výrazně menší počet druhů obývá Madagaskar, Srí Lanku, Kubu a Írán (Farias 2000, Kullander, 2003).

Cichlidy jsou velice rozmanitá skupina přesto se najde několik znaků, jež je společně odlišuje od ostatních ryb, jako například postranní čára rozdělena na dvě části, či pouze jedna nosní dírka na každé straně hlavy. Mají 7-24 hřbetních trnů a 2-12 trnů v řitní ploutvi (Kullander, 2003).

Jejich velikost se pohybuje od několika mm až po více než metr. Průměrná velikost je však okolo 10-20 cm. Jejich ústní ústrojí je velice specifické a výrazně se liší podle potravy, na kterou se daný druh specializuje. Mezi cichlidami najdeme jak jedince živící se planktonem, živočišnou potravou a malými bezobratlými, tak dravce, kteří se živí rybami a korýši, a také býložravé formy. Čelisti jsou vždy pohyblivé, a tvar zubů se výrazně liší. Neotropické cichlidy mají zuby většinou jednodušší, kónické a většinou s jedním vrcholem, na rozdíl od druhů žijících v Africe, které mají typicky diverzifikované zuby, často ploché, a s mnohonásobnými vrcholy (Kullander, 2003). Další důležitá adaptace, která se u cichlid vyvinula, jsou faryngeální (žaberní) čelisti. Slouží ke zpracování potravy, a právě díky tomuto uzpůsobení patří cichlidy mezi jedny z druhově nejbohatších čeledí. Představují druhou sadu čelistí umístěnou v oblasti hltanu. Vyvinuly se modifikací čtvrtého žaberního oblouku (Mabuchi et al. 2017, Liem, 1991).

Cichlidy jsou pohlavně dimorfní, kdy samice bývá menší než samec a liší se dále ve zbarvení (Kullander, 2003). Mezi druhy a skupinami se výrazně liší i péče o potomky. Většina druhů si staví substrátová hnízda a o potomky se starají jedno nebo obě pohlaví po dobu několika týdnů i po jejich vylíhnutí (Ayisi, 2014). Druhým typem péče o potomky je tzv. mouth breeding, tlamovectví, kdy se jikry inkubují v ústní dutině jednoho z rodičů (Balshine, 1998). Nejčastěji se rozmnožují v párech, není u nich však nijak vzácná polygynie a polyandrie (Ayisi, 2014).

1.1 Cichlasomatini

Rody *Krobia*, *Aequidens* a *Cichlasoma* patří mezi Neotropické cichlidy, jsou klasifikovány v tribu Cichlasomatini, který spolu s tribem Heroini tvoří podčeleď Cichlasomatinae (Kullander, 1998). Rody *Krobia*, *Aequidens* a *Cichlasoma* tvoří jednu monofyletickou skupinu v rámci cichlasomatinů (Musilová a kol. 2008, 2009). Rod *Krobia* vychází jako monofyletický, kdežto rod *Aequidens* zahrnuje rod *Cichlasoma* jako svou vnitřní skupinou, a je tedy parafyletický (Musilová et al. 2008, 2009). Tyto vztahy byly určeny na základě tří (Musilová a kol., 2008) respektive čtyř genů (Musilová a kol., 2009; dvou mitochondriálních a dvou jaderných) a později byly potvrzeny na vícero genech (Lopez Fernandez a kol., 2010) a v práci Ilves a kol. (2017) i pomocí fylogenomiky (Exon-based). Obě tyto studie zahrnovaly ale jen dva až tři druhy v každém ze tří rodů, na rozdíl od prací Musilové a kol. (2008, 2009), kde byly rody zastoupeny mnohem lepším taxon-samplingem.

Výskyt těchto tří rodů pokrývá hlavní biogeografické oblasti Jižní Ameriky, jako je povodí Amazonky nebo Guyanský a Brazilský štít, a v rodě *Cichlasoma* celou Jižní Ameriku na východ od Andského pohoří. Toto činí tribus Cichlasomatini ideálním pro studium historické biogeografie a evolučních procesů v Neotropické oblasti (Musilová et al., 2008).

1.1.1 *Krobia*

Tento rod zahrnuje druhy, které se vyskytují v Guyanské vysočině a jeden druh obývající povodí řeky Xingu (*Krobia xinguensis*) na Brazilské vysočině (Steele, 2013). Žijí převážně v potocích, kde není velký proud a živí se malými bezobratlými (Sleen, 2017). V dospělosti dorůstají průměrně do délky 12,8 cm (Froese, 2017).

Musilová et al. (2008, 2009) potvrdila tento rod jako monofyletický. Dokonce bylo zjištěno, že jeden druh tradičně řazený v rodě *Aequidens* (*A. potaorensis*) je příslušníkem rodu *Krobia*. Není však jisté, který druh z tohoto rodu je nejbazálnější, protože dle MP topologie je to druh *K. sp. Xingu* a dle topologie ML (BI) je to druh *K. potaorensis*.



Obrázek 1: Zástupci rodu *Krobia*. nahoře: *Krobia guianensis* (cichlidamerique.fr), uprostřed: *Krobia* sp. Oyapock (cichlidamerique.fr), dole *Krobia xinguensis* (Dan's fish),

1.1.2 *Aequidens*

Rod *Aequidens* se vyskytuje v celém povodí Amazonky, Orinoka a povodí řek na Guyanské a Brazílské vysočině. Jeden druh, *A. plagiozonatus*, ve vyskytuje i v povodí Paraguaye. V dospělosti dorůstají do maximální délky 20 cm (Froese, 2016) a vajíčka odchovávají na substrátu a některé druhy jsou prvním stupněm tlamovců (Musilová et al. 2008).

Rod *Aequidens* se skládá z vícero fylogenetických linií, které jsou postupně blíže příbuzné rodu *Cichlasoma*. V první linii se nachází endemit z Guyanské vysočiny *A. chimantanus*. Do druhé linie patří především druhy s výraznými barevnými znaky v obličejí a v té poslední se nachází druhy *A. tetramerus* a *A. sp. Jaru*, kteří naopak, obličejové znaky nemají téměř žádné (Musilová et al. 2008, 2009).

Dle Musilové et al. (2009) by tak rod *Cichlasoma* mohl být synonymizován s rodem *Aequidens* na základě analýz od fylogenetických, přes diagnostikovatelnost až po výsledky statistických testů alternativních topologií. Postupná transformace morfologických znaků také naznačuje, že *Aequidens* je předkem rodu *Cichlasoma*. Taxonomie, tedy především druhová diverzita, rodu *Aequidens* je však stále velkou neznámou. Diverzita druhů v tomto rodu je velká a nebyla doposud řádně prostudovaná pomocí molekulárních markerů. Aby bylo možné provádět případné taxonomické změny v tomto rodě, je zapotřebí poznat fylogenezi všech jeho druhů jak na molekulární, tak na morfologické úrovni, a na první část jsem se zaměřila v této práci.



Obrázek 2: Zástupci rodu *Aequidens*. Vlevo nahoře *Aequidens pallidus* (AquaPortail), vlevo dole *Aequidens patricki* ([Les Aqua'Pages de Gabriel](#)), vpravo nahoře *Aequidens tetramerus* (Wikimedia commons), vpravo dole *Aequidens diadema* (rybicky.net)

2 Cíle práce

Osekvenovat na jednom mtDNA genu vzorky poskytnuté školitelem v rodech *Krobia* a *Aequidens*, vypracovat datovanou fylogenetickou analýzu, vypracovat biogeografické analýzy a porovnat biogeografii a fylogenezi těchto rodů s předchozími pracemi. Hlavní přínos práce bude posunout poznání druhové diverzity a fylogeneze v těchto rodech s důrazem na fylogenetickou a taxonomickou pozici topotypového materiálu.

3 Metodika

3.1 Určení druhů

K vymezení druhů byla použita morfologická identifikace druhů s následným vymezením druhů pomocí molekulárního markeru mtDNA cytochromu b (cytb). Exempláře byly určeny do druhů na základě původních popisů, identifikačních klíčů a porovnány s materiálem všech aktuálně uznávaných druhů *Krobia* a *Aequidens*. Potenciálně nové druhy byly označeny jako „*Krobia* sp.“ nebo „*Aequidens* sp.“. Nově identifikované druhy jsou prozatím prozátímně pojmenovány podle oblastí endemismu, které jsou určeny povodími (nebo jejich částmi) a místem jejich sběru.

3.2 Původ vzorků, taxonomické a biogeografické pokrytí

Byly shromážděny reprezentativní exempláře a vzorky tkání pokrývající celé rozšíření rodů *Krobia* a *Aequidens*. Vzorky byly poskytnuty školitelem. Vzorky byly získávány pomocí různých metod lovu, včetně použití tenatních a vrhacích sítí, háčků a udic. Také ve všech dostupných mikrostanovištích na všech lokalitách byl použit lov harpunou (podle doporučení Říčan, 2017). Lokality byly pečlivě vybrány tak, aby pokryly celou regionální ekologickou rozmanitost biotopů studovaných oblastí. Na lokalitách s dobrou viditelností, bylo prováděno přímé pozorování rybí fauny pomocí potápěčské masky a šnorchlu.

V rámci této studie byly analyzovány vzorky obsahující tři platné druhy rodu *Krobia* (ze šesti, plus tři potenciálně nové druhy), 11 platných druhů rodu *Aequidens* (z 15, plus čtyři potenciálně nové druhy) a devět platných druhů rodu *Cichlasoma* (ze 13). U popsáných druhů byla co nejvyšší snaha zahrnout a osekvenovat topotypový materiál, tak aby byly jasně podchyceny validní taxony a bylo možné posoudit potenciál pro potenciálně nové druhy. Taxonomické pokrytí zahrnuje celé území rodu *Krobia* a téměř celý známý areál rozšíření je také zahrnut u rodů *Cichlasoma* a *Aequidens*. V prvním případě chybí nejvýchodnější druhy na Brazílském štítu (*C. orientale*, *C. paranaense*, *C. sanctifranciscense* a *C. zarskei*), zatímco v druhém případě chybí nejjížnější druhy vyskytující se na hranici Amazonie s Paraguayskou pánví (*A. plagiozonatus*, *A. rondoni* a *A. viridis*) a potom *A. epae* ze

severního Brazílského štítu. Nově získané sekvence v této studii představují šest nově zařazených druhů do fylogenetického rámce skupiny (oproti Peckové (2018); *Krobia* sp. Rotauga Korou, *Aequidens* cf. *gerciliae* Apui, *A. michaeli*, *A. sp. Caura*, *A. sp. cf. pallidus* Vaupes Mitu, *A. sp. Maici Mirim*) a rozšiřují vzorkování u těchto již dříve zařazených druhů (*Krobia potaroensis*, *K. guianensis*, *Aequidens diadema*, *A. patricki*).

Odebrané exempláře byly označeny a z každého byl odebrán vzorek DNA z pravé břišní ploutve. Tyto vzorky DNA tkáně byly uloženy v 1,5 ml zkumavkách Eppendorf Safe lock a fixovány absolutním ethanolem a následně uloženy v rybí sbírce Katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Vzorky byly konzervovány v 10 % formalínu a následně přeneseny do 70 % ethanolu.

3.3 Molekulární metody

K izolaci DNA byla použita tkáň z ploutví fixovaná absolutním ethanolem. Extrakce DNA proběhla pomocí proteinázy K soupravou Genomic DNA Mini Kit (Geneaid) dle standardního protokolu. Takto připravená vyizolovaná DNA byla zkontrolována na 1 % 30 ml agarózovém gelu.

Na PCR reakci bylo použito 12,5 µl LA Hot Start Master Mix (Top-Bio), 1 µl primeru H15915–R (AAC TGC CAG TCA TCT CCG GGT TAC AAG AC), 1 µl primeru GLuDG.L (TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG), 8,5 µl PCR Ultra H₂O (Top-Bio) a nakonec 2 µl vyizolované DNA. Všechny tyto složky byly namíchány v tenkostěnné PCR zkumavce do objemu 25 µl, následně stočeny v centrifuze a vloženy do thermocycleru (Biometra) s předem nastaveným programem, který zahrnoval počáteční denaturaci 2 min. na 94 °C, 35 cyklů [denaturace 1 min. 94 °C, nasednutí primeru 1 min. 50 °C, extenze 1 min. 72 °C] a finální extenze 8 min. 72 °C.

PCR produkt byl přečišťován pomocí soupravy JETquick PCR Product Purification Spin Kit/250. Sekvenační reakce byla prováděna podle standardního postupu s využitím stejných primerů. Analýzu sekvencí provedla firma SEQme s.r.o. pomocí Sangerova sekvenování.

3.4 Fylogenetické analýzy

Pro fylogenetické analýzy byly použity metody Neighbor Joining (NJ) v programu PAUP* 4 b.10 (Swofford, 2003) a Bayesiánská inferenční analýza (BI) v programu BEAST v 1.10.4. (Drummond a Rambaut, 2007). Kontrola kvality nově získaných sekvencí a rychlá identifikace jejich přibližné fylogenetické pozice byla provedena pomocí Neighbor Joining (NJ) analýzy v programu PAUP*. Bayesiánské inferenční analýzy (BI) v programu BEAST byly prováděny s rozdělením do kodonových pozic (1+2. vs. 3.). Optimální evoluční model byl vybrán na základě kritéria Akaikeho pomocí nástroje MrModeltest 2.2 a programu PAUP*. Stromy byly zakořeněny na reprezentativním vzorku cichlid z tribů heroini a cichlasomatini, zahrnující také příbuzné rody studované skupině (*Bujurquina*, *Tahuantinsuyoa* a *Andinoacara*).

3.4.1 Analýzy datování a fylogenetické inference v programu BEAST

Pro fylogenetickou inferenci a odhad času divergence pomocí molekulárních hodin byl využit softwarový balík Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees (BEAST) verze 1.10.1 (Drummond & Rambaut, 2007). Byl zvolen model uvolněných molekulárních hodin s lognormální distribucí rychlostí a pro strom byl použit koalescentní model s konstantní velikostí. Kalibrace molekulárních hodin byla provedena s využitím sekundární kalibrace z práce Musilové et al. (2015), která se zabývala datováním neotropických cichlid obecně a cichlid podčeledi Cichlosomatinae konkrétně. Musilová a spol. (2015) provedli kalibraci pomocí souboru neotropických fosilních druhů cichlid a jsou doposud jedinou studií, která zahrnuje cílovou skupinu této studie spolu s jejími nejbližšími příbuznými rody (konkrétně *Bujurquina*, *Tahuantinsuyoa* a *Andinoacara*) v datované fylogenezi. Pro kalibraci byly využity tři uzly z této studie: 1) bazální uzel *Andinoacara*, datovaný Musilovou a spol. (2015) na 19,33 Ma (95 % HPD 15,03-24,25 Ma), 2) uzel spojující *Bujurquina-Tahuantinsuyoa-Andinoacara*, odhadovaný na 31,51 Ma (95 % HPD, 26,22-37,17 Ma), a 3) uzel spojující *Bujurquina-Tahuantinsuyoa-Andinoacara* s ostatními rody cichlosomatinských cichlidů, odhadovaný na 46,47 Ma (95 % HPD 40,96-52,62 Ma.)

Analýzy byly prováděny na platformě Cipres (<https://www.phylo.org/>) po dobu 10 milionů generací. Stromy byly vzorkovány a ukládány každých 3000 generací. Konvergence běhů byla vyhodnocena pomocí grafické vizualizace a diagnostiky, zejména pomocí efektivní velikosti vzorku (ESS), v programu Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond, 2007). Čtyři dobře konvergované běhy byly sloučeny v programu LogCombiner v.1.10.1 s odstraněním prvních 10 % v každém běhu analýzy (na základě vizualizace v Tracer v. 1.5) Konečný 50% většinový konsensus strom s posteriorními hodnotami pravděpodobnosti (PP) větví (bpp) byl vytvořen ze zbylých stromů po odstranění burn-in kombinací čtyř běhů v programu TreeAnnotator v.1.10.1.

3.4.2 Analýzy vymezení druhů pomocí GMYC a PTP

Pro molekulární vymezení druhů pomocí markeru cytb byly použity analýzy GMYC (General Mixed Yule Coalescent) a PTP (Poisson tree processes). Tyto metody jsou navrženy pro vymezení druhů primárně na základě jednotlivých molekulárních markerů, což je užitečné v případech, kdy nelze využít metody založené na analýze více genů. Model GMYC je dřívějšího data a je hojně používán v empirických studiích (Pons et al., 2006; Fontaneto et al., 2007; Monaghan et al., 2009; Carstens & Dewey, 2010; Vuataz et al., 2011; Powell, 2012; Fujisawa & Barraclough, 2013;). Novější model PTP (Zhang et al., 2013) se ukazuje být dokonce účinnější, zejména pokud jsou vzdálenosti mezi druhy malé. Metody GMYC a PTP identifikují body přechodu mezi mezidruhovým a vnitrodruhovým větvením, a to maximalizací pravděpodobnosti modelu. Zatímco metoda GMYC detekuje přechodové body na základě časově kalibrované ultrametrické topologie stromu a využívá časový interval pro identifikaci, metoda PTP modeluje počet substitucí a nevyžaduje časově kalibrovanou ultrametrickou topologii. Oba přístupy předpokládají, že všechny linie vedoucí od kořene k identifikovaným přechodovým bodům představují různé druhy. Obě metody překonávají tradiční metody výběru OTU (Operational Taxonomics Units), které se spoléhají na jednoduché prahové hodnoty sekvenční vzdálenosti (tzv. barkodingový gap), a jsou tedy robustnější v případech kdy tento gap chybí (Zhang et al., 2013).

Analýzy pomocí metod PTP a GMYC byly provedeny pomocí webového rozhraní (<http://species.h-its.org/>). Obě analýzy byly provedeny na ultrametrickém stromu z BEASTu.

3.4.3 Biogeografické analýzy

Rekonstrukce oblastí předků pro všechny uzly ve fylogenetickém stromě byla provedena pomocí Bayesovské statistické analýzy disperze a vikariance (S-DIVA), implementované v programu RASP 2.0 (Yu et al. 2015). Pro biogeografické analýzy byly použity hlavní topografické a dlouhodobě existující oblasti Jižní Ameriky, konkrétně Guyanský štít, Brazilský štít, Západní Amazonie a povodí Paraguay-Paraná. Pokud distribuce jednotlivých druhů nebyla omezena pouze na jednu oblast, byl areál druhu zakódován jako součet oblastí. Dále byla provedena druhá biogeografická analýza, kde namísto geograficky definovaných oblastí byly použity tři hlavní typy vod nalezené v Jižní Americe (čistá voda, černá voda a kalná voda, známá také jako bílá voda) jako různé stanoviště.

Analýzy v programu S-DIVA byly provedeny s použitím maximálního počtu oblastí (maxareas) pro konkrétní analyzovanou datovou sadu.

4 Výsledky

4.1 Fylogenetické analýzy

Pro vizualizace Neighbor Joining (NJ) fylogenetických vztahů byly použity všechny sekvence, abychom ověřili jejich předběžné fylogenetické pozice. Pro finální fylogenetické analýzy v programu BEAST byly zahrnuty pouze sekvence s délkou nad 950 bp. Celková délka datové matice obsahovala 1 055 bp znaků cyt b markeru.

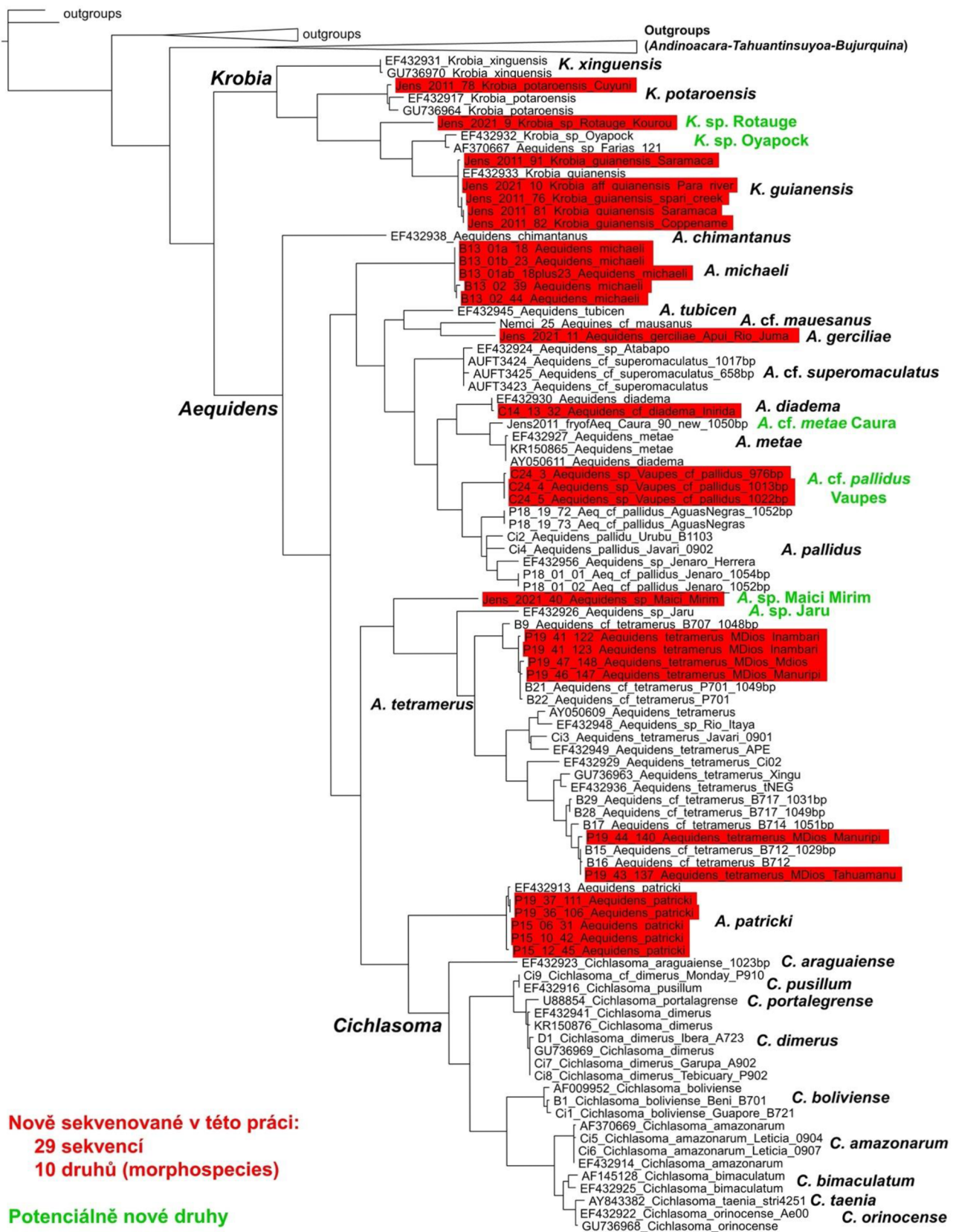
Bayesiánské inferenční (BI) analýzy byly spuštěny v několika nezávislých bězích s nejvhodnějším modelem evoluce (GTR+I+G). Analýzy dosáhly dobré konvergence (ESS>200 pro všechny parametry).

Výsledky finální BI (BEAST) analýzy a předběžné NJ topologie ukazují velmi podobné fylogenetické vztahy (viz obrázky 3 a 4). Obě metody výrazně podporují monofylii rodů *Krobia* a *Cichlasoma*, zatímco rod *Aequidens* je parafyletický vůči rodu *Cichlasoma*, což je silně podpořeno ($\text{bpp} \geq 0,95$) ve všech vnitřních uzlech BEAST stromu (viz obrázek 4).

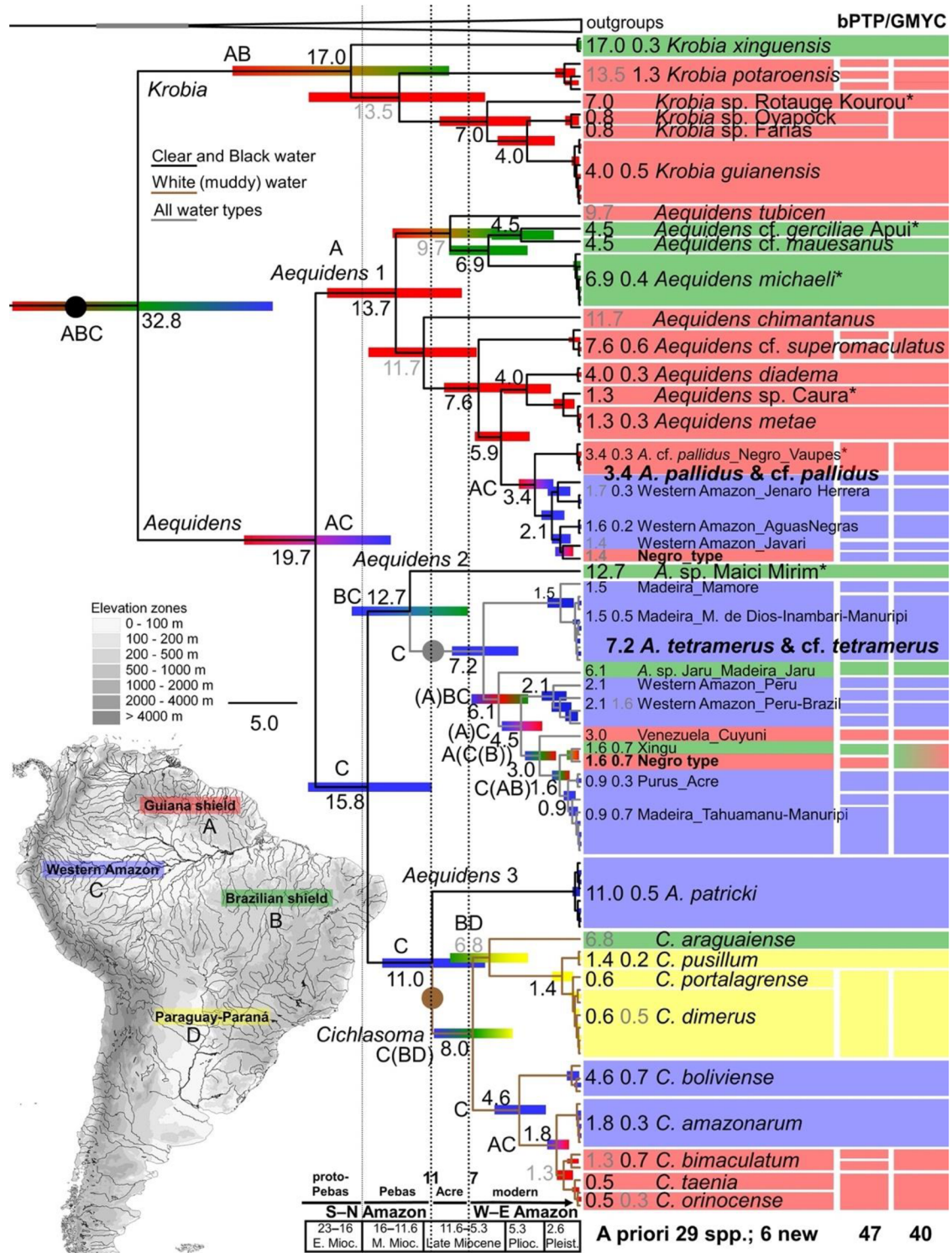
4.2 Druhová diverzita v rodech *Krobia*, *Aequidens* a *Cichlasoma*

4.2.1 *Krobia*

V rámci rodu *Krobia* bylo zahrnuto šest různých taxonů na úrovni druhů a naše molekulární analýzy (zahrnující fylogenezi a molekulární vymezení) plně podporují všechny tyto druhy, konkrétně *Krobia xinguensis*, *K. potaroensis*, *K. sp. Rotaugé Korou*, *K. sp. Oyapock*, *K. sp. Farias* a *K. guianensis*. Molekulární delimitační analýzy navíc ukazují přítomnost dvou (podle bPTP) až tří (podle GMYC) potenciálních druhů uvnitř druhu *K. potaroensis*. Analýza GMYC identifikuje pouze jeden taxon na úrovni druhu u *Krobia sp. Oyapock* a *K. sp. Farias*, zatímco analýza bPTP je považuje za samostatné.



Obrázek 3: Neighbor Joining fylogentický strom sloužící především k vyznačení nově přidávaných sekvencí (označeny červeně).



Obrázek 4: Fylogenetické vztahy, datování divergence, biogeografická rekonstrukce a druhové vymezení v rámci rodů *Krobia*, *Aequidens* a *Cichlasoma* na základě cytb markeru z analýzy BEAST. Outgroupové taxony jsou z obrázku vynechány. Čísla v uzlech ukazují věk v mi milionech let, černé písmo ukazuje silně podpořené uzly (bpp \geq 0,95), šedé písmo méně podpořené uzly. Barva intervalů spolehlivosti odhadu věků (95 % HDP) ukazuje rekonstruované areály pro každý uzel (rekonstruované areály jsou též vyznačeny písmeny, viz mapka kódovaných oblastí vlevo dole). Vymezení molekulárních druhů pomocí metod bPTP a GMYC je vyznačeno v levé části obrázku. Podkladová barva druhů značí území výskytu, dle mapy. Barva větví značí typ vody, jež obývají, viz legenda. Měřítko ukazuje 5 My. Nově přidané druhy v této práci jsou označeny hvězdičkou (ostatní nově přidané sekvence viz obrázek 3). K datování stromu je přidána legenda vyznačující hlavní epochy transformace paleo-Amazonie do současné Amazonie (viz text).

4.2.2 *Aequidens*

V rámci rodu *Aequidens* bylo zahrnuto 15 různých taxonů na úrovni druhů (11 platných druhů a čtyři potencionálně nové druhy), a molekulární analýzy podporují všechny tyto druhy, tj. *A. diadema*, *A. gerciliae*, *A. chimantanus*, *A. mauesanus*, *A. metae*, *A. michaeli*, *A. pallidus*, *A. patricki*, *A. sp. Caura*, *A. sp. cf. pallidus*, *A. sp. Jaru*, *A. sp. Maici Mirim*, *A. superomaculatus*, *A. tetramerus* a *A. tubicen*. Molekulární delimitační analýzy navíc ukazují mnoho shluků na úrovni druhů, zejména uvnitř druhů *A. tetramerus* a *A. pallidus*. U druhu *A. pallidus* bylo identifikováno pět shluků na úrovni druhů v analýzách bPTP i GMYC. Minimální počet shluků na úrovni druhů u *A. tetramerus* byl identifikován jako devět podle analýzy GMYC a analýza bPTP identifikuje shluků dvanáct.

4.2.3 *Cichlasoma*

V rámci rodu *Cichlasoma* bylo zahrnuto devět platných druhů (z celkového počtu 13), a fylogenetické analýzy podporují všechny tyto druhy, konkrétně *C. amazonarum*, *C. araguaiense*, *C. bimaculatum*, *C. boliviense*, *C. dimerus*, *C. orinocense*, *C. portalegrense*, *C. pussilum* a *C. taenia*. Nicméně molekulární delimitační analýzy neprokázaly oddělení mezi *C. portalegrense* a *C. dimerus* a mezi *C. taenia* a *C. orinocense* na úrovni druhu. U druhu *C. bimaculatum* analýza bPTP identifikuje dva shluky na úrovni druhů, zatímco analýza GMYC poukazuje pouze na jeden druh.

4.3 **Fylogenetické vztahy mezi a uvnitř rodů *Krobia*, *Aequidens* a *Cichlasoma***

Krobia je sesterský rod rodu *Aequidens*, který je parafyletický vůči rodu *Cichlasoma*. Všechny tyto vztahy jsou pevně podpořeny (s hodnotou $bpp \geq 0,95$) ve všech uzlech stromu BEAST (viz obrázek 4). V případě rodu *Krobia* ukazují vztahy, že druhy z Guyanské (všechny kromě jednoho druhu) a Brazílské vysočiny (*K. xinguensis*) jsou sesterské skupiny

Rod *Cichlasoma* je pevně vnitřní skupinou rodu *Aequidens*, přičemž jeho sesterskou skupinou je druh *A. patricki* ze západní Amazonie.

Nejsložitějším rodem je tedy rod *Aequidens*, který se skládá ze tří dobře podpořených (s bpp $\geq 0,95$) linií. První linie zahrnuje všechny druhy endemické pro oblast Guyanského štítu (*A. diadema*, *A. chimantanus*, *A. metae*, *A. sp. Caura*, *A. sp. cf. pallidus*, *A. tubicen*, *A. superomaculatus*), které jsou parafyletické k silně podpořené monofyletické skupině zahrnující druhy endemité pro Brazílskou vysočinu (*A. gerciliae*, *A. mauesanus*, *A. michaeli*). *Aequidens pallidus* je jediným druhem v této první linii, který se vyskytuje ve dvou oblastech, jak v Guayanské vysočině (Rio Negro), tak v západní Amazonii. Navíc, *A. pallidus* je jediným druhem v této linii, u kterého analýzy molekulárního vymezení podporují existenci několika taxonů na úrovni druhu (pět). *Aequidens pallidus* je pevně podpořený jako sesterská skupina *A. sp. cf. pallidus*, který se rovněž nachází v povodí Rio Negro, v řece Rio Vaupes, která je oddělena od Negra dlouhou oblastí mohutných peřejí.

Druhá linie rodu *Aequidens* zahrnuje pouze jeden nominální druh, široce rozšířený druh *A. tetramerus*, a dva potenciálně nové endemické druhy, *A. sp. Jaru* a *A. sp. Maici Mirim*. *Aequidens sp. Maici Mirim* je sesterská skupina k *A. tetramerus*, zatímco *A. sp. Jaru* se nachází v rámci rozsáhlé a fylogeneticky diverzifikované struktury *A. tetramerus* (obrázek 4). Jak bylo uvedeno výše, *A. tetramerus* je v analýzách vymezení molekulárních druhů rozdělen do minimálně devíti shluků na úrovni druhů podle analýzy GMYC. Analýza bPTP identifikuje druhů dvanáct.

Třetí linie *Aequidens* zahrnuje pouze jeden druh, a to druh *A. patricki*.

4.4 Datovaná fylogeneze a biogeografická rekonstrukce rodů *Krobia*, *Aequidens* a *Cichlasoma*

Vysoký počet potenciálních druhů v rámci *A. tetramerus* a *A. pallidus* představuje první výsledek, který je vysvětlen v datované fylogenezi (viz obrázek 4). Zatímco časová hladina, na které je většina taxonů na úrovni druhů oddělena na druhy v analýzách molekulárního vymezení má stáří kolem 0,7 až 0,8 milionů let, potenciální druhy v rámci *A. tetramerus* a *A. pallidus* mají stáří od 7,2 milionů let u *A. tetramerus* a od 3,4 milionů let u *A. pallidus*. Divergence uvnitř *A. tetramerus* je srovnatelná s divergencí mezi druhy celého rodu *Cichlasoma* (od 8 milionů let). Většina domnělých druhů u *A. tetramerus* je alopatická, ale minimálně dvě linie uvnitř *A. tetramerus* jsou sympatrické v povodí řeky Madeiry, což spolu s jejich fylogenetickými vztahy naznačuje, že tato oblast v rámci západní Amazonie je ancestrální pro celý druhový komplex *A. tetramerus*. Potenciální nový druh *A. sp. Jaru*, který je fylogeneticky uvnitř druhového komplexu *A. tetramerus*, je endemitem také v povodí řeky Madeira, což dále podporuje toto povodí jako ancestrální pro celý druhový komplex.

Na velké mezirodové škále je v datované fylogenezi bazální uzel pro všechny tři rody datován do na dobu 32,8 milionů let (95 % HPD 22,8-42,0 milionů let). Biogeografická rekonstrukce celé skupiny je převážně vikariální, s třemi ze čtyř kódovaných oblastí obsažených v bazálním uzlu, což naznačuje, že společný předek se vyskytoval v celé Amazonské pánvi (Guyanský štít, Brazílský štít, západní Amazonie). *Cichlasoma*, jediný rod vyskytující se ve čtvrté oblasti (povodí Paraguay-Paraná), do této oblasti expandovala ze západní Amazonie (viz obrázek 4).

Krobia má svůj bazální uzel rekonstruovaný jako vikarianci mezi oblastmi a liniemi Guayanského a Brazílského štítu s datem 17 milionů let (95 % HPD 9,8 – 25,8 milionů let). Další speciální události v oblasti Guayanského štítu se odehrály mezi 13,5 a 4 miliony let, s výjimkou mladého uzlu mezi *K. sp. Oyapock* a *K. sp. Farias* s datem 0,8 milionu let.

Bazální uzel rodu *Aequidens* (tj. včetně *Cichlasoma*) je datován na 19,7 milionů let (95% HPD 14,1-25,0 milionů let) a rekonstruován jako vikariance mezi oblastí Guayanského štítu (linie *Aequidens* 1) a západní Amazonií (zbytek *Aequidens* včetně *Cichlasoma*).

První linie rodu *Aequidens* je tedy rekonstruována jako endemitní pro oblast Guyanského štítu s datem bazálního uzlu 13,7 milionů let (95 % HPD 8,8 – 18,8 milionů let). Z této linie došlo před 9,7 milionu let (95 % HPD 6,1 - 14,0 milionů let) ke kolonizaci Brazílského štítu (*A. gerciliae*, *A. mauesamus*, *A. michaeli*) a později, asi před 3,4 miliony let (95 % HPD 2,1 - 4,6 milionů let), ke kolonizaci západní Amazonie v rámci linie *A. pallidus*.

Druhá linie rodu *Aequidens*, s bazálním uzlem odhadovaným na 12,7 milionů let (95% HPD 8,4 – 17,0 milionů let), je rekonstruován jako vikariance mezi jedním druhem Brazílského štítu (*A. sp.* Maici Mirim) a druhovým komplexem *A. tetramerus*, který byl původně endemitem západní Amazonie, zejména v povodí řeky Madeiry (7,2 milion let). Mezi 7,2 a 6,1 miliony let (95% HPD 9,6 – 3,9 milionů let) linie *A. tetramerus* expandovala přes západní Amazonii do celého povodí Amazonky (všechny tři kódované oblasti). Toto velké rozšíření areálu bylo pravděpodobně iniciováno adaptací na změny prostředí v západní Amazonii, kde se původně dominující čisté a černé vody proměnily na dominující kalné vody, jak je podporováno naší biogeografickou rekonstrukcí typů vod (viz obrázek 4 a 5). Později byl areál linie *A. tetramerus* rozdělen vikariantními událostmi mezi třemi kódovanými oblastmi mezi 6,1 a 0,7 milionů let, což odpovídá většině molekulárně vymezených druhů v rámci linie *A. tetramerus* včetně *A. sp.* Jaru (viz výše).

Třetí linie rodu *Aequidens* obsahuje pouze jeden druh, západoamazonský *A. patricki*, který je sesterský rodu *Cichlasoma*. Tento uzel je datován na 11 milionů let (95 % HPD 7,1 – 14,7 milionů let) a je rekonstruován v západní Amazonii. Tím pádem rod *Cichlasoma* vznikl v západní Amazonii a později (mezi 11 a 8 miliony let) se rozšířil do celého povodí Amazonky (stejně jako *A. tetramerus*, ale ten v poněkud pozdějším období mezi 7,2 a 6,1 miliony let), a také do povodí Paraguay-Paraná (mezi 4,6 a 1,8 milionů let).



Obrázek 5: Mapa Jižní Ameriky s barevně zvýrazněnými typy vod na své východní straně od And. Geologicky staré Guyanské a Brazílské štíty jsou dominovány čistými vodami, Západní Amazonie a povodí Paragvaye jsou dominovány kalnými vodami ze stoupajících mladých And. Kalné vody z And přinášejí sediment především v období dešťů, kdežto v sušším období roku jsou řeky v Andách sezónně čisté. Černé vody vznikají v nížinných pánvích. Mozaika všech hlavních typů vod je především v západní Amazonii mnohem jemější než může mapa tohoto měřítka postihnout.

5 Diskuze

5.1 Druhová diverzita *Krobia*, *Aequidens* a *Cichlasoma*

Druhová diverzita ve třech studovaných rodech je v souladu jak s tradičním, tak s molekulárním vymezením druhů, s výjimkou případů starých divergencí a existence potenciálně kryptických druhů v rámci *A. tetramerus* a *A. pallidus* a velmi mladých divergencí některých popsaných druhů *Cichlasoma* (jako je *C. taenia* vs. *C. orinocense*, *C. portalegrense* vs. *C. dimerus*). Potenciálně kryptické druhy v rámci *A. tetramerus* a *A. pallidus* vykazují podobnosti na fylogenetické úrovni s druhy v rámci *Cichlasoma*, což vyžaduje porovnání obou těchto situací.

Druhy v rodě *Cichlasoma* jsou známé pro svou obtížnou identifikaci a Kullander (1983) v popisu druhů v rodě *Cichlasoma* jasně uvedl, že kromě jejich velmi drobných morfologických rozdílů je klíčovým faktorem pro určení druhu jejich biogeografie, protože většinu druhů považoval za alopatrické. Tato skutečnost zůstává platná.

Komplexům *A. tetramerus* a *A. pallidus* nebyla dosud věnována taková pozornost, ale tato studie poprvé ukazuje jejich potenciální druhový komplex na základě lepšího geografického pokrytí než v předchozích studiích (Musilová a kol., 2008, 2009). Morfologická revize materiálu *A. tetramerus* a *A. pallidus* je nutná pro zjištění, zda potenciální kryptické druhy identifikované molekulárními analýzami mtDNA také vykazují identifikovatelné morfologické znaky, i tak drobné, jaké se nacházejí u druhů rodu *Cichlasoma*. Dalším důležitým krokem je použití jaderných markerů k ověření potenciálních druhů identifikovaných pomocí mtDNA.

Kromě těchto potenciálně nových kryptických druhů tato studie také odhalila a molekulárně potvrdila existenci dalších dobře podporovaných (morfologicky i molekulárně) potencionálně nových druhů (*A. sp. Caura*, *A. sp. Jaru*, *A. sp. Maici Mirim*, *K. sp. Farias*, *K. sp. Oyapock*, *K. sp. Rotaugé Kourou*). Podíl nově objevených potenciálních druhů vůči počtu zařazených platných druhů v této studii je tedy 26 %, pokud počítáme pouze dobře morfologicky diferencované druhy (6 nových / 23 platných). Pokud však do výpočtu zahrneme i minimální identifikovaný počet (40) potenciálně nových kryptických druhů

včetně těch v komplexech *A. tetramerus* a *A. pallidus*, vzroste podíl nově objevených potencionálních druhů (17 nových / 23 platných) na 74 %. Tento podíl je vysoký, ale ve skutečnosti je normální ve srovnání s jinými relativně dobře prostudovanými rody jihoamerických cichlid (Kullander & Ferreira, 2006; Willis et al., 2012, 2013; Říčan et al. 2021, 2023).

Objevení nových druhů mezi neotropickými rybami není nijak vyjímečné, ba naopak (viz citace výše), nové druhy se objevují a popisují velmi často. V jiných amazonských rodech cichlid nově objevené druhy ve skutečnosti tvoří velkou část druhové diverzity. V rodě *Bujurquina*, blízce příbuznému rodu studovaných v této studii, vyskytujícímu se v západní Amazonii, Říčan et. al (2023) zjistili 83 % nárůst, z 18 zařazených platných druhů na celkem 33 druhů, všechny dobře morfologicky diferencované druhy. Skutečný počet druhů v této skupině je pravděpodobně mnohem vyšší než uvádí zvěřejněná studie, alespoň 45 druhů (Říčan a kol., nepublikováno). V případě rodu *Crenicichla*, největšího rodu neotropických cichlid (něco přes 100 platných druhů), byl minimální procentuální nárůst nerozpoznaných druhů 65 – 121 % v závislosti na druhové skupině v rodu (Říčan et al., 2021). V některých skupinách druhů *Crenicichla* byl nárůst druhů mnohem vyšší, 68 – 168 % (skupina *Saxatilis*), 125 – 200 % (skupina *Wallacii*) a 158 – 241 % ve skupině *Lugubris*. V nejlépe prostudované skupině *Lacustris* byl původní nárůst druhů stejně vysoký ale je to jediná skupina tohoto velkého rodu, která recentně prošla mnoha studii a jejíž druhová diverzita tak byla z větší části ozřejmena, prostudována jak morfologickými tak molekulárními přístupy za použití mtDNA i jaderné nDNA (fylogenomiky), a poté taxonomicky popsána (viz dlouhá řada citací v Říčan et al., 2021). I u původně relativně málo druhově početného rodu *Cichla*, velkých, široce rošířených a habitatově mnohem oportunističtějších cichlid, byl nárůst také vysoký, 150% (ze šesti druhů na 15; Kullander & Ferreira, 2006), z nichž mnohé byly posléze zpochybněny prvními molekulárními analýzami (Willis et al., 2012) a ještě později na větším molekulárním datasetu opět víceméně potvrzeny (Willis et al., 2013).

Reis a kol. (2016) v přehledové studii na základě objevů druhů napříč všemi skupinami neotropických sladkovodních ryb konzervativně odhadli, že 34 – 42 % zůstává nepopsaných. Reis a kol. (2016) lokalizovali většinu nerozpoznané diverzity do povodí Amazonky. To je v souladu s touto studií a také s dalšími relativně podrobně studovanými rody

jihoamerických cichlid (Kullander & Ferreira, 2006; Willis et al., 2012, 2013; Řičan et al. 2021, 2023). Všechna tři hlavní vysvětlení, která Reis a kol. (2016) uvádějí jako důvody pro nerozpoznanou diverzitu neotropických ryb, platí i pro neotropické cichlidy včetně těch v této studii: 1) nedostatečné pokrytí areálu distribuce dané skupiny, zejména v oblastech s obtížným přístupem; 2) rozšířené taxony nebo heterogenní taxony s nedostatečným (nebo příliš velkým) množstvím muzejního materiálu nebo nesprávně zachovaným materiálem a informacemi; 3) kryptická nebo pseudokryptická (morfologické rozdíly zjevné, ale přehlížené) diverzita u široce rozšířených druhů. U cichlid je důležitým faktorem přispívajícím k poslednímu bodu omezení dostupných diagnostických znaků zachovaných v konzervovaných vzorcích. Cichlidy, které jsou pestrými a vizuálně orientovanými rybami, při fixování a uchování v muzejních sbírkách ztrácejí téměř všechny diagnostické znaky zbarvení. Studium živých ryb a jejich fotografií je proto obzvláště důležité, ale podrobné snímky dostatečného počtu živých exemplářů v terénu jsou stále velmi zřídka pořizovány v obecných terénních průzkumech. Ve stávajících sbírkách obvykle chybí řádně zdokumentované živé zbarvení dochovaných exemplářů, což značně omezuje jejich využitelnost.

5.2 Biogeografie a datování rozšíření areálu v souladu s amazonskou paelogeografií

Hlavní rozšíření areálu ve studované skupině začalo u rodu *Cichlasoma* mezi 11 a 8 miliony lety ze západní Amazonie do celé cis-Andské (na východ od And) Jižní Ameriky a v komplexu *Aequidens tetramerus* mezi 7,2 a 6,1 miliony let, rovněž ze západní Amazonie do celého povodí Amazonky (obrázek 4). Toto jsou jediné expanze na úrovni velkých areálů identifikované v rámci studovaných skupin v této studii a jsou to také jediné expanze areálů, které odpovídají změnám stanoviště. Studované rody *Krobia* a *Aequidens* původně obývaly pouze čisté a/nebo černé vody (obr. 4 a 5) a linie *Krobia* a *Aequidens* 1 a 3 jsou stále endemické pouze pro tato stanoviště. Na rozdíl od této skupiny se druhy *Cichlasoma* vyskytují převážně v bílých (tj. kalných) vodách a *Aequidens tetramerus* je vysoce oportunistický a lze jej nalézt v jakémkoli typu vody. Tato změna stanoviště založená na naší biogeografické rekonstrukci a molekulárním datování se u těchto dvou skupin vyskytla mezi 11 a 8 miliony lety, respektive 7,2 a 6,1 mil. lety. Toto datování dobře koresponduje s hlavní

paleogeografickou změnou a změnou paleohabitatu, ke které došlo během této doby v západní Amazonii (Hoorn & Wesselingh, 2010a; Wesselingh & Hoorn, 2011). Tento časový rámec (11 až 6 milionů let) je považován za stěžejní bod v historii evoluce povodí Amazonky, protože představuje bod obratu mezi dlouho existujícím povodím paleo-Amazonky tekoucím od jihu k severu (J-S) a moderním Amazonským povodím tekoucím od západu k východu (Z-V) (Hoorn & Wesselingh 2010a , b; Albert & Reis, 2011; Albert a kol., 2018; Říčan a kol., 2023). Tato změna z původní paleo-Azonie do moderní Amazonie byla způsobena vlivem stoupajícího pohoří And a jejích sedimentů v Amazonských nížinnách. Tyto nánosy sedimentů postupně přes systém obřích mokřadů (Pebas, Acre; obr. 4) přetvářely západní Amazonii a měnily její sklon, až kolem 7 mil. Západní Amazonie prolomila a přetekla prastaré bariéry (oblouky mezi starověkými štíty) směrem na východ, a tak se postupně vytvořil moderní na východ tekoucí systém Amazonské pánve. Systémy obřích mokřadů a přeorientování amazonských říčních systémů nastaly ve stejné době jako adaptace *Aequidens* a *Cichlasoma* na nová stanoviště a typy vod (od čistých a černých vod k toleranci vod bílých/bahnitých).

6 Zdroje

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(3).

Ayisi C. L., 2014. Reproductive biology of Cichlidae. *International Journal of Agricultural Sciences*, 4(8): 248-251.

Balshine-Earn S. & Earn D. J., 1998. On the evolutionary pathway of parental care in mouth-brooding cichlid fishes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1411): 2217-2222.

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.

Drummond A. J. & Rambaut A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.

Farias I. P., Ortí G. & Meyer A., 2000. Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlid fishes. *Journal of experimental zoology*, 288(1): 76-92.

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: 87.

Froese R. & Pauly D., (eds.), 2016. Species of *Aequidens* in FishBase.

Froese R. & Pauly D., (eds.), 2017. Species of *Krobia* in FishBase.

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.

Hoorn C. & Wesselingh F. P., (eds.), 2010a. Amazonia: Landscape and species evolution: a Look into the past. Wiley-Blackwell, Chichester, UK.

Ilves K. L., Torti D. & López-Fernández H., 2017. Exon-based phylogenomics strengthens the phylogeny of Neotropical cichlids and identifies remaining conflicting clades (Cichliformes: Cichlidae: Cichlinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 118: 232–243.

Kullander S. O., 1998 A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (eds.), *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, 461–498.

Kullander, S. O., 1983a. A Revision of the South American Cichlid genus *Cichlasoma*. Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden.

Kullander S. O. & Ferreira E. J. G., 2006. „A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae)“. *Ichthyological Explorations of Freshwaters*, 17(4): 289-398.

Kullander S. O., 2003. Family cichlidae. Check list of the freshwater fishes of South and Central America, 605-654.

Kullander S. O., 2012. *Krobia xinguensis*, a new species of cichlid fish from the Xingu River drainage in Brazil (Teleostei: Cichlidae). *Zootaxa*, 3197: 43-54.

Liem K. F., 1991. Polyphyletic functional diversification or adaptive radiation. In: Keenleyside, Miles H. A. *Cichlid Fishes Behaviour, ecology and evolution*, 140-141.

López-Fernández H., Winemiller K. O. & Honeycutt R. L., 2010. Multilocus phylogeny and rapid radiations in neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 1070–1086.

Mabuchi K., Miya M., Azuma Y. & Nishida M., 2007. Independent evolution of the specialized pharyngeal jaw apparatus in cichlid and labrid fishes. *BMC Evolutionary Biology*.

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.

Musilová Z., Říčan O., Janko K. & Novák J., 2008. Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). *Mol Phylogenet Evol*, 46(2): 659-72.

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.

Musilová Z., Říčan O. & Novák J., 2009. Phylogeny of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae) based on morphological and molecular data, with the description of a new genus *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47(3): 234-247.

Pecková N., 2018. Biogeografická a ekologická evoluce jihoamerických cichlid *Krobia*, *Aequidens* a *Cichlasoma*: taxon cyklus v Amazonii? Bc. práce, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice, Česká republika.

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.

Reis R. E., Albert J. S., Dario F. D., Mincarone M. M., Petry P. & Rocha L. A., 2016. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, 89: 12–47.

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*).

Říčan O., Říčanová Š., Rodriguez Haro L. R., (eds.), 2021. 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: 2199–2229.

Říčan O., 2017. Sympatry and syntopy of cichlids (Teleostei: Cichlidae) in the Selva Central, upper Ucayali river basin, Peru. *Check List*, 13(3): 2146.

Sültmann H., Mayer W.E., Figueroa F., Tichy H. & Klein J., 1995. Phylogenetic analysis of cichlid fishes using nuclear DNA markers., *Molecular Biology and Evolution*, 12(6): 1033–1047.

Steele S.E., Liverpool E. & López-Fernández H., 2013. *Krobia petitella*, a new species of cichlid fish from the Berbice River in Guyana (Teleostei: Cichlidae). *Zootaxa*, 3693 (2): 152–162.

Swofford D. L., 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Van der Sleen P. & Albert J. S., (eds.), 2017. Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas. Princeton University, 378.

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: 19728.

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, 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(96): 1-41.

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.