

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Katedra zoologie



Diplomová práce

Diverzita a biogeografie rodů *Australoheros*, *Gymnogeophagus* a *Crenicichla* (Perciformes: Cichlidae) v provincii Misiones, Argentina

Vypracoval: Lubomír Piálek

Vedoucí práce: Mgr. Oldřich Říčan, PhD.

Rok vypracování: 2008

Piálek L. (2008) Diverzita a biogeografie rodů *Australoheros*, *Gymnogeophagus* a *Crenicichla* (Perciformes: Cichlidae) v provincii Misiones, Argentina [Diversity and biogeography of the genera *Australoheros*, *Gymnogeophagus* and *Crenicichla* in the Province of Misiones, Argentina. M.S. Thesis, in Czech.], 43 pp. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice.

Annotation:

The diversity and biogeography of three dominant cichlid genera (*Australoheros*, *Gymnogeophagus* and *Crenicichla*) is reviewed within the Argentinean province of Misiones based on newly collected material specifically for this study. The results have revealed strikingly different structuring and origin of diversity between the three genera with implications for a future PhD study. The biogeographic implications of the reconstructed phylogenies using mitochondrial DNA have been compared with the geological history of the area revealing many new insights.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne 1.1.2008

.....

Lubomír Piálek

Rád bych tímto poděkoval svému školiteli Oldovi Říčanovi za jeho dlouhodobou misionářskou činnost při vzdělávání mé osoby a také za báječný nápad vydat se do Misiones. Jorgemu Casciottovi (Museo de La Plata, MLP, Argentina) náleží dík za sdílení potřebných informací, vyřízení příslušných povolení i osobní účast na expedici, jeho ženě Adrianě Almirónové (MLP) pak za organizační podporu celé akce. Naše terénní sběry by byly podstatně hubenější nebýt obětavé pomoci našich kolegů, Štěpánky Hulové a Honzy Štefky, kteří s námi cestu do Argentiny podnikli.

Děkuji rovněž malému Vaškovi, bez jehož výrazného příspěvku bych práci sepsal za podstatně kratší dobu a své ženě Radce, která svou neúnavnou a starostlivou péčí o nás oba omezila míru příspěví výše jmenovaného na nejmenší možnou.

Hance Konopiské vděčím za bleskovou korekturu tohoto literárního útvaru.

Tato práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru PřF JU (MŠM6007665801) a Grantové Agentury České Republiky (GAČR 206/08/P003).

Věnováno Sáře

Obsah

PROLOG	5
ÚVOD	6
<i>Diverzita neotropické ichtyofauny jako důsledek geologické historie kontinentu</i>	6
<i>Diverzifikace fauny na atlantském pevninském okraji</i>	7
<i>Atlantský prales</i>	9
<i>Provincie Misiones a její ichtyofauna</i>	11
<i>Australoheros</i>	13
<i>Gymnogeophagus</i>	13
<i>Crenicichla</i>	14
<i>Shrnutí cílů</i>	16
METODY	17
<i>Terénní sběry</i>	17
<i>Molekulární metody</i>	18
<i>Fylogenetické analýzy</i>	19
VÝSLEDKY	21
<i>Australoheros</i>	21
<i>Gymnogeophagus</i>	23
<i>Crenicichla</i>	27
DISKUSE	33
<i>Australoheros</i>	33
<i>Gymnogeophagus</i>	34
<i>Crenicichla</i>	36
SOUHRN	38
LITERATURA	39

Prolog

"Brazílie donedávna připomínala zahradníka, který za třeskutého mrazu dýchá na teploměr a skulinou v zamrzlém okně se dívá do sadu, zda mu začnou kvést jabloně. Z pokolení na pokolení ujišťovali představitelé Brazílie sami sebe a celý svět o nezměrném bohatství své země. A přece Brazílie po dlouhá desetiletí dodávala levně svou kávu, bavlnu, kaučuk a kakao - a draze kupovala potraviny a průmyslové výrobky jako každý slabší partner na světových trzích. Bohatá Brazílie nenašla odvahu probít se do svého vnitrozemí a vyrvat pralesům jejich nesmírné zdroje...

Jednoho dne však brazilský zahradník přestal dýchat na teploměr a vykasal si rukávy. Přestal se bláhově domnívat, že mu pokvetou jabloně, když dýchne na teploměr, přestal věřit, že ho uživí iluze. Posadil se nad rýsovací prkno, naučil se zacházet s logaritmickým pravítkem, vzal theodolit a pustil se do pralesa. Pochopil, že budoucnost jeho země závisí především na dopravních tepnách, jež prorazí do interioru...

Cestou z Foz do Iguaçu do Curitiby, hlavního města státu Paraná, jsme uprostřed pralesa narazili na něco, co nám vzalo dech... Autostráda!... Široký pruh vozovky na vysokém náspu, rovný jako pravítko; jen vrstva betonu na něm chyběla. Pásmo vykáceného pralesa po obou stranách na ochranu proti zatrasení padlými stromy. Tachometr, který po celé hodiny jízdy kolísal mezi dvaceti a třiceti za hodinu, vyskočil na osmdesát a byl by stoupal ještě výš.

A znovu prales, prales..."

(Hanzelka & Zikmund 1956)

Uplynulo jen málo přes padesát let a dobové svědectví našich dvou fenomenálních cestovatelů o počátku budování brazilské dopravní infrastruktury napříč Atlantským pralesem se stává již pouze jeho smutným mementem. Na území ještě před sto lety zcela zalesněného státu Paraná přežívá dnes z tzv. vnitrozemského nebo též paranánského lesa méně než 3 % jeho původní rozlohy. Jedním z posledních rozsáhlejších fragmentů Atlantského pralesa zůstává oblast argentinské provincie Misiones*, která se stala cílem první etapy naší studie.

* Název provincie je odvozen od zdejšího působení jezuitských misionářů mezi indiány kmene Guarani koncem 17. a v první polovině 18. století. Misionářská činnost byla v roce 1759 na nátlak církevních kruhů rozhodnutím portugalské vlády zakázána.

Úvod

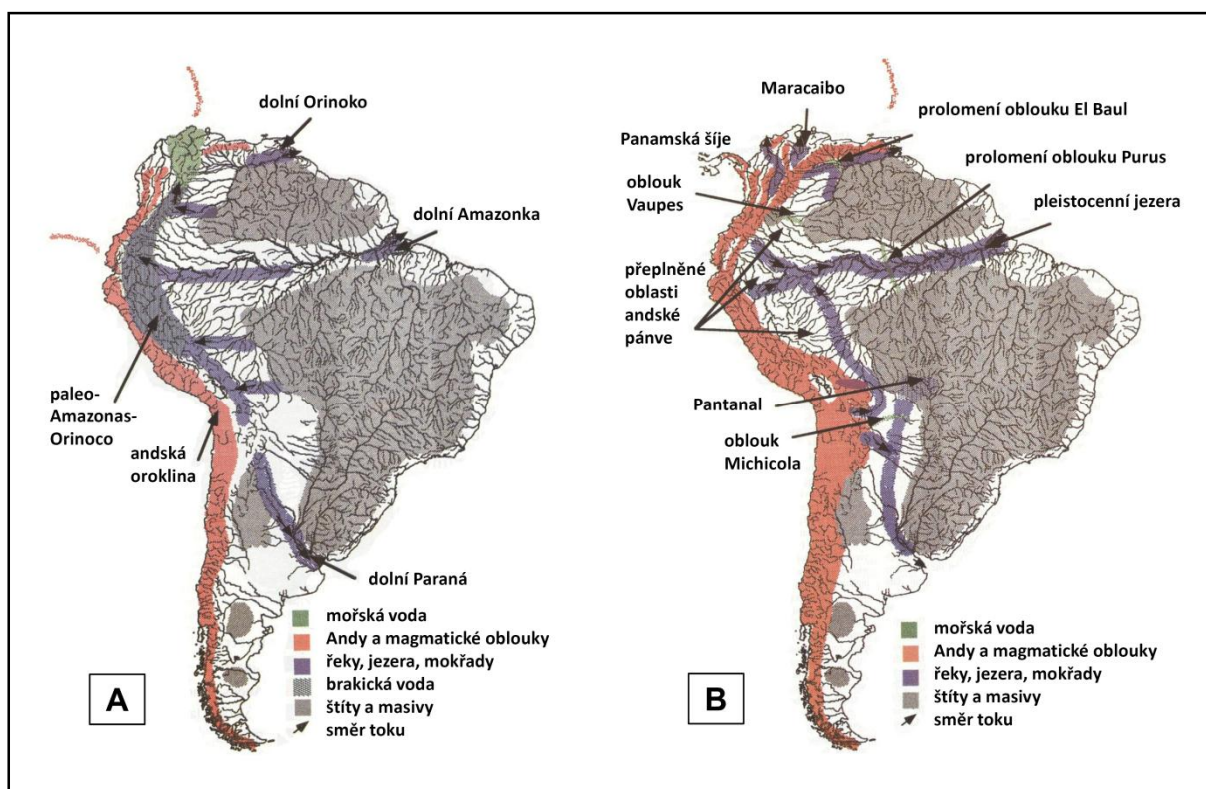
Diverzita neotropické ichtyofauny jako důsledek geologické historie kontinentu

Neotropická rybí fauna je nesmírně bohatá a tvoří okolo 45 % celosvětové sladkovodní ichtyofauny (např. Reis et al. 2004, Schaefer 1998). Zároveň je ichtyofauna Střední a Jižní Ameriky značného stáří, jehož časový odhad navíc dle Lundberga (1998) s poznáváním fosilního záznamu neustále roste. Při pátrání po zdrojích tohoto obrovského druhového bohatství musíme proto zohlednit historii kontinentu a její vliv na modelování neotropické říční sítě nejméně od doby pozdněkřídové.

Dokonalou syntézu historického vývoje jihoamerických řek provedli Lundberg et al. (1998); z této práce jednoznačně vyplývá vliv andské tektoniky a mořských transgresí jakožto dvou primárních faktorů formujících hydrologické poměry tohoto světadílu. K iniciaci zdvihu prvotních And a následné propagace andského orogenu východním směrem došlo před zhruba 90 miliony let v souvislosti s dokončením oddělování jihoamerického kontinentu od Afriky. Posun vrásněného pásu směrem ke stabilním oblastem Guyanského a Brazílského štítu doprovázený postupným zdvihem andských hřebenů probíhal dalších asi 80 milionů let. V tomto vývoji lze vysledovat šest megacyklů taktovaných velkými tektonickými ději, které byly iniciovány pohybem pevninských bloků (Lundberg et al. 1998, shrnutí Piálek 2006). Důsledkem byly postupně se měnící makrohydrologické poměry v andské pánvi, do které byly původně svedeny říční systémy horní a střední Amazonky a Orinoka a horní Paraná odtékající společně severním směrem do Karibiku (obr. 1A). Stejně tak se měnily podmínky v dolních částech povodí dnešní Amazonky, Orinoka a Paraná, které zaujímaly samostatné pánve odvodňované do Atlantského oceánu. K dynamické transformaci akvatických systémů a alternaci jejich charakteru mezi říčním, jezerním, brakickým až marinním přispíval nadto mořský prvek. Rozsah transgresí byl určován jednak eustatickou výškou hladiny, jednak aktuálním zatížením (a sklonem) kontinentu a stupněm zaplnění andské pánve geologickým substrátem, kteréžto dva jevy byly opět závislé na postupu andské orogeneze.

Během období miocénu postupně nastala situace, kdy se andský pás dostal do kontaktu s oběma prekambričovými kratony do té míry, že byl zadržen postup synklinály východním směrem a andská pánev se postupně plnila depozity. Došlo rovněž ke zvýraznění strukturních oblouků Michicola a Vaupes, které se nacházejí v místech nejtěsnějšího kontaktu andského pásma s Guyanským, resp. Brazílským štítem a tvoří dnešní rozvodí Orinoko - Amazonka, resp. Amazonka - Paraná. Před 8 až 7 mil. let došlo k uzavření odtoku do Karibiku v důsledku zdvihu severních hřebenů venezuelských And a v depozity zaplněné andské pánvi se začala hromadit zadržená voda. Po určitém období bezodtoké fáze vyvrcholila transformace říční sítě proražením oblouků El Baul, resp. Purus a propojením dolních a horních částí Orinoka, resp. Amazonky navzájem. Ustavila se tak dnešní podoba obou těchto veletoků směřujících z podhůří And na západě ke svých východním deltám v Atlantském oceánu (obr. 1B). Vlivem tohoto vývoje pozorujeme dnes těsnější fylogenetické vztahy mezi faunami horních částí obou těchto velkých řek než jsou vztahy mezi faunou horní a dolní Amazonky, resp. Orinoka.

Stručně řečeno, důsledkem kolizí pevninských bloků na pacifickém (a karibském) okraji jihoamerické desky a jimi vyvolaných tektonických jevů byla postupná transformace říční sítě, která se významně podepsala na vývoji neotropické ichtyofauny a biogeografických vzorech jejího dnešního rozšíření. Kontrast mezi dynamickým děním v západní části kontinentu a stabilitou jeho východní prekambričové platformy je nepřehlédnutelný. Na rozhraní těchto dvou domén nutně docházelo k trvalému



Obr. 1: Paleohydrografický vývoj Jižní Ameriky. A - Stav říčních systémů v období před 43 - 30 mil. let, B - Transformace říčních systémů v průběhu pozdního miocénu. Převzato z Lundberga et al. (1998).

kontaktu odlišných a dynamicky se vyvíjejících faun, které zde navíc mohly opakovaně nalézat útočiště v dobách velkých mořských inkurzí. Tyto principy jsou základem několika hypotéz pokoušejících se objasnit historické příčiny neotropické diverzity (přehled Hubert & Renno 2006, Plálek 2006).

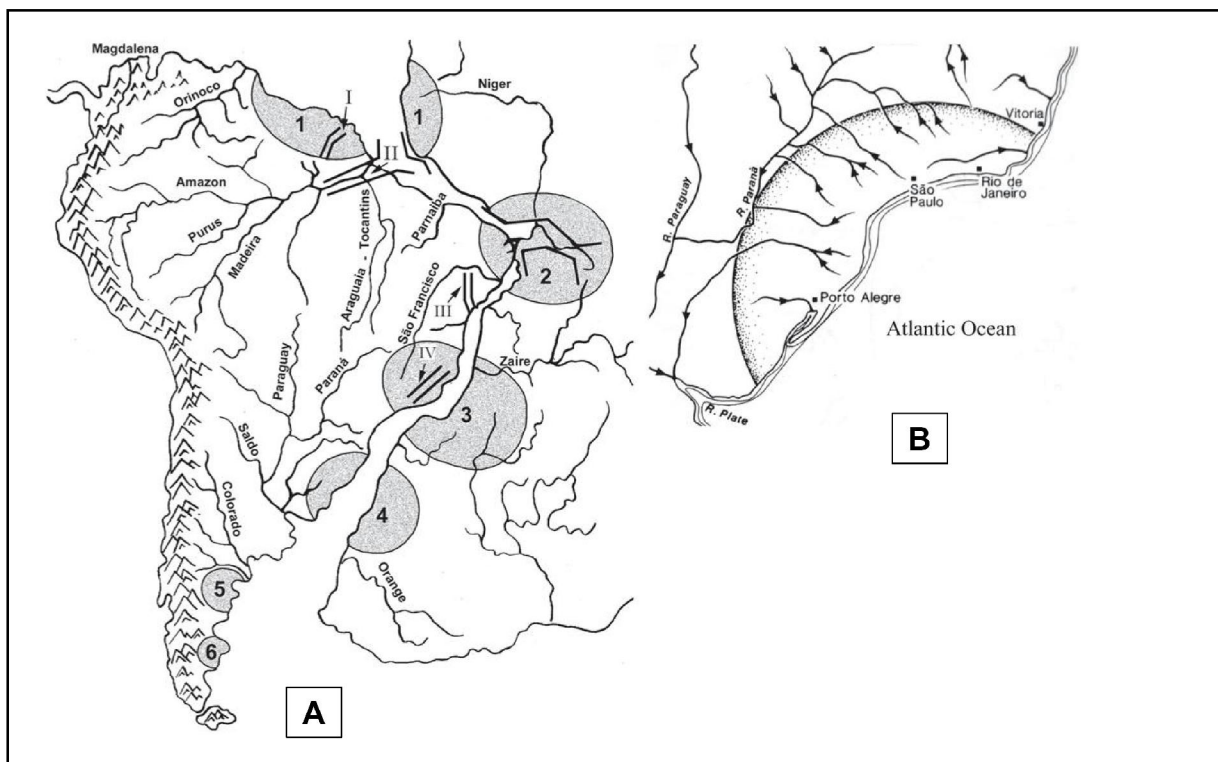
Diverzifikace fauny na atlantském pevninském okraji

Deskovou tektoniku zákonitě provázely významné jevy i na protilehlém východním, z geomorfologického hlediska pasivním okraji jihoamerické pevniny. O dynamice geologického vývoje na atlantském pevninském okraji a jeho vlivu na diverzifikaci ichtyofauny obývajících pobřežní řeky a přiléhající části vnitrokontinentálních povodí bylo zatím napsáno velmi málo. Ribeiro (2006) asocioval distribuční vzorce a fylogenetické vztahy různých skupin neotropických sladkovodních ryb s geologickým vývojem atlantského kontinentálního okraje. Definoval hlavní geologické procesy modelující zdejší říční faunu, které časově spadají do tří různých historických období. Vliv těchto procesů posléze demonstroval na konkrétních kladogenetických událostech na třech různých fylogenetických stupních.

Ribeirova práce je pro negeologa poměrně obtížně stravitelným textem, jehož reprodukce vyžaduje předem definovat hlavní používané pojmy. Prvním z nich je megadóm; listováním v geologických slovnících (např. Svoboda et al. 1960) a pospojováním několika různých hesel z oblasti tektoniky lze dojít k závěru, že dóm je brachyantiklinála, tedy sedlovitá součást vrásy, jejíž osa se na obě strany ve směru protažení noří, a tudíž periklinálně uzavírá, a která je v horizontálním průřezu stejně široká jako dlouhá. Z laického pohledu biologa je megadóm rozlehlá kupolovitá struktura zemského povrchu, která je tektonického původu. Ještě názorněji si megadómy představíme jako obří (několik set kilometrů v průměru) puchýře zemské kůry, které v našem případě vznikly při rozpadu západní

Gondwany v oblasti interkontinentálního riftu oddělujícího budoucí Jižní Ameriku od Afriky. Na obou nových kontinentech tak po odtržení zůstala zhruba polovina každého z těchto "megapuchýřů". Dalším termínem je rift, v překladu jednoduše trhлина, který geologická čeština přejímá v původní podobě. Jak srozumitelně objasňuje Cajz (2004) v obsáhlé rešerši věnované přednostně tomuto výrazu, je rift a hlavně mechanismus jeho vývoje jevem často nesrozumitelným samotným geologům. Jednoduše řečeno je rift úzká podélná struktura v zemské kůře, která je charakterizována ztenčením litosféry (odborníci laskavě prominou). Právě kvůli narušení litosferického obalu se rift stává častým místem projevu různých tektonických procesů a deformačních sil. V našem případě se jedná o rifty vnitropelninské, které se ve velkém množství nacházejí v oblasti atlantského okraje jihoamerické pevniny coby pozůstatky kontinentální kolize a většinou s ním sdílejí víceméně rovnoběžný směr.

V souvislosti s oddělením jihoamerického kontinentu od Afriky (cca 98 - 93 mil. let) předpokládá Ribeiro na atlantském pobřeží existenci šesti hlavních megadómů (obr. 2A). Řeky odvodňující oblast megadómu tekly v radiálním směru dovnitř do vnitrozemí a vlévaly se do rozsáhlejšího říčního systému, který svým průběhem zhruba kopíroval obvod megadómu a vléval se o několik set kilometrů dále do Atlantiku (obr. 2B). Potter (1997) zdůrazňuje, že ze všech jihoamerických řek splňuje nejlépe představu tohoto modelu řeka Paraná. Jak již bylo naznačeno, celý pás atlantského pobřeží je protkán bohatým systémem intrakontinentálních riftů, které jsou pozůstatkem deformačních procesů spojených s roztržením západní Gondwany. Velmi zjednodušeně si můžeme tuto oblast představit jako obrovskou čokoládu, jejíž dílky mají tvar extrémně dlouhých obdélníků.



Obr. 2: A - Schematické znázornění šesti megadómů vzniklých při rozpadu západní Gondwany a jejich poloha na jihoamerickém kontinentu. B - Naznačení obvodového říčního systému megadómu (Paraná) s radiální sítí zdrojnic. Převzato z Ribeira (2006).

V období zvýšeného působení tektonických sil a ve spojení s vulkanickou aktivitou (především v oblasti vulkanického centra Vitória/Trindade na jv. pobřeží Brazílie) došlo k rozlámání pobřežního pásu do bloků, které vytvořilo prostor následné erozi. Zatížení pevninského okraje vytvořeným

geologickým substrátem zúsobilo gravitační nerovnováhu v zemské kůře, k jejímuž izostatickému vyrovnání došlo prostřednictvím vertikálních pohybů riftových bloků. Výsledkem celého procesu, který můžeme nazvat reaktivací starých riftových struktur, je mj. stupňovitý pokles okraje pevninského pásu. Uvedená reaktivace riftu probíhá opakovaně, v megacyklech iniciovaných týmiž tektonickými událostmi jako andská orogeneze. Popisované schéma je z pochopitelných důvodů značně zjednodušené.

S prvotními reaktivacemi riftu spojuje Ribeiro vznik většiny atlantských pobřežních řek, které směřují víceméně kolmo k pevninskému okraji a odtékají do Atlantského oceánu. Při tomto procesu došlo k oddělení horních pásem řek radiálně odvodňujících megadóm a k obrácení směru jejich toku. Z biogeografického hlediska představuje tento krok původní vikariantní událost mezi povodími na pobřeží a uvnitř kontinentu. V dalších cyklech docházelo k opakované přestavbě rozvodí a jeho posunu směrem do vnitrozemí, což umožňovalo výměnu ichtyofaun mezi nově ustavenými pobřežními systémy a přílehlými vnitrokontinentálními řekami. Zatímco k přechodu fauny mezi povodími po gravitačním gradientu postačí pouhá eroze, která může ovlivněním průběhu koryta vyvolat posun rozvodí, Ribeirův model založený na vertikálních pohybech riftových bloků nabízí "výťah" i pro pohyb v opačném směru.

Uvedenými geologickými ději vysvětluje Ribeiro kladogenetické události na třech různých fylogenetických úrovních, které odpovídají vikarianci faun mezi pobřežními a vnitrozemskými řekami ve třech různých časových horizontech. "Model A" reprezentuje nejstarší schéma (počátek ve starších třetihorách až miocénu), jehož projevem je sesterský vztah pobřežního a kontinentálního taxonu na úrovni podčeledi nebo čeledi. Pro tento model je charakteristická existence bazální, druhově chudé linie z pobřežní oblasti a bohatě diverzifikovaného kladu, jehož zástupci osídlili rozsáhlou část neotropické oblasti (např. 6 bazálních druhů vs. celý zbytek čeledi Trichomycteridae). "Model B" je obdobou uvedeného sesterského uskupení na mezidruhové nebo mezidruhové úrovni. Vlivem obousměrné výměny faun nemusí být v tomto případě skupina z pobřeží výrazně méně diverzifikována. Důsledkem kratšího časového plánu pro tento evoluční scénář (začátek v mladších třetihorách až pleistocénu) je kromě rozdílné fylogenetické úrovně i menší velikost kontinentálního areálu (např. 2 druhy *Lignobrycon* vs. 16 druhů *Triportheus*, Characidae). Konečně "model C" vysvětluje sdílení taxonů mezi pobřežními řekami a přílehlými přítoky na druhové úrovni. Tento model předpokládá recentní reaktivaci riftu v průběhu holocénu a s ní spojenou výměnu faun bez následné diverzifikace; nabízí tak zatím nejvhodnější vysvětlení pro vysokou frekvenci sdílení druhů, která je např. u pobřežních řek přiléhajících přítokům horní Paraná 17 % (Bizerril 1994).

Ribeirova práce naznačila, že je atlantský pevninský okraj domovem vysoce endemité a bohatě diverzifikované rybí fauny, která zůstává dodnes z velké části nepopsána, a že speciální procesy probíhající v této oblasti jsou studovatelné. Mimo obvyklé překážky brání však hlubšímu poznání evolučních dějů i na jihoamerické poměry neobvykle drastická a stále pokračující devastace zdejších původních lesních ekosystémů označovaných obvykle souhrnným pojmem Atlantský prales.

Atlantský prales

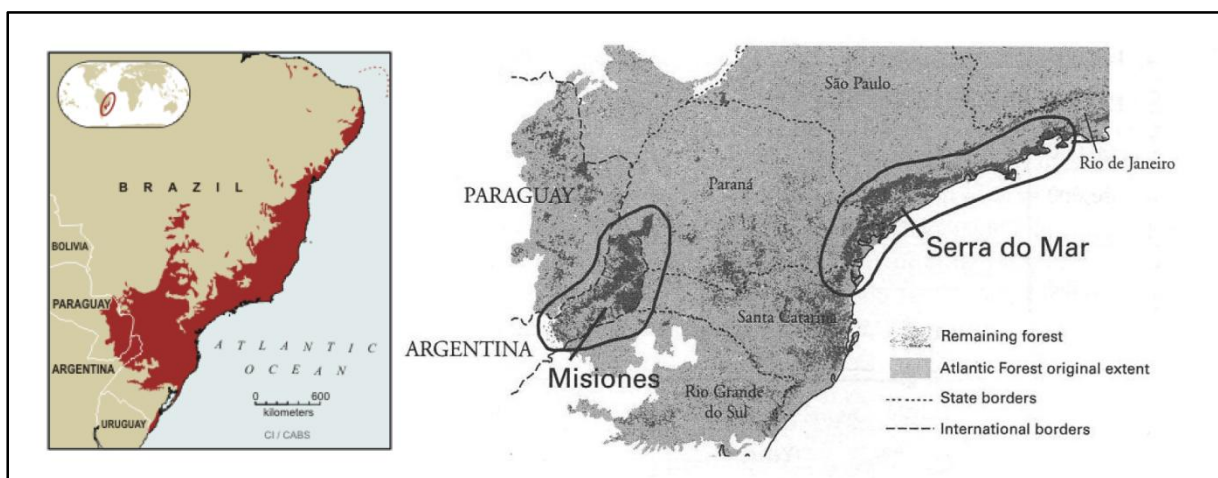
Atlantský prales je jedním z 34 definovaných světových center biodiverzity, tzv. hotspotů (<http://www.biodiversityhotspots.org>). Koncept hotspotů definoval Myers (1988) a jeho cílem je účinná ochrana a efektivní alokace zdrojů do zachování celosvětového druhového bohatství. Podmínky zařazení oblasti mezi hotpoty se postupně vyvíjejí, základním předpokladem ale zůstává

redukce původního vegetačního pokryvu o více než 70 %. Ekosystémy takto označené jsou dnes společně domovem více než 77 % terestrických obratlovců obývajících naši planetu. Tato kritická území zaujímají celkem plochu okolo 2,3 % suchozemského povrchu a žijí v nich téměř 2 miliardy obyvatel (<http://www.biodiversityhotspots.org>), kteří jsou většinou na rostlinných a živočišných výstupech původních ekosystémů existenčně závislí.

Panuje všeobecná shoda, že jedním z nejzdevastovanějších a nejvíce ohrožených hotspotů je právě Atlantský prales; na tomto území je dynamika změn zjevně nejrychlejší a potřeba ochranných zásahů nejnaléhavější. V současné době zůstává již jen asi 7 - 8 % pralesa z prvotních 1 až 1,5 mil. km², který je navíc silně fragmentován (Galindo-Leal & Câmara 2003). K pravdivému vykreslení současného stavu je nutné dodat, že přes rozsáhlé a rychlé ničení jejich životního prostředí přežívají (alespoň prozatím) téměř všechny rozpoznávané druhy obratlovců ve zbývajících izolovaných ostrůvcích původního lesa; k recentnímu popisu druhů nových dochází na tomto území dokonce v tak prozkoumaných skupinách jako jsou primáti. Tato skutečnost snad zůstane důkazem o životaschopnosti organismů a podnětem k vědeckým studiím spíše než argumentem ospravedlňujícím bezuzdnou likvidaci.

Zbytky Atlantského pralesa dnes vyplňují oblast rozkládající se na atlantském pobřeží Brazílie mezi státem Rio Grande do Norte (s hlavním městem Natal) na severu až po jižní Rio Grande do Sul (Porto Alegre), která zasahuje do vnitrozemí přes severní Argentinu až po východní část Paraguaye. Atlantský prales zahrnuje rozličné ekosystémy z nichž nejvýznamnější jsou tropický a subtropický stálezelený les, tropický sezónní les, savana a mangrove. Podle Mittermeiera et al. (2004) se na jeho území vyskytuje 20 000 druhů cévnatých rostlin (z nichž je 40 % endemitních), 263 druhů savců (27 %), 936 druhů ptáků (16 %), 306 druhů plazů (31 %), 475 druhů obojživelníků (60 %) a 350 druhů sladkovodních ryb (38 %).

Při pohledu na satelitní snímky (<http://earth.google.com>) nebo na mapu zobrazující vegetační pokryv (obr. 3) lze zjistit, že se v oblasti dosud zachovaly dva poněkud rozsáhlejší fragmenty původního celku. Prvním z nich je Serra do Mar, asi 1 500 km dlouhý přerušovaný horský hřeben táhnoucí se těsně podél pobřeží mezi Curitiba a Rio de Janeiro. Tropická vegetace zde odolává civilizačnímu



Obr. 3: Situační mapka s vyznačením původní rozlohy Atlantského lesa (vlevo) a mapa znázorňující dnešní fragmentaci zbývajících lesních porostů (tmavý odstín). Pouze dva z těchto fragmentů převyšují svou rozlohou 10 000 km², Serra do Mar a Misiónes (vpravo). Převzato z <http://www.biodiversityhotspots.org> a Galindo-Leal & Câmara (2003).

náporu převážně na strmých jihovýchodních svazích. Pro zdejší deštný les jsou charakteristické araukárie a stálezelené dřeviny čeledí Lauraceae a Myrtaceae. Druhým kompaktním zbytkem původní rozlohy je oblast argentinské provincie Misiones propojená s malým zbytkem pralesa na území brazilského státu Paraná prostřednictvím hraničního národního parku Iguazú.

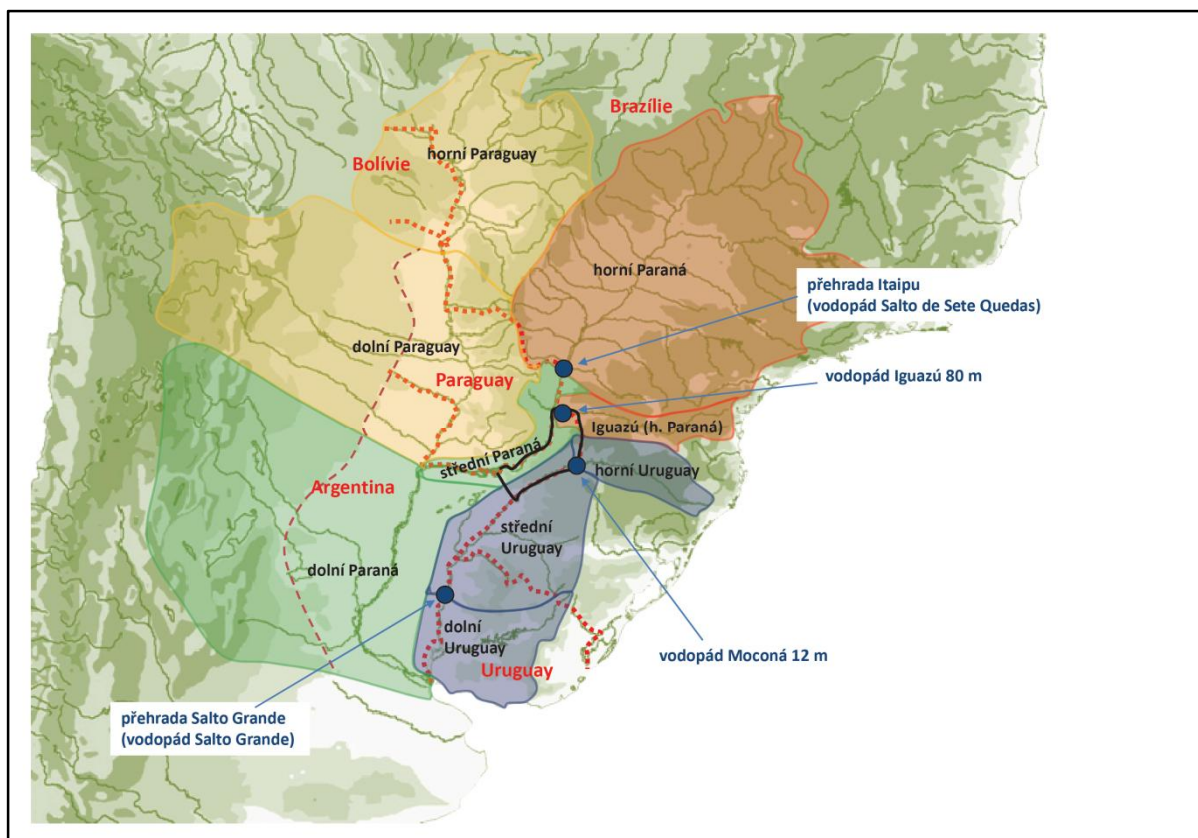
Provincie Misiones a její ichtyofauna

Provincie Misiones vyplňuje úzký zahnutý výběžek argentinského území na severovýchodě státu, kterým se Argentina vklíní mezi Paraguay a Brazílii. Většina hranice této druhé nejmenší provincie je přírodního charakteru a tvoří ji vodní toky: Paraná na západě, její přítok Iguazú na severu, San Antonio (přítok Iguazú) a Pepirí-Guazú (přítok Uruguaye) na východě a vlastní tok Uruguay na jihovýchodě. Na jižní straně oddělují Misiones od sousední provincie Corrientes řeky Chimiray (přítok Uruguay) a Itaembé (přítok Paraná). Provincie zaujímá plochu 30 719 km², což tvoří necelé 1,1 % argentinské rozlohy (Chebez 1996).

Geografický reliéf provincie tvoří zvlněná náhorní plošina s typicky červenou hlubokou půdou. Jeho nejvýznamnějším prvkem je centrální horský hřeben, který je rozvodím mezi dvěma velkými hraničními řekami Paraná a Uruguay a zvyšuje se směrem k severu (nejvyšší bod 843 m n. m.). Klima je subtropické bez výrazného období sucha, průměrná roční teplota je 20,1 °C. Nejteplejším měsícem bývá leden, nejchladnějším červenec; denní výkyvy se pohybují kolem 10 °C. Roční úhrnné srážky tvoří v průměru 1 650 mm (údaje z let 1959 - 1973), ale meziroční variace jsou velké (max. 2 638 mm). Nedávná dlouhotrvající období sucha jsou dáвана do souvislosti s rozsáhlým odlesňováním v obou sousedních zemích (Chebez, 1996). K dramatickému úbytku původního pralesa dochází i na území Misiones. Z prvotních asi 87 % plochy provincie se jeho rozloha snížila na 40 % (údaj z roku 1970, Chebez 1996). Charakter zdejšího lesa definoval Cabrera (1976) z převážné většiny jako subtropický stálezelený les vavřínového typu.

Misiones má velmi bohatou říční síť. Podle Chebeze (1996) ji mimo již jmenované velké řeky tvoří 270 vodních toků vlévajících se do Paraná a dalších 120 ústí do jejích přítoků, San Antonio a Iguazú. Jihovýchodní část provincie odvodňuje okolo 400 pravostranných přítoků řeky Uruguay a její pravé zdrojnice Pepirí-Guazú. Provincí prochází nejen rozvodí mezi veletoky Paraná a Uruguay, ale i hranice mezi horní a střední částí jejich povodí (obr. 4). Toto rozdělení toků je tvořeno vodními stupni různé výšky a stáří, z nichž nejznámější jsou vodopády Cataratas del Iguazú a Gran Salto del Moconá (portugalsky Saltos del Yucumã). Třetí z monumentálních vodopádů, 114 metrů vysoký Salto de Sete Quedas na vlastním toku Paraná, definitivně zmizel v roce 1982 pod hladinou přehrady Itaipu.

Vodopád Iguazú tvoří světoznámou dominantu stejnojmenného národního parku na hranicích mezi Argentinou a Brazílií. Jeho nejvyšší příčný stupeň Garganta del Diablo (Ďáblův chřtán) tvoří převýšení okolo 70 metrů a pro rybí faunu je v protivodném směru nepřekonatelný, jak dokazuje absence zástupců některých (pod)čeledí (Clupeidae, Engraulidae, Potamotrygonidae, Serrasalminae) nebo rodů (*Salminus*, *Brycon*, *Prochilodus*, *Pseudoplatystoma*) v horním toku Iguazú (Chebez 1996). Společně s vodopády na dalších přítocích Paraná označil Ringuet (1975) tento vodní stupeň za hranici ichtyogeografické provincie horní Paraná. Stáří Iguazú je odhadováno na 1 až 1,5 milionu let. Tento údaj byl získán prostým vydělením délky kaňonu pod vodopádem oddělujícím jej od hlavního toku Paraná rychlostí, se kterou řeka v několika posledních desítkách let obrušuje jeho hranu (1,4 - 2,1 cm/rok). Pokud by se skutečná doba vzniku příliš nelišila od tohoto triviálního odhadu, neměl by



Obr. 4: Mapa znázorňující jednotlivé části povodí Paraguay, Paraná a Uruguay vzhledem k poloze Misiones. Tato provincie zaujímá strategickou polohu na rozhraní čtyř zoogeografických oblastí.

Iguazú podstatný vliv na distribuci staré neotropické fauny. Shromáždění vhodného souboru fylogenetických dat by umožnilo testování stáří vodopádu prostřednictvím molekulárních hodin.

Vodopád Moconá oddělující horní Uruguay od jejího středního toku je výrazně odlišný od Cataratas del Iguazú. Je pouze 12 metrů vysoký, tvořený téměř dva kilometry dlouhou trhlinou uprostřed řeky směřující podél jejího toku. Moconá je pravděpodobně starší než Iguazú a přes svoji poměrně malou výšku tvoří významnou bariéru mezi ichtyofaunou horní a střední Uruguay (Řičan & Kullander 2008).

Mimo vodopádů Iguazú a Moconá existují vodní stupně tvořící biogeografickou hranici mezi horní a střední částí povodí Paraná, resp. Uruguay i na mnoha dalších přítocích těchto řek (Chebez 1996). Faunu obývající střední částí povodí můžeme označit jako přechodnou. Ta je tvořena z jedné části horskými elementy, které se dokázaly navzdory vodopádům šířit z horních částí povodí a osídlily střední tok, kde postupně narážely na kompetici nížinných druhů. Z druhé části je přechodná fauna tvořena prvky nížinnými, které během postupného rozšiřování areálů proti proudu narazily na nepřekonatelné fyzické překážky.

Jak naznačily předchozí řádky, má provincie Misiones velmi strategické umístění na rozhraní přechodných faun dvou velkých řek; zahrnuje tak vlastně čtyři zoogeografické oblasti (obr. 4). Dalším faktorem favorizujícím zahájení vědeckých studií právě v tomto regionu je nesmírné druhové bohatství této malé provincie. Podle Lópeze et al. (2002) vykazuje Misiones navzdory své nepatrné velikosti nejvyšší míru endemismu mezi všemi argentinskými ichtyoregiony. Chebez (1996) udává 222 druhů ryb vyskytujících se na misionenském území a zdůrazňuje, že nedostatečné údaje pocházejí zvláště z povodí Uruguay. Jak může být výčet z tohoto povodí podhodnocený, lze demonstrovat na

příkladu malé říčky Cuña-Pirú, kde bylo během tří let popsáno 7 nových druhů (Rodríguez & Miquelarena 2005); další dva druhy (rodu *Crenicichla* a *Heptapterus*) se pravděpodobně vyskytují v našich terénních sběrech.

Jako vhodný objekt pro testování diverzifikace fauny podle Ribeirovy (2006) hypotézy vývoje Atlantského okraje zmíněné v jedné z předchozích podkapitol mohou dobře posloužit zástupci čeledi Cichlidae. Cichlidy jsou jednou z nejpočetnějších čeledí perciformních ryb, jejichž neotropická diverzita je velmi stará a jež jsou biogeograficky velmi informativní (Concheiro Pérez et al. 2007). Na území Misiones dominují této skupině tři rody, které se navzájem liší mj. svou biogeografií: *Australoheros*, *Gymnogeophagus* a *Crenicichla*. Typicky nížinné rody cichlid (např. *Cichlasoma* nebo *Bujurquina*) se v provincii Misiones vůbec nevyskytují.

Australoheros

Rod *Australoheros* byl definován Říčanem a Kullanderem (2006) pro druhovou skupinu '*Cichlasoma facetum*', která zůstala spolu s dalšími sedmi skupinami druhů po revizi rodu *Cichlasoma* (Kullander 1983) bez aplikovatelného rodového jména. Monofýlie rodu byla autory prokázána na základě molekulární i morfologické analýzy a je přijímána bez výhrad. Autapomorfii rodu je především redukce meristických znaků (počty šupin a obratlů) a tři různé charakteristiky týkající se zbarvení.

Rod *Australoheros* je geograficky nejjihnějším rodem cichlasomatinních cichlid tribu Heroini (odtud název rodu). Je rozšířený v povodí La Plata (dolní a střední Paraná a Paraguay, celé povodí Uruguay) a v pobřežních řekách na území Argentiny, Uruguaye a jižní Brazílie. V současnosti je známo 9 popsanych druhů (Froese & Pauly 2008), které lze zhruba rozdělit do tří biogeografických oblastí: 1. *A. facetus* se vyskytuje v levostranných přítocích brazilské části Uruguay a v pobřežních řekách. Některé z pobřežních populací v sobě skrývají nové druhy; příkladem může být *A. ribeirae* popsany v tomto roce Ottonim et al. (2008) z povodí rio Ribeira do Iguape. 2. Největší diverzitu vykazuje *Australoheros* v povodí Uruguay: *A. forquilha*, *A. charrua*, *A. minuano*, *A. scitulus*, *A. sp.* Jacutinga; lze vystopovat samostatnou historii faun rozdělených vodopádem Moconá. 3. Velký potenciál nepopsané diverzity hostí střední Paraná s levostranným přítokem Iguazú a povodí Paraguay. Z této oblasti jsou známy druhy *A. guaraní*, *A. kaaygua*, *A. tembe*.

Gymnogeophagus

Rod *Gymnogeophagus* Miranda Ribeiro 1918 zahrnuje v době dokončování této práce 10 popsanych druhů (Froese & Pauly 2008) a byl revidován na základě morfologických znaků Reisem a Malabarbou (1988). Podle této studie se jedná o jeden z nejlépe definovaných rodů podčeledi Geophaginae. Nejvýraznější autapomorfii definující tento rod je přítomnost dopředu mířícího ostnu na prvním pterygiophoru hřbetní ploutve, který je při terénní práci nepřehlédnutelný, neboť způsobuje značné obtíže při vyplétání ryb z tenatních sítí (L. Piálek a O. Říčan, pers. obs.). Recentní molekulární analýzy potvrdily monofýlii rodu v rámci geophaginních cichlid (Wimberger et al. 1998, Pereyra & García 2008).

Gymnogeophagus je biogeografickým prvkem dolních a středních oblastí toků, na rozdíl od rodu *Australoheros* nebo *Crenicichla* jej nenalezneme v horských oblastech. Vyskytuje se v povodí střední a dolní Paraná a na dolním toku jejího pravostranného přítoku Paraguay (*G. australis*, *G. balzanii*, *G. caaguazuensis*, *G. che* a *G. setequeadas*), a dále v pobřežních řekách severně od La Platy (na území

jižní Brazílie a státu Uruguay) a v oboustranných přítocích dolní Uruguay (*G. gymnogenys*, *G. labiatus*, *G. lacustris*, *G. meridionalis* a *G. rhabdotus*).

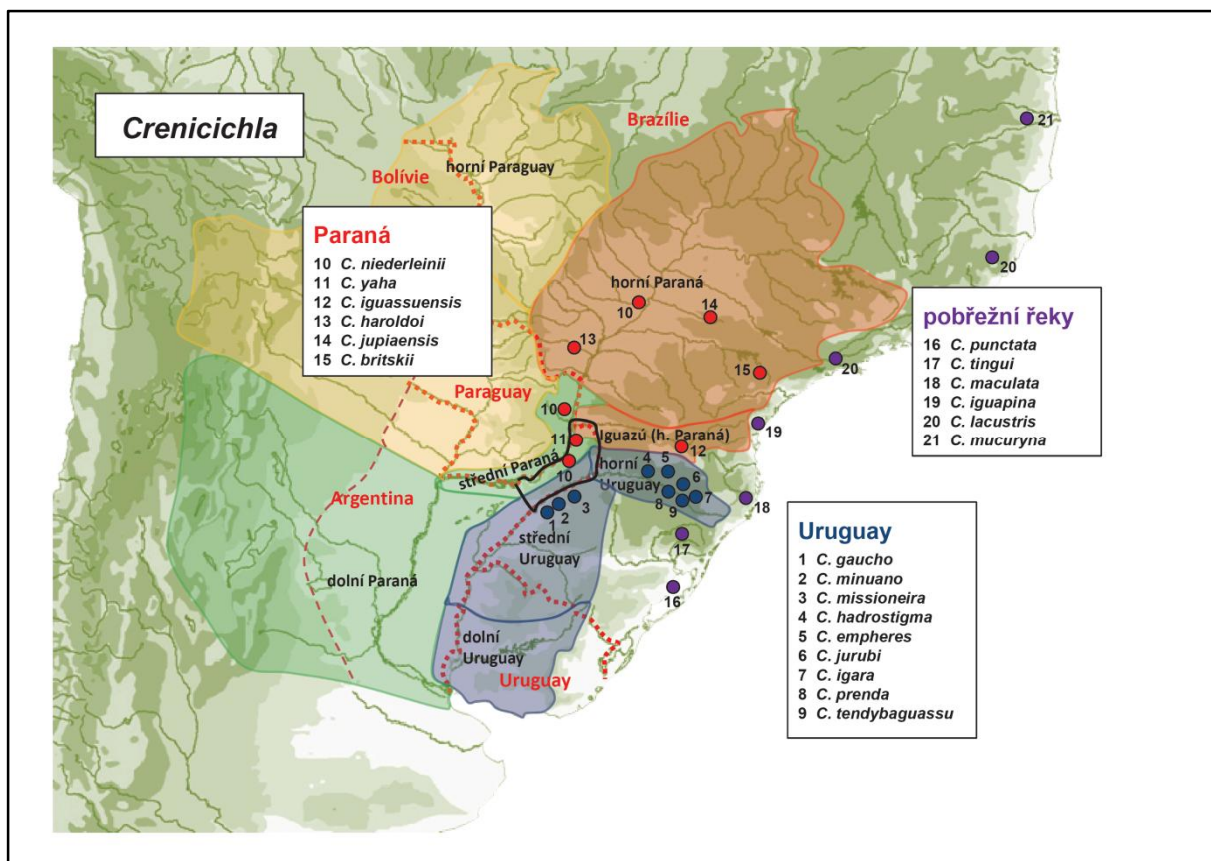
Gymnogeophagus je jedním z mála rodů neotropických cichlid, který vykazuje diverzitu v reprodukčním modu (Wimberger et al. 1998). Někteří zástupci (např. *G. meridionalis*) kladou jikry na substrát, na kterém probíhá vývoj až do úplného vylihnutí. Jiní (např. *G. gymnogenys*) jsou tzv. tlamovci, u kterých samice opatruje potomstvo v obžaberním vaku, a to buď od okamžiku kladení jiker, nebo od stadia těsně před vylihnutím larev. Dosavadní pozorování neumožňují spolehlivě rozhodnout, zda se u tohoto rodu jedná o ovofilní nebo o larvofilní tlamovce; zatím však nebyl v akváriu ani při terénním sledování zaznamenán případ, kdy by samice přechovávala v ústech jikry (Wimberger et al. 1998). Panuje všeobecná shoda, že způsob rodičovské péče úzce koreluje s párovacím systémem, resp. s existencí pohlavního dimorfismu. Akvarijní pozorování druhů *G. meridionalis*, *G. rhabdotus* a *G. setequedas* potvrdila, že se jedná vesměs o monogamní substrátové cichlidy téměř nevykazující sexuální dimorfismus (Loiselle 1985, J. Casciotta pers. comm.). Naproti tomu druhy, u kterých byl zaznamenán odchov potomstva v ústní dutině, vykazují ve všech případech výrazné morfologické rozdíly mezi pohlavími. Samci jsou větší, pestřejší a zvláště v době tření se u nich objevuje výrazný čelní tukový hrbol; párovacím systémem tlamovců je polygynie (Wimberger et al. 1998). Studium evoluce rodičovského chování u cichlid se zabývala řada autorů (např. Stiassny & Gerstner 1992, McLennan 1994). Uvedené práce vesměs považují za ancestrální stav biparentální péči, která se pravděpodobně vyvinula z péče otcovské. Stiassny a Gerstner (1992) zdůrazňují, že pouze jedné ze tří cichlidám sesterských čeledí je vlastní opatrování zárodků samcem a že definitivní rozluštění evoluční dynamiky tohoto jevu si vyžádá další studie. Proto každá fylogeneticky laděná práce zabývající se rodem *Gymnogeophagus* může být přínosem i z hlediska fylogeneze tohoto behaviorálního znaku.

Crenicichla

Rod *Crenicichla* Heckel 1840 je v současném pojetí druhově nejbohatší fylogenetickou linií neotropických cichlid. K jeho diverzitě přispívá i skutečnost, že tento rod nebyl pro svou druhovou komplexitu více než sto let revidován. *Crenicichla* je jediným rodem, který má i v malých vodních tocích často několik sympatrických druhů, zatímco ostatní rody cichlid většinou jen jeden. Zda *Crenicichla* dokáže vytvářet druhy sympatrickou speciací nebo zda se jedná pouze o sympatrii sekundární spojenou s morfologickou divergencí je jedním z lákavých témat této studie.

Crenicichla dnes zahrnuje přes 120 známých druhů (Stawikowski & Werner 2004, autoři zřejmě začleňují i dosud nezveřejněné popisy) a tento počet rychle narůstá. Podle morfologických znaků jsou zástupci tradičně řazeni do 6 druhových skupin, případně 7 skupin včetně rodu *Teleocichla* (např. Ploeg 1991). Skladba druhových skupin mezi jednotlivými autory kolísá; rod *Teleocichla* je podle nejnovějších poznatků vnitřní linií (U. Schliewen, pers. comm.). Molekulární fylogenetická analýza dosud nebyla publikována. Studii zabývající se nejhlubší fylogenezí rodu zpracovává v současnosti M. Miller a U. Schliewen ze Zoologische Staatssammlung München (U. Schliewen, pers. comm.).

V povodí La Platy se vyskytují (mimo *C. semifasciata* obývajících horní tok řeky Paraguay a téměř všudypřítomné *C. lepidota* s.l.) pouze druhy sdružené v tzv. jižní skupině *Crenicichla lacustris* group s.l. (Stawikowski & Werner 2004). Tato skupina zahrnuje několik druhových komplexů, jejichž definice není jednotná (stejně jako definice celé skupiny) a je založena výhradně na morfologických studiích (Kullander 1981, Ploeg 1991, Lucena & Kullander 1992). Porovnání jednotlivých



Obr. 5: Biogeografické rozdělení druhů řazených do jižní skupiny rodu *Crenicichla* a schematické znázornění jejich výskytu.

systematických konceptů zevrubně líčí Stawikowski a Werner (2004) a podávají výčet taxonů náležících do *Crenicichla lacustris* group s.l.: *C. iguassuensis*, *C. jupiaensis*, *C. lacustris* complex [*C. dorsocellata*, *C. lacustris*], *C. missioneira* complex [*C. igara*, *C. jurubi*, *C. minuano*, *C. missioneira*, *C. punctata*, *C. tendybaguassu*], *C. mucuryna*, *C. niederleinii* complex [*C. haroldoi*, *C. jaguarensis*, *C. niederleinii*], *C. scottii* complex [*C. gaucho*, *C. prenda*, *C. scottii*]. Jako nezařazené ponechávají autoři dva druhy, které jsou jinými pracemi začleňovány do jižní skupiny, a to *C. celidochilus* a *C. vittata*. K tomuto seznamu nutno přičíst taxony definované později; jedná se o tři druhy popsané Kullanderem a Lucenou (2006) z pobřežních řek jižní Brazílie (*C. iguapina*, *C. maculata*, *C. tingui*), dva druhy definované Lucenou (2007) z horní části povodí Uruguay (*C. empheres*, *C. hadrostigma*) a konečně o druh *C. yaha*, popsáný Casciottou et al. (2006b) z přítoků střední Paraná v Misiones. Za zmínku stojí, že ze 12 druhů této jižní skupiny obývajících lokality na území Argentiny jich bylo 10 zaznamenáno na území provincie Misiones (Casciotta et al. 2006b); z této oblasti zřejmě přibude v nejbližší době další nový popis, *C. tesay* (J. Casciotta, pers. comm.).

Jak stručně naznačil předchozí odstavec, dosavadní morfologické analýzy nevněsly do fylogenetických vztahů skupiny *C. lacustris* group mnoho světla a v současném stadiu situaci spíše znepřehledňují; z praktického hlediska užitečnější pohled nabízí biogeografické rozdělení jižních druhů do tří hlavních skupin (obr. 5). Pokud je mi známo, tak do dnešního dne nebyly publikovány žádné molekulární práce zabývající se příbuzenskými vztahy v rámci uvedené skupiny a rovněž v připravované studii M. Millera a U. Schliewena je *C. lacustris* group zastoupena pouze okrajově (M. Miller, pers. comm.). Práci na tomto rodu dále komplikuje, že ani u recentně popisovaných druhů nebývá odebírán vzorek DNA pro molekulární analýzu, vouchery jsou nezhřídka nevhodně konzervovány a situaci neulehčuje ani výrazný

pohlavní dimorfismus většiny druhů. Homologizace terénních sběrů s typovými exempláři jakožto i typů navzájem bez návštěvy typových lokalit je proto většinou nemožná. Soudě dle mizivého zastoupení nukleotidových sekvencí takto početného rodu v databázi GenBank se dají předvídat i možné technické problémy s izolací a amplifikací příslušných genových markerů. Potenciálně komplikované fylogenetické vztahy uvnitř skupiny nepřímo naznačuje rovněž Benzaquem et al. (2008), podle nichž "*C. lacustris* group vykazuje méně konzervované cytogenetické charakteristiky než ostatní skupiny, což může indikovat disperzi a speciaci rodu *Crenicichla* severojižním směrem".

Z dosavadně uvedeného jasně vyplývá, že jakákoli podrobnější molekulární fylogenetická a biogeografická mikrostudie rodu *Crenicichla* provedená na relativně malém, leč klíčovém prostoru misionského regionu je cenným a bez nadsázky pionýrským příspěvkem k poznání této rozsáhlé skupiny.

Shrnutí cílů

- 1) Uskutečnit první etapu fylogenetické a biogeografické studie čeledi Cichlidae v oblasti Atlantského pralesa, za jejíž cíl byla zvolena provincie Misiones. Relativně malá rozloha tohoto území a obrovská druhová diverzita zahrnující čtyři zoogeografické oblasti je příslibem efektivního vynaložení finančních prostředků, lidských zdrojů i logistické zvládnutelnosti terénního výzkumu v reálném čase.
- 2) Ověřit volbu rodů *Australoheros*, *Gymnogeophagus* a *Crenicichla* jako modelů pro studium evolučních procesů a distribučních vzorců ve studované oblasti.
- 3) Provést předběžnou fylogenetickou a biogeografickou analýzu uvedených rodů se zahrnutím již publikovaných morfologických i molekulárních dat, zaměřit se na porovnání výsledků s existujícími taxonomickými konstrukcemi.
- 4) V případě úspěšného splnění předchozích cílů bude projekt pokračovat akvizicí a vyhodnocením vzorků z oblasti východní Paraguaye a jižní Brazílie, aby bylo možné v konečné fázi fylogeneticky a biogeograficky zpracovat celou studovanou oblast povodí La Plata a přilehlých pobřežních řek (není obsahem této diplomové práce).

Metody

Terénní sběry

Sběr vzorků byl prováděn co nejrovnoměrněji na celém území provincie Misiones v povodí obou hlavních řek, Paraná a Uruguay. Počet a výběr prochyťovaných míst byl limitován špatnou dostupností mnoha lokalit a dále polohou národního parku Iguazú a provinčního parku Urugua-í, na jejichž území se nepodařilo získat povolení k odchytu. Bylo proloveno 22 lokalit na území Misiones a dva nížinné biotopy v provincii Corrientes (tab. 1, obr. 6). Nejvíce vzorků bylo získáno odchytem do tenat, v menší míře byly používány další rybolovné metody: elektroagregát, vrhací síť a udice.

Tkáň určená k izolaci DNA byla po usmrcení ryby předávkováním anestetika MS 222 odebrána ze žaber, ploutví nebo ocasní svaloviny a fixována 95 % ethanolem. Celé exempláře byly konzervovány 4 % roztokem formaldehydu a uloženy J. Casciottou v muzeu v La Platě (Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, UNLP) k morfologické analýze. Celkem bylo odebráno 296 tkáňových vzorků DNA (*Australoheros* 40, *Gymnogeophagus* 46, *Crenicichla* 201, ostatní 9).

Tab. 1: Seznam prochyťovaných lokalit. Písmeno v závorce ve sloupci 'řeka' označuje povodí (P - Paraná, U - Uruguay), 'n. v.' = nadmořská výška, 'lov' = rybolovná metoda (T - tenata, E - elektrický agregát, V - vrhací síť, U - udice; řazení odpovídá úspěšnosti prostředků pro příslušnou lokalitu).

Č.	Datum	Řeka	GPS	N.v.	Lov
L1	27.-29.11.07	A. Deseado, San Antonio, Iguazu (P)	25°40'15.7" S, 53°55'58.7" W	198 m	TU
L2	28.11.07	A. Lobo, Iguazu (P)	25°42'34.8" S, 54°05'39.4" W	279 m	E
L3	28.11.07	lesní rybníček na malém potoku (P)	25°41'24.0" S, 54°07'26.6" W	294 m	VU
L4	29.11.07	malý lesní přítok A. Uruguai (P)	25°58'26.2" S, 54°15'28.8" W	243 m	TV
L5	30.11.07	malý přítok Rio Iguazu (P)	25°46'58.8" S, 54°02'16.0" W	297 m	E
L6	30.11.07	Piray Mini (P)	26°20'00.3" S, 53°52'30.0" W	476 m	TEU
L7	30.11.07	Piray Guazú (P)	26°26'34.1" S, 54°08'29.4" W	288 m	T
L8	1.12.07	A. Fortaleza (U)	26°45'56.6" S, 54°10'57.4" W	402 m	T
L9	1.12.07	A. Soberbio (U)	27°16'55.2" S, 54°11'47.6" W	170 m	T
L10A	2.12.07	přítok Rio Yaboti, nad vodopádem (U)	27°14'15.1" S, 54°02'38.5" W	152 m	T
L10B	2.12.07	přítok Rio Yaboti, pod vodopádem (U)	27°14'15.1" S, 54°02'38.5" W	144 m	TU
L11	3.12.07	A. Changai (U)	27°28'13.8" S, 54°41'24.5" W	140 m	TE
L12	3.12.07	A. Patria (U)	27°45'57.4" S, 55°09'33.7" W	104 m	TU
L13	4.12.07	A. Tamandua (U)	27°05'56.5" S, 54°45'48.9" W	436 m	TE
L14	4.12.07	A. Paranay Guazú (P)	26°48'27.1" S, 54°45'37.7" W	197 m	TVU
L15	5.12.07	A. Cunapiru (P)	27°05'18.7" S, 54°57'07.5" W	189 m	TU
L16	5.12.07	A. Tucangua (P)	27°02'18.5" S, 55°02'14.1" W	118 m	T
L17	6.12.07	A. Cunapiru above Salto Encantado (P)	27°03'19.7" S, 54°49'16.8" W	427 m	TE
L18	6.12.07	A. Guarupé (P)	26°53'02.1" S, 54°53'32.6" W	174 m	TU
L19	6.12.07	Salto 3de Mayo (P)	26°45'31.5" S, 54°55'28.1" W	96 m	TU
L20	7.12.07	A. Paranay Guazú - horní tok (P)	26°49'03.5" S, 54°26'58.9" W	301 m	TU
L21	7.12.07	A. Chapa (P)	27°17'42.0" S, 55°11'01.8" W	221 m	TUV
L22	8.12.07	malý potok sev. od Apostoles (U)	27°50'50.2" S, 55°45'53.9" W	126 m	TE
L23	9.12.07	laguna Iberá (P)	28°32'47.3" S, 57°11'44.7" W	62 m	TU
L24	11.12.07	Corrientes (U)	29°36'49.6" S, 58°07'06.1" W	85 m	V

mitochondriálnímu genu cytochromu b (cca 1140 bp) byly v případě rodů *Australoheros* a *Gymnogeophagus* úspěšně amplifikovány metodou PCR s použitím primerů GLUDG.L-5' (TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG, Palumbi et al. 1991) a H15915-3' (AAC TGC CAG TCA TCT CCG GGT TAC AAG AC, Irwin et al. 1991). Reakční objem 25 µl obsahoval 12,5 µl Combi PPP Master Mix (Top-Bio), 1,5 µl každého primeru (10 pmol/µl) a 1 µl extrahované DNA. PCR reakce byla prováděna na termocykleru PTC-150 (MJ Research) a zahrnovala počáteční denaturaci 2 min. 94 °C, 35 cyklů [denaturace 1 min. 94 °C, nasednutí primeru 1 min. 50 °C, extenze 1 min. 72 °C] a finální extenzi 8 min. 72 °C. Produkty PCR byly přečištěny soupravou JETQUICK PCR Purification Spin Kit (Genomed).

Sekvenační reakce byla provedena standardním postupem s použitím stejných primerů, sekvence byly analyzovány na automatickém sekvenátoru ABI 3730XL Applied Biosystems (obojí provedla firma MacroGen Ltd.). Chromatogramy byly zkontrolovány a sestaveny do výsledných sekvencí s použitím programu BioLign version 4.0.6.2 (Hall, 2005). Sekvence byly alignovány softwarem BioEdit version 6.0.5 (Hall, 2004) odděleně pro každý rod.

V případě rodu *Crenicichla* nebylo z řady vzorků možné získat uvedeným postupem žádaný produkt. Alternativně byla proto amplifikována částečná sekvence cytochromu b (cca 660 bp) prostřednictvím primerů GLUDG-5' (CGA AGC TTG ACT TGA ARA ACC AYC GTT G) a Cytb3-3' (GCC AAA TAG GAA RTA TCA TTC) (Willis et al. 2007). PCR reakce byla prováděna v objemu 25 µl (30 s 94 °C, 30 x [30 s 94 °C, 45 s 52 °C, 90 s 72 °C], 5 min. 72 °C). Tímto způsobem se zvýšila úspěšnost amplifikace na více než 90 %. Výsledné sekvence byly proměnlivé kvality a některé chromatogramy obsahovaly u řady nukleotidů dvojitý signál indikující směsný templát; při prvotní analýze zaujímalo několik sekvencí velmi neočekávanou pozici v předběžném fylogenetickém stromu. Vzhledem k tomu, že amplifikovanými produkty mohly být v některých případech paralogy genu pro cytochrom b obsažené v jaderné DNA (tzv. NUMT, jaderné sekvence mitochondriálního původu), byl pro rod *Crenicichla* zvolen jako genový marker mitochondriální gen ND2 (druhá podjednotka NADH dehydrogenázy) včetně sousedních genů pro tRNA Met a Trp (celkem cca 1300 bp). Použity byly primery ILE-5' (CCG GAT CAC TTT GAT AGA GT) a ASN-3' (CGC GTT TAG CTG TTA ACT AA) (Wimberger et al. 1998). PCR reakce byla prováděna v objemu 25 µl s upraveným teplotním cyklem (10 min. 95 °C, 36 x [10 s 96 °C, 20 s 50 °C, 90 s 68 °C], 10 s 72 °C). Koncentrace jednotlivých složek i veškerý další postup byl stejný jako u cytochromu b. Sekvenační reakce byla na rozdíl od původní Wimbergerovy práce uskutečněna pouze s amplifikačními primery.

Fylogenetické analýzy

Datové soubory se zalignovanými sekvencemi byly uloženy ve formátu NEXUS prostřednictvím programu BioEdit. Pro každý rod zvlášť byla provedena analýza metodou maximální parsimonie (MP) a Bayesovská fylogenetická analýza. Heuristické hledání nejkratšího (MP) stromu bylo prováděno v programu PAUP* (Swofford, 1998) a zahrnovalo 1000 replikací s náhodným přidáváním sekvencí a výměnou větví (branch swapping) metodou TBR (tree bisection reconnection). Podpory jednotlivých uzlů MP stromu byly určeny neparametrickým bootstrapováním (Felsenstein 1985) s 10 000 pseudoreplikací a v případě rodu *Gymnogeophagus* i spočítáním Bremerova (decay) indexu se 100 replikacemi pro každý uzel (Bremer 1988, 1994) prostřednictvím programu PBSpeedy v.0 a PAUP* (PBSpeedy je autorem této diplomové práce vytvořený software s grafickým rozhraním Windows vytvořený v Delphi, který umožňuje pohodlné a rychlé získání několika druhů podpory MP topologie

[Bremer, partitionovaný Bremer, bootstrap a jackknife] prostřednictvím PAUP*; zkušební verze programu bude po dokončeném testování vystavena na <http://www.fishes.cz>).

Bayesovská fylogenetická analýza (BA) byla získána využitím algoritmu tzv. Metropolis-Hastingsovy metody výběru založené na principu Monte Carlo a vycházející z předpokladu Markovových řetězců (Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo method, MCMCMC; Altekar et al. 2004) implementovaného v programu MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001, Ronquist & Huelsenbeck 2003). Pro odhad nejvhodnějšího substitučního modelu podle Akaikova informačního kritéria (AIC) a kritéria hLRT (hierarchical likelihood ratio test) byl použit MrModelTest v2.2 (Nylander 2004), který je zjednodušenou verzí programu ModelTest 3.06 (Posada & Crandall 1998) pro účely BA, a PAUP*. V případě rozdělení fylogenetické matice na několik nezávislých souborů znaků odpovídajícím sekvencím různých genů (*Crenicichla*) za účelem souběžné aplikace různých modelů byly parametry těchto modelů rozpřaženy příkazem 'unlink'. BA byla prováděna kombinovanou analýzou dvou nezávislých běhů, každý s osmi Markovovými řetězci (temp = 0,2). Počet generací se pohyboval mezi 1 a 3 mil. se vzorkovací frekvencí 100. Konvergence ke stabilní hodnotě pravděpodobnosti byla odhadnuta s použitím všech numerických i grafických diagnostických kritérií vyvolaných příkazem "sump"; vzorky získané před dosažením konvergence byly vynechány z analýzy jako tzv. burn-in. Zbývající vzorky byly použity pro rekonstrukci konsenzuálního stromu dle pravidla 50 % majority. Stabilita topologie výsledného stromu byla testována v závislosti na hodnotě burn-in. Při provádění BA analýz bylo využito služeb výpočetního biologického servisního centra Cornell University (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu>), které je částečně podporováno Microsoft Corporation.

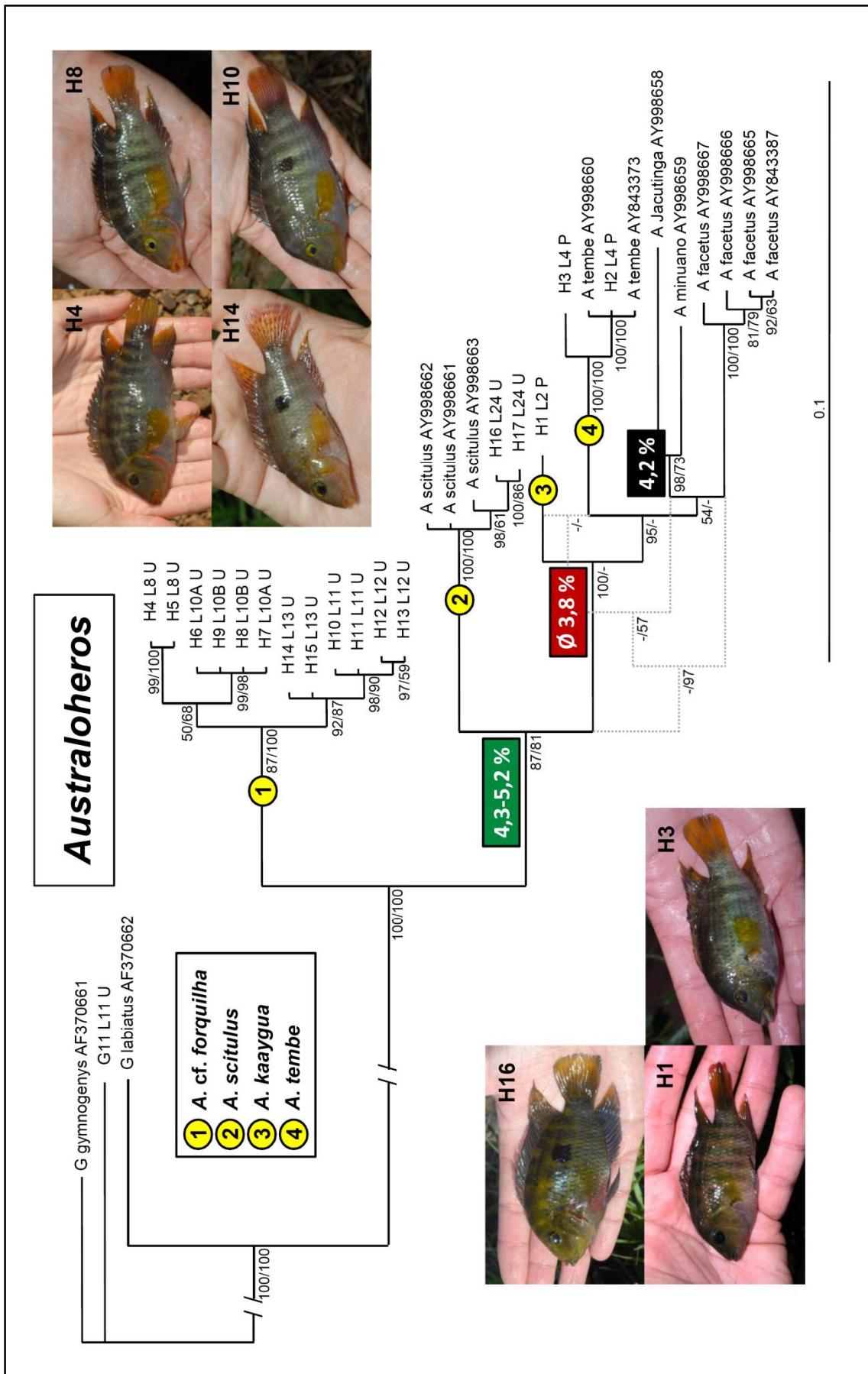
Výsledky

Australoheros

Do fylogenetických analýz bylo zahrnuto celkem 31 sekvencí, z nichž 18 pocházelo z našich terénních sběrů; 13 sekvencí bylo získáno z databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a jsou označeny příslušnými přístupovými kódy (tab. 2). K zakořenění fylogenetického stromu byly použity tři sekvence zástupců rodu *Gymnogeophagus* ve funkci tzv. outgroupu. Zalignovaný datový soubor mitochondriálních sekvencí cytochromu b obsahoval včetně outgroupu celkem 1137 nukleotidů, z nichž bylo 341 variabilních a 284 parsimonně informativních. V rámci samotného rodu *Australoheros* obsahovalo 28 sekvencí celkem 185 variabilních míst, z nichž 145 bylo parsimonně informativních. Mezi sekvencemi z terénních sběrů bylo identifikováno celkem 10 haplotypů rodu *Australoheros* pocházejících z 8 lokalit.

Tab. 2: *Australoheros* - Seznam a původ sekvencí mitochondriálního genu cyt b zahrnutých do fylogenetické analýzy.

Číslo	Lokalita	Název	Poznámka	Sběr
H1	L2	A. kaaygua		28.11.2007
H2	L4	A. tembe		29.11.2007
H3	L4	A. tembe		29.11.2007
H4	L8	A. cf. tembe	samice	1.12.2007
H5	L8	A. cf. tembe	samec	1.12.2007
H6	L10A	A. cf. tembe		2.12.2007
H7	L10A	A. cf. tembe		2.12.2007
H8	L10B	A. cf. tembe	menší	2.12.2007
H9	L10B	A. cf. tembe	větší	2.12.2007
H10	L11	A. cf. tembe		3.12.2007
H11	L11	A. cf. tembe		3.12.2007
H12	L12	A. cf. tembe		3.12.2007
H13	L12	A. cf. tembe		3.12.2007
H14	L13	A. cf. tembe		4.12.2007
H15	L13	A. cf. tembe		4.12.2007
H16	L24	A. scitulus		11.12.2007
H17	L24	A. scitulus		11.12.2007
AY843387	-	A. facetus		GenBank
AY998665	-	A. facetus		GenBank
AY998666	-	A. facetus		GenBank
AY998667	-	A. facetus		GenBank
AY998658	-	A. Jacutinga		GenBank
AY998659	-	A. minuano		GenBank
AY998661	-	A. scitulus		GenBank
AY998662	-	A. scitulus		GenBank
AY998663	-	A. scitulus		GenBank
AY843373	-	A. tembe		GenBank
AY998660	-	A. tembe		GenBank
G11	L11	Gymnogeophagus sp.	outgroup	3.12.2007
AF370661	-	Gymnogeophagus gymnogenys	outgroup	GenBank
AF370662	-	Gymnogeophagus labiatus	outgroup	GenBank



Obr. 7: Výsledný BA strom získaný analýzou sekvencí cytochromu b rodu *Australoheros* s použitím substitučního modelu GTR+I+G. Šedá tečkovaná čára znázorňuje rozdílnou topologii MP stromu oproti BA stromu. Čísla před lomítkem udávají PP hodnoty jednotlivých větví, čísla za lomítkem bootstrapové podpory větví MP stromu (nad 50). Bílá čísla v barevných obdélnících vyjadřují nekorigované divergence příslušných sekvencí.

Výsledkem MP analýzy byly 2 stromy (délka 541 kroků, CI s vyloučením neinformativních pozic 0,7173, RI = 0,8989), které se nepatrně lišily vzájemnou pozicí tří sekvencí *A. scitulus* (všechny GenBank). Méně rozlišený ze dvou MP stromů byl v tomto uzlu shodný s výsledným BA stromem a byl použit pro jejich vzájemné porovnání.

Každé z použitých kritérií pro volbu substitučního modelu určilo jako výsledný jiný model: GTR+G (hLRT), resp. GTR+I+G (AIC). Proto byly provedeny dvě nezávislé BA analýzy, každá s 1 000 000 generací. Ustáleného stavu bylo dosaženo po necelých 8 000, resp. 10 000 generacích (burn-in = 80, resp. 100). Oba stromy vykazovaly neměnnou topologii při testování vlivu hodnoty burn-in (testovaný interval 80, resp. 100 až 5 000), docházelo pouze k nevýznamnému kolísání hodnot posteriorní pravděpodobnosti (PP) jednotlivých uzlů. Topologie obou stromů byla totožná, při použití modelu GTR+I+G byly pro většinu uzlů získány nižší hodnoty PP. Vzhledem k optimálním hodnotám konvergenčních kritérií byl jako finální hypotéza zvolen fylogenetický strom vzešlý z BA s použitím tohoto modelu.

Výsledné BA a MP stromy se lišily topologií jediného z hlavních kladů (obr. 7). Tento klad vyšel v obou analýzách jako monofylum s vysokou hodnotou podpory. Postavení všech dalších haplotypů bylo v obou výsledných stromech shodné.

Gymnogeophagus

Fylogenetické analýzy byly prováděny s 55 sekvencemi, z nichž 26 pocházelo z našich terénních sběrů a 29 sekvencí bylo získáno z databáze GenBank (tab. 3). K zakořenění fylogenetického stromu byly použity tři sekvence zástupců rodu *Geophagus* ve funkci tzv. outgroupu. Zalignovaný datový soubor mitochondriálních sekvencí cytochromu b obsahoval včetně outgroupu celkem 1051 bp (sekvence z GenBank měly délku 571 bp), z nichž bylo 348 variabilních a 321 parsimonně informativních. V rámci samotného rodu *Gymnogeophagus* obsahovalo 52 sekvencí celkem 302 variabilních míst, z nichž 268 bylo parsimonně informativních. Mezi sekvencemi z terénních sběrů bylo identifikováno celkem 17 haplotypů rodu *Gymnogeophagus* pocházejících z 12 lokalit.

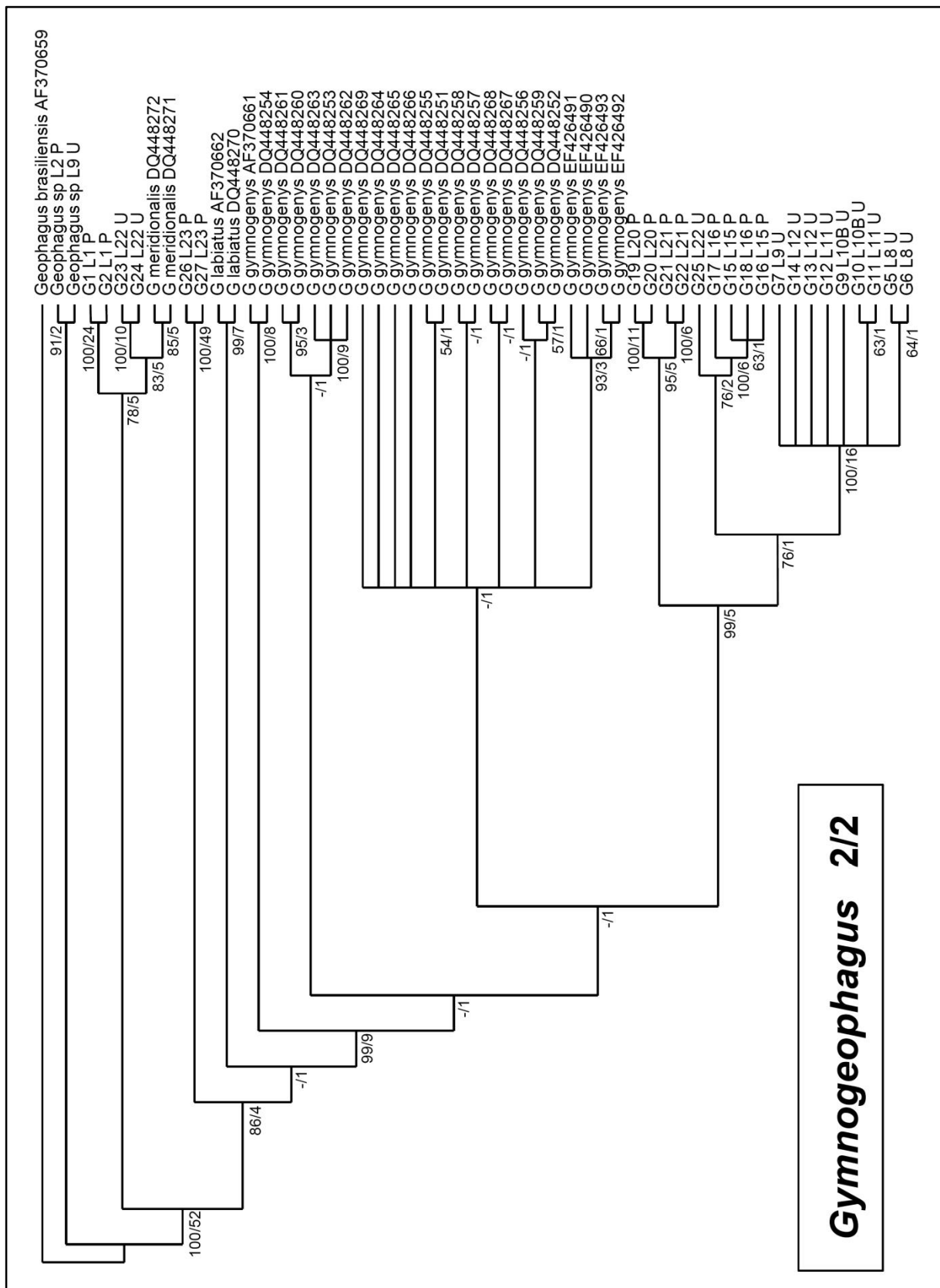
Tab. 3: *Gymnogeophagus* - Seznam a původ sekvencí mitochondriálního genu cyt b zahrnutých do fylogenetické analýzy.

Číslo	Lokalita	Název	Poznámka	Sběr
G1	L1	G. sp.		28.11.2007
G2	L1	G. sp.		28.11.2007
G5	L8	G. sp. "fortaleza"		1.12.2007
G6	L8	G. sp. "fortaleza"		1.12.2007
G7	L9	G. sp. 1	dlouhé tělo	1.12.2007
G9	L10B	G. sp.		2.12.2007
G10	L10B	G. sp.		2.12.2007
G11	L11	G. sp.		3.12.2007
G12	L11	G. sp.		3.12.2007
G13	L12	G. sp.		3.12.2007
G14	L12	G. sp.		3.12.2007
G15	L15	G. sp.	samec	5.12.2007
G16	L15	G. sp.		5.12.2007
G17	L16	G. sp.		5.12.2007
G18	L16	G. sp.	samec	5.12.2007
G19	L20	G. sp.	samec	7.12.2007

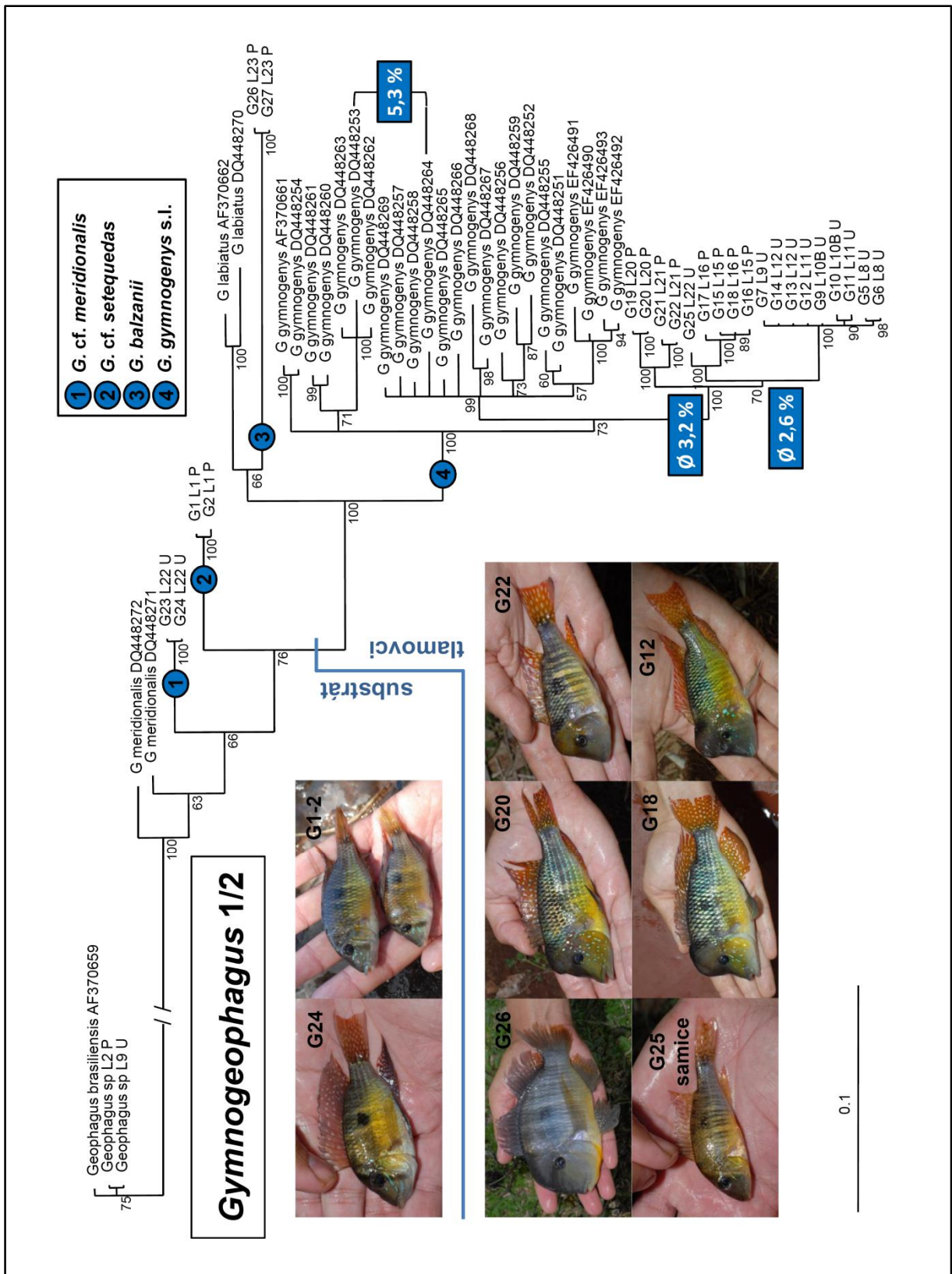
Číslo	Lokalita	Název	Poznámka	Sběr
G20	L20	G. sp.	samice	7.12.2007
G21	L21	G. sp.	samec	7.12.2007
G22	L21	G. sp.	samice	7.12.2007
G23	L22	G. sp. - meridionalis group		8.12.2007
G24	L22	G. sp. - meridionalis group		8.12.2007
G25	L22	G. sp. - gymnogenys group		8.12.2007
G26	L23	G. balzanii		9.12.2007
G27	L23	G. balzanii		9.12.2007
AF370661		G. gymnogenys		GenBank
DQ448251		G. gymnogenys		GenBank
DQ448252		G. gymnogenys		GenBank
DQ448253		G. gymnogenys		GenBank
DQ448254		G. gymnogenys		GenBank
DQ448255		G. gymnogenys		GenBank
DQ448256		G. gymnogenys		GenBank
DQ448257		G. gymnogenys		GenBank
DQ448258		G. gymnogenys		GenBank
DQ448259		G. gymnogenys		GenBank
DQ448260		G. gymnogenys		GenBank
DQ448261		G. gymnogenys		GenBank
DQ448262		G. gymnogenys		GenBank
DQ448263		G. gymnogenys		GenBank
DQ448264		G. gymnogenys		GenBank
DQ448265		G. gymnogenys		GenBank
DQ448266		G. gymnogenys		GenBank
DQ448267		G. gymnogenys		GenBank
DQ448268		G. gymnogenys		GenBank
DQ448269		G. gymnogenys		GenBank
EF426490		G. gymnogenys		GenBank
EF426491		G. gymnogenys		GenBank
EF426492		G. gymnogenys		GenBank
EF426493		G. gymnogenys		GenBank
AF370662		G. labiatus		GenBank
DQ448270		G. labiatus		GenBank
DQ448271		G. meridionalis		GenBank
DQ448272		G. meridionalis		GenBank
Ge4	L2	Geophagus sp.	outgroup	28.11.2007
Ge8	L9	Geophagus sp.	outgroup	1.12.2007
AF370659	-	Geophagus brasiliensis	outgroup	GenBank

Výsledkem MP analýzy bylo 207 stromů (délka 661 kroků, CI s vyloučením neinformativních pozic 0,6203, RI = 0,8510), z nichž byl vytvořen striktní konsenzus (obr. 8).

Každé z použitých kritérií pro volbu substitučního modelu určilo jako výsledný jiný model: GTR+G (hLRT), resp. GTR+I+G (AIC). Proto byly provedeny dvě nezávislé BA analýzy, každá s 3 000 000 generací. Ustáleného stavu bylo dosaženo po necelých 50 000, resp. 45 000 generacích (burn-in = 500, resp. 450). Oba stromy vykazovaly neměnnou topologii při testování vlivu hodnoty burn-in (testovaný interval 500, resp. 450 až 15 000), vysokou míru stability vykazovaly i hodnoty PP pro jednotlivé uzly. Topologie fylogenetických stromů byla totožná i při porovnání obou modelů navzájem, rovněž hodnoty PP nevykazovaly významné rozdíly (většina hodnot byla identická). Vzhledem k optimálním hodnotám konvergenčních kritérií byl jako finální hypotéza zvolen



Obr. 8: Striktní konsenzus 207 MP stromů získaných analýzou sekvencí cytochromu b rodu *Gymnogeophagus*. Čísla před lomítkem udávají hodnoty bootstrapové podpory (nad 50), čísla za lomítkem Bremerův (decay) index příslušných větví.



Obr. 9: Výsledný BA strom získaný analýzou sekvencí cytochromu b rodu *Gymnogeophagus* s použitím substitučního modelu GTR+I+G. Malá černá čísla udávají PP hodnoty jednotlivých větví, bílá čísla v barevných obdélnících vyjadřují nekorigované divergence příslušných sekvencí.

fylogenetický strom vzešlý z BA s použitím modelu GTR+I+G (obr. 9). Hlavním rozdílem mezi BA stromem a striktně konsenzuálním MP stromem je rozdílná agregace větví vně druhového klastru *G. gymnogenys*.

Crenicichla

Do fylogenetických analýz bylo zahrnuto celkem 74 sekvencí rodu *Crenicichla*, z nichž 72 bylo získáno z našich terénních sběrů (tab. 4). Druhová jména použitá v názvech sekvencí jsou pouze pracovní a vyjadřují morfologickou podobnost nebo geografickou příslušnost konkrétního vzorku a nikoli definitivní taxonomické zařazení; proto jsou uváděna s velkými počátečními písmeny. K zakořenění fylogenetického stromu byly použity sekvence *Astronotus ocellatus* a *Satanoperca jurupari* z GenBank. Zalignovaný datový soubor mitochondriálních sekvencí genu pro ND2 a sousedních genů pro tRNA (část Gln, Met, Trp, část Ala) obsahoval celkem 1297 pozic, z nichž bylo 508 variabilních a 393 parsimonně informativních. V rámci samotného rodu *Crenicichla* obsahovalo 72 sekvencí celkem 340 variabilních míst, z nichž 332 bylo parsimonně informativních. Mezi sekvencemi z terénních sběrů bylo identifikováno celkem 38 haplotypů rodu *Crenicichla* pocházejících ze 17 lokalit.

Tab. 4: *Crenicichla* - Seznam a původ sekvencí mitochondriálních genů ND2 + tRNA zahrnutých do fylogenetické analýzy.

Číslo	Lokalita	Název	Poznámka	Sběr
C1	L1	C. BigMouth		27.11.2007
C2	L1	C. BigMouth		27.11.2007
C4	L1	C. BigLips		27.11.2007
C5	L1	C. Yaha	samice	27.11.2007
C6	L1	C. Yaha	samec	27.11.2007
C7	L3	C. Lepidota		28.11.2007
C8	L4	C. BigMouth		29.11.2007
C9	L4	C. BigMouth		29.11.2007
C10	L4	C. Line		29.11.2007
C11	L5	C. BigMouth	samec	30.11.2007
C12	L5	C. BigMouth		30.11.2007
C13	L6	C. FemaleBW		30.11.2007
C14	L6	C. FemaleBW		30.11.2007
C15	L7	C. PirayGuazu		30.11.2007
C16	L7	C. Line		30.11.2007
C17	L7	C. PirayGuazu		30.11.2007
C18	L7	C. Line		30.11.2007
C19	L8	C. Tendybaguassu	samice	1.12.2007
C20	L8	C. Tendybaguassu	samec	1.12.2007
C21	L8	C. Fortaleza	samice	1.12.2007
C22	L8	C. Tendybaguassu	samec	1.12.2007
C23	L8	C. Fortaleza	samec	1.12.2007
C24	L8	C. Gaucho	samice	1.12.2007
C25	L8	C. Gaucho		1.12.2007
C26	L10A	C. Gaucho	samice	2.12.2007
C27	L10A	C. Gaucho		2.12.2007
C28	L10B	C. NotTendybaguassu	samice	2.12.2007
C29	L10B	C. NotTendybaguassu	samec	2.12.2007
C30	L11	C. Changai		3.12.2007
C31	L11	C. Gaucho	samec	3.12.2007
C32	L11	C. Gaucho	samec	3.12.2007

Číslo	Lokalita	Název	Poznámka	Sběr
C34	L12	C. Lepidota	samice	3.12.2007
C35	L12	C. Lepidota		3.12.2007
C36	L12	C. Missioneira		3.12.2007
C37	L12	C. Gaucho	samec	3.12.2007
C38	L12	C. Gaucho	samec	3.12.2007
C39	L12	C. Missioneira	samice	3.12.2007
C40	L14	C. ParanayGuazu	samice	4.12.2007
C41	L14	C. ParanayGuazu	samec	4.12.2007
C44	L15	C. Niederleinii	samice	5.12.2007
C45	L15	C. Niederleinii	samec	5.12.2007
C46	L15	C. Lepidota	samice	5.12.2007
C47	L15	C. Lepidota	samec	5.12.2007
C48	L16	C. Niederleinii	samice ?	5.12.2007
C49	L16	C. Niederleinii	samec	5.12.2007
C50	L16	C. Lepidota	samice	5.12.2007
C51	L18	C. Niederleinii	samec	6.12.2007
C52	L18	C. Niederleinii	samice	6.12.2007
C53	L18	C. Lepidota	samec	6.12.2007
C54	L19	C. Lepidota	samec	6.12.2007
C56	L20	C. Niederleinii	samice	7.12.2007
C57	L20	C. Niederleinii	samec	7.12.2007
C58	21	C. Niederleinii	samec	7.12.2007
C60	L21	C. Lepidota	samec	7.12.2007
C79	L10B	C. Gaucho	samice	2.12.2007
C80	L10B	C. Minuano	samec	2.12.2007
C81	L7	C. PirayGuazu		30.11.2007
C82	L7	C. Line		30.11.2007
C83	L8	C. Fortaleza		1.12.2007
C84	L8	C. Tendybaguassu	samice	1.12.2007
C85	L8	C. Tendybaguassu	samec	1.12.2007
C86	L8	C. Tendybaguassu		1.12.2007
C87	L11	C. Gaucho	samec	3.12.2007
C88	L14	C. ParanayGuazu	samice	4.12.2007
C89	L14	C. ParanayGuazu	samec	4.12.2007
C90	L15	C. Niederleinii	samec	5.12.2007
C91	L16	C. Niederleinii	samec	5.12.2007
C92	L16	C. Lepidota	samec	5.12.2007
C93	L18	C. Lepidota	samice	6.12.2007
C94	L20	C. Niederleinii	samice	7.12.2007
C95	L20	C. Niederleinii	samec	7.12.2007
AB018971		Satanoperca jurupari	outgroup	GenBank
AB018972		Astronotus ocellatus	outgroup	GenBank

Výsledkem MP analýzy byl jediný strom (délka 894 kroků, CI s vyloučením neinformativních pozic 0,6984, RI = 0,7114).

Substituční modely byly určeny pro každý gen zvlášť (tab. 5). Byly provedeny tři samostatné BA analýzy, jedna se souborem modelů určených podle kritéria hLRT, druhá se souborem podle AIC a třetí analýza s modelem GTR+I+G použitým nezávisle (partitioned) pro každý gen, vždy s 2 000 000 generací. Ustáleného stavu bylo dosaženo po necelých 25 000, resp. 40 000 a 58 000 generacích (burn-in = 250, resp. 400 a 580). Všechny tři stromy vykazovaly neměnnou topologii při testování

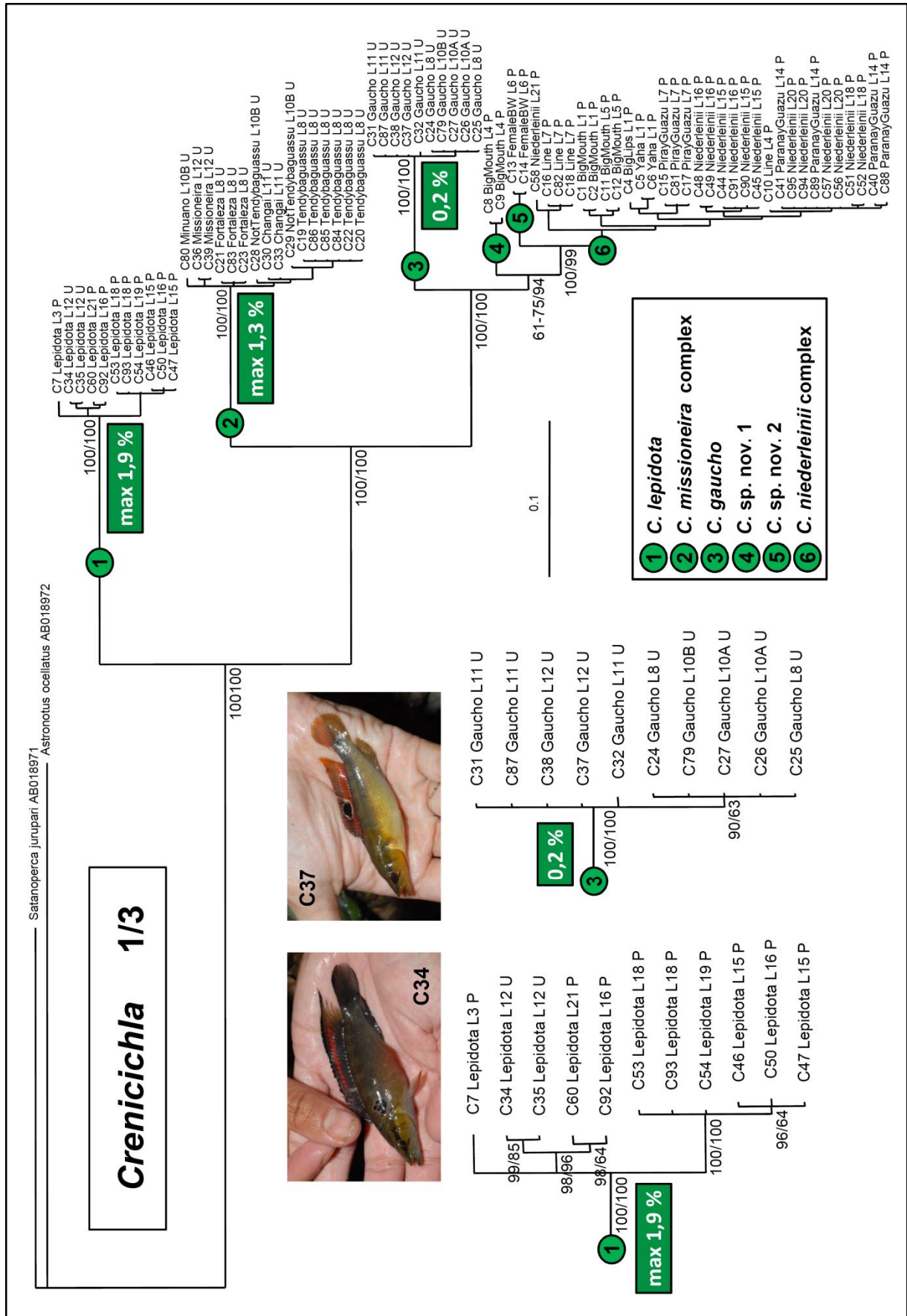
vlivu hodnoty burn-in (testovaný interval 250, resp. 400 a 580 až 10 000), vysokou míru stability vykazovaly i hodnoty PP pro jednotlivé uzly. Topologie fylogenetických stromů byla prakticky totožná i při porovnání všech modelů navzájem, nepatrné rozdíly v rozlišení byly způsobeny kolísáním PP několika větví kolem kritické hodnoty pro konsenzus (50 %). PP některých uzlů získané na základě partitionovaného modelu GTR-I-G se významněji odlišovaly od hodnot vypočítaných s použitím zbývajících dvou modelů. Vzhledem k optimálním hodnotám konvergenčních kritérií byl jako finální hypotéza zvolen fylogenetický strom vzešlý z BA s použitím modelu GTR-I-G (obrázek); v případě rozdílů PP mezi tímto a ostatními modely větších než 3 % je uvedeno rozmezí. Výsledné fylogenetické BA a MP stromy se lišily v topologii druhového klastru *C. missioneira* (obr. 10, 11, 12).

Tab.5: Substituční modely pro jednotlivé sekvenční úseky určené na základě analýzy pomocí MrModelTest a PAUP* podle Akaikova informačního kritéria (AIC) a hLRT (hierarchical likelihood ratio test).

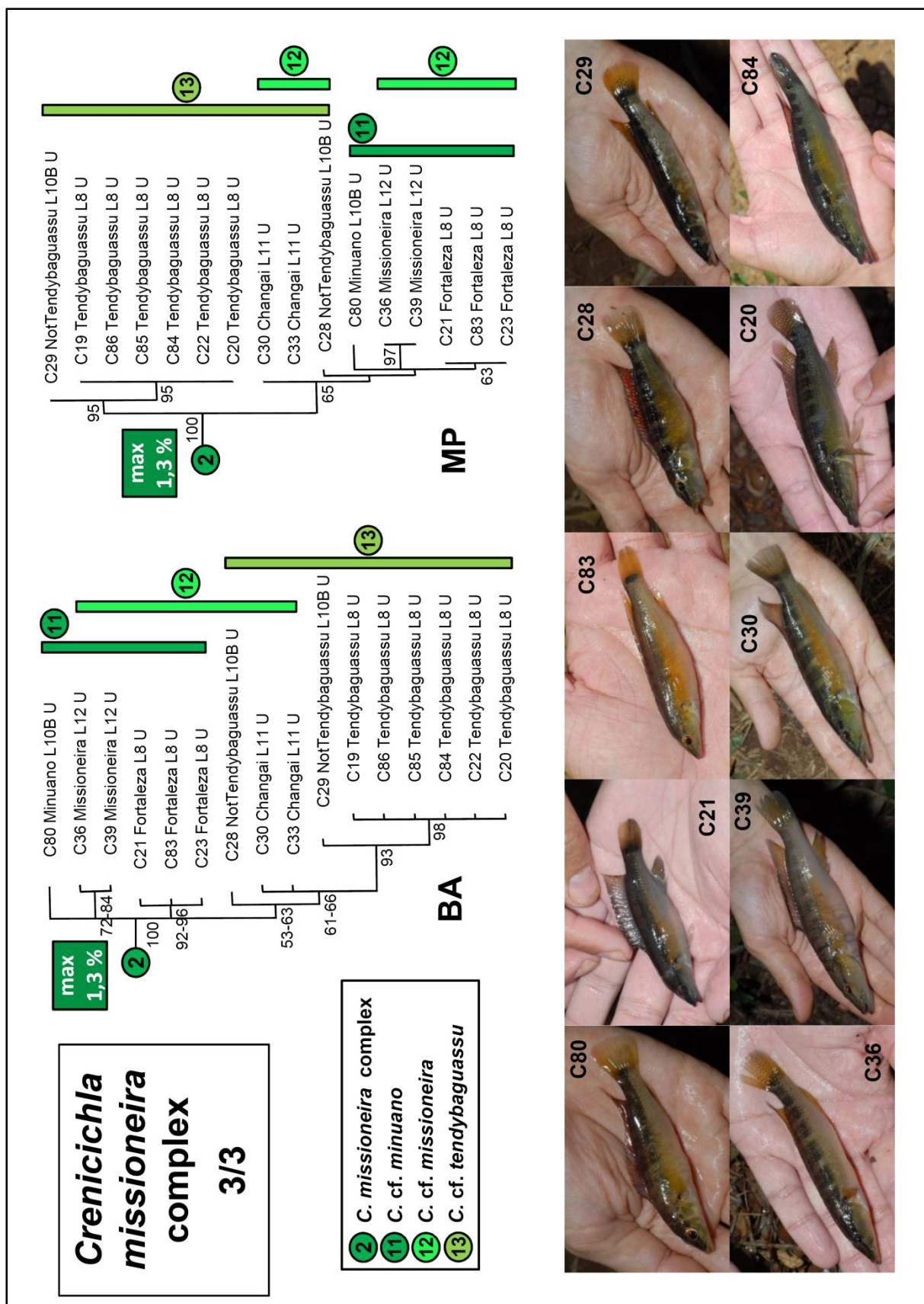
Gen	Pozice v alignmentu	Model podle hLRT	Model podle AIC
Gln	1 - 61	K80	HKY+I
Met	62 - 130	JC	F81
ND2	131 - 1177	GTR+G	GTR+I+G
Trp	1178 - 1250	SYM	SYM+I
Ala	1251 - 1297	K80	K80

Satanoperca jurupari ABC018971

Astronotus ocellatus ABC018972



Obr. 10: Výsledný BA strom získaný analýzou sekvencí ND2 + tRNA rodu *Crenicichla* (celkový přehled) s použitím substitučního modelu GTR+I+G. Čísla před lomítkem udávají PP hodnoty jednotlivých větví; v případě, že se tyto hodnoty liší o více než 3 % od PP hodnot získaných s použitím ostatních modelů (tab. 5), je uvedeno rozmezí. Čísla za lomítkem udávají hodnoty bootstrapové podpory větví MP stromu (nad 50). Bílá čísla v barevných obdélnících vyjadřují nekorigované divergence příslušných sekvencí.



Obr. 12: Výsledné BA a MP stromy získané analýzou sekvencí ND2 + tRNA rodu *Crenicichla* (*C. missioneira* complex) s použitím substitučního modelu GTR+I+G (BA). Černá čísla u BA stromu udávají PP hodnoty jednotlivých větví; v případě, že se tyto hodnoty liší o více než 3 % od PP hodnot získaných s použitím ostatních modelů (tab. 5), je uvedeno rozmezí. Černá čísla u MP stromu udávají hodnoty bootstrapové podpory (nad 50). Bílá čísla v barevných obdélnících vyjadřují nekorigované divergence příslušných sekvencí.

Diskuse

Australoheros

Fylogenetická analýza potvrdila výraznou molekulární diverzifikaci rodu *Australoheros* ve studované oblasti, která je v dobré shodě s druhovou diverzitou popsanou na základě morfologických charakteristik (Casciotta et al. 1995, Říčan & Kullander 2003, Říčan & Kullander 2006, Casciotta et al. 2006a, Říčan & Kullander 2008). Klastry odpovídající jednotlivým druhům tvoří ve všech případech monofyla s vysokými hodnotami PP i bootstrapové podpory (obr. 7). O taxonomické příslušnosti kladu označeného jako *A. cf. forquilha* bude možné rozhodnout teprve na základě porovnání vzorků z našich terénních sběrů s haplotypy pocházejícími přímo z typové lokality *A. forquilha*, kterou je stejnojmenný přítok Rio Grande do Sul v brazilské části povodí Uruguay (Říčan & Kullander 2008).

V souvislosti s Ribeirovou (2006) teorií vývoje atlantského okraje lze uvažovat o evoluci studovaného rodu na dvou rozdílných fylogenetických úrovních. První z nich je úroveň mezirodová. K oddělení rodu *Australoheros* od nejbližších příbuzných rodů neotropických cichlid, za které je považován celý zbytek heroinních cichlid mimo tzv. amazonské taxony (Concheiro Pérez et al. 2007, Říčan et al. 2008, Smith et al. 2008), došlo před 20 - 30 mil. let dle molekulárního časování prostřednictvím mtDNA (Concheiro Pérez et al. 2007). Tato divergence souvisí s posunem rozvodí a postupným oddělováním Paraná od paleo-Amazonas (Lundberg et al. 1998) a je možné na ni rovněž pohlížet prizmatem Ribeirových modelů. Druhou, a z hlediska této práce prioritní fylogenetickou rovinou, je kladogeneze uvnitř samotného rodu *Australoheros*.

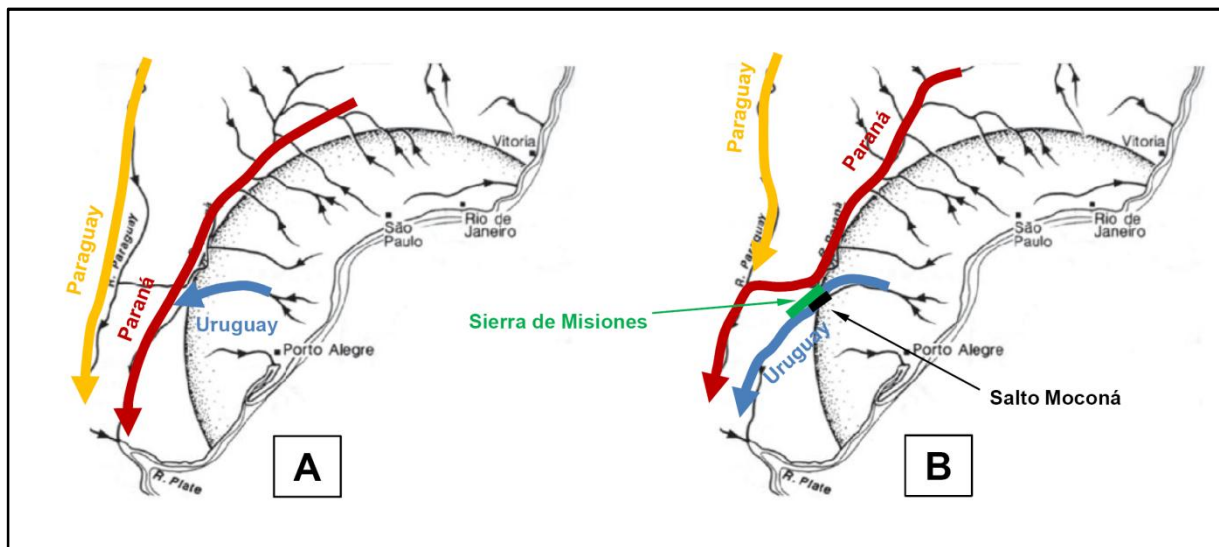
Pro časování důležitých kladogenetických událostí můžeme použít jednoduchý model molekulárních hodin založený na divergenční rychlosti mitochondriálního genu pro cytochrom b. V případě sladkovodních ryb je běžně užíván vztah, podle kterého 1 % divergence mezi dvěma haplotypy (všechny údaje v této práci se týkají divergence nekorigované podle délky větví) odpovídá zhruba 1 milionu let (Bermingham et al. 1997, Zardoya & Doadrio 1999). Tato rychlost byla opakovaně testována a není významně odlišná od geologické kalibrace molekulárních hodin u cichlasomatinních cichlid (např. Concheiro Pérez et al. 2007).

Nejmenší mezidruhovou divergenci vykazují dva paranánské druhy *A. kaaygua* a *A. tembe* (3,8 %), k jejichž oddělení od sebe navzájem došlo podle uvedeného vztahu před necelými 4 mil. let (obr. 7). Tento časový odhad výrazně předchází uvažované době vzniku Cataratas del Iguazú (1 - 1,5 mil. let). Fylogenetické vztahy uvnitř rodu jsou tedy starší než samotný vodopád; historie rodu *Australoheros* proto odráží podobu říčního systému před vznikem tohoto krajinného monumentu.

Oddělení této dvojice od ostatních druhů spadá do časového intervalu mezi 4,3 až 5,2 mil. let. Uvedená divergence zřejmě zosobňuje vikarianci mezi druhy obývajícími řeku Paraná a Uruguay způsobenou vyvrátněním pohoří Sierra de Misiones. Pokud tok řeky Paraná původně sledoval hranice megadómu dle Ribeirovy hypotézy, tak horní Uruguay mohla být jejím přítokem a odvodňovat část megadómu v radiálním směru a dnešní střední Paraná mohla tvořit přítok řeky Paraguay (obr. 13, střední Paraná není barevně zvýrazněna). K přesměrování toku Paraná mohlo potom zjevně dojít v souvislosti s vyvýšením centrálního hřebene Sierra de Misiones. Následné zvýšení vodnosti Paraná v novém korytě by urychlilo zahlubování říčního kaňonu a mohlo tak v konečné fázi iniciovat vznik vodopádů Iguazú. Spojení řek Paraná a Uruguay podle všeho nezaniklo okamžitě, nýbrž se s postupným zdvihem centrálního pohoří, které tvoří jeden z prstovitých výběžků Brazilské vysočiny

na území dnešní Argentiny, posouvalo jihozápadním směrem. Důkazem může být i výškový gradient centrálního hřebene, jehož nejvyšší bod na území Argentiny leží v samotném severovýchodním cípu provincie; Sierra se svažuje směrem k jihozápadu, až se postupně vytrácí v rovině sousední provincie Corrientes. Propojení obou říčních systémů přetrvává v pozměněné sezónní podobě dodnes v nížinné oblasti Esteros del Iberá jižně od provincie Misiones.

Stejněho stáří jako Sierra de Misiones je podle výsledků fylogenetické analýzy i vodopád Moconá (4,2 mil. let), oddělující fauny střední a horní Uruguay reprezentované v této studii druhy *A. minuano* a *A. sp. Jacutinga*. Ke vzniku tohoto podélného zlomu v korytě rio Uruguay a k elevaci centrálního pohoří tak mohlo dojít při téže reaktivaci riftu a podle mechanismu popsáno v Ribeirově studii (obr. 13).



Obr. 13: Schematické znázornění hypotetického přepojení střední Paraná, vzniku vodopádu Moconá a vyvrásnění centrálního pohoří. K uvedeným událostem mohlo dojít podle fylogenetické analýzy rodu *Australoheros* na rozhraní miocénu a pliocénu (před cca 5 - 4 mil. let). Podkladová mapa převzata z Ribeira (2006).

Gymnogeophagus

Výsledky fylogenetické studie rodu *Gymnogeophagus* jsou dokladem bohaté molekulární diverzifikace, jakou naznačily již předchozí analýzy (Wimberger et al. 1998, Pereyra & García 2008). Ve srovnání s předchozím rodem je tato diverzita naprosto odlišně strukturována, výrazně převyšuje popsanou morfologickou variabilitu a většinou postrádá jakékoli biogeografické opodstatnění.

Terénní sběry zahrnovaly především skupinu polygynních, pohlavně dimorfních tlamovců (*G. gymnogenys* a *G. balzani*). Tato skupina tvořila v MP i BA analýze monofylum s jednoznačnou PP podporou (PP = 100, bootstrap = 86). Do analýzy byly zahrnuty rovněž sekvence *G. gymnogenys* ze studie Pereyry a Garcíi (2008) pocházející z povodí řeky Uruguay a atlantských pobřežních řek. Stejně jako v citované práci tvořily tyto haplotypy ve výsledných stromech čtyři dobře rozlišené vnitrodruhové linie. Další monofylum uvnitř *G. gymnogenys* sdružilo všechny naše haplotypy uvedeného druhu z provincie Misiones (z povodí Paraná i Uruguay). Jak shodně uvádí Pereyra a García (2008), mezi jednotlivými klady *G. gymnogenys* jsou obrovské divergence (až 5,3 %) a tyto klady nejsou izolovány vzdáleností. Na jedné lokalitě spolu často žijí v sympatrii monomorfní jedinci, jejichž linie jsou odděleny několik milionů let; příbuzné haplotypy se naproti tomu vyskytují na geograficky velmi vzdálených místech. Divergence uvnitř samotné misionéské linie jsou 3,2 %, resp.

2,6 % (obr. 9). Při konečném hodnocení těchto údajů je třeba vzít v potaz i zrychlenou evoluci geophaginních cichlid (viz dále).

Na tomto místě je třeba zdůraznit, že morfologická identita molekulárně dobře rozlišených starých linií může být jen zdánlivá, způsobená tradičně antropocentrickým způsobem hodnocení, který neodpovídá rozpoznávacím systémům studovaných ryb. Jako malý příklad lze uvést morfologické srovnání provedené J. Casciottou (pers. comm.). Ten na základě výsledků této molekulární analýzy dokázal zpětně vytvořit systém několika meristických i plastických znaků rozlišujících haplotypy z lokalit L12 a L15, které se předtím zdály navzájem nerozpoznatelné.

Popisovaná diverzita morfologicky definovaného pobřežního druhu *G. gymnogenys* zcela jistě překračuje druhový rámeček. Vytvoření odpovídající taxonomické konstrukce v současné chvíli brání chybějící údaje o haplotypech z území Brazílie, které zahrnuli do své molekulární fylogenetické studie Wimberger et al. (1998). Analyzované sekvence ale dodnes nebyly publikovány a jejich uveřejnění je z důvodu pravděpodobné ztráty dat nejisté (R. E. Reis, pers. comm.).

Skupina substrátových, monogamních a sexuálně nedimorfních gymnogeophagů vychází v BA analýze vůči tlamovcům parafyletická, shodně s výsledky Wimbergera et al. (1998); v konsenzuálním MP stromu tvoří monofylum s nízkou bootstrapovou podporou (bootstrap = 78). Tato skupina je dle našich poznatků v Misiones zastoupena podstatně menší měrou než linie tlamovců. Přes plošné a poměrně důkladné prosbírání misionského území se jedince morfologicky blízké *G. meridionalis* podařilo zaznamenat pouze na dvou lokalitách (L1 a L22). V liniích substrátových gymnogeophagů se rovněž vyskytuje fenomén popsáný v předchozích odstavcích: Morfologicky rozlišené druhy vycházejí parafyletický a tvoří několik molekulárně divergovaných dlouho oddělených linií, které nevykazují geografickou korelaci. Ve výsledném stromu zpracovaném Wimbergerem et al. (1998) se mezi terminálními větvemi substrátové skupiny dokonce třikrát opakoval klad tvořený dvojicí druhů *G. rhabdotus* a *G. meridionalis*, které vycházely vždy jako sesterské. Kvůli vysokým genetickým divergencím se Wimberger et al. přiklání k existenci kryptických druhů. Opakování stejného fylogenetického vzorce u *G. rhabdotus* a *G. meridionalis*, jehož obdoba se vyskytla rovněž u tlamovců (Pereyra & García 2008), dává také prostor k úvahám o ancestrální hybridizaci, která byla ještě před fixací alel následovaná několikanásobnou geografickou izolací.

Analýzy Wimbergera et al. (1998) a hlavně Pereyry & Garcíi (2008) naznačují, že se jedná spíše o kryptickou morfologickou diverzitu než recentní introgrese. Pereyra & García 2008 jasně demonstrovaly, že geneticky silně divergované syntopické line (až 5,3 % divergence) nevykazují "isolation by distance" (není ani korelace mezi liniemi a geografii), ale vykazují omezený tok genů mezi jedinci ze stejných lokalit. Oba tyto argumenty svědčí o účinných prezygotických izolačních mechanismech a tím o existenci biologických druhů, které jsou ale tradičně používanými morfologickými znaky kryptické. Pro vyslovení konečné hypotézy zatím scházejí potřebná data; mimo Wimbergerovy sekvence bude třeba získat i haplotypy dalších druhů z povodí Paraná a Paraguay.

Historicko-biogeografické úvahy o diverzifikaci tohoto nížinného rodu je nutno začít v oblasti brazilských pobřežních řek a v povodí Uruguay, kde má rod *Gymnogeophagus* největší diverzitu (*G. meridionalis*, *G. rhabdotus*, *G. lacustris*, *G. labiatus*); tyto postupně odštěpované bazální linie jsou parafyletické vůči kladu *G. gymnogenys* s.l. (částečně obr. 9, Wimberger et al. 1998, Pereyra & García 2008). Vezmeme-li v úvahu předpoklad o zrychlené evoluci geophaginních cichlid (Farias et al. 1999, Farias et al. 2001, Smith et al. 2008), vychází při zhruba dvojnásobné divergenční rychlosti (2 %/mil.

let) časový odhad odštěpování většiny větví vně druhového komplexu *G. gymnogenys* do období cca 4 - 5,5 mil. let (divergence 8 - 11 %). Tedy do období, ve kterém mohlo na základě analýzy rodu *Australoheros* dojít k zásadní přestavbě povodí Uruguay a Paraná. Ve zhruba témže časovém rozmezí předpokládají Pereyra & García (2008) separaci *G. meridionalis* vs. *G. labiatus* a *G. labiatus* vs. *G. gymnogenys*. Do stejného období spadá i nejstarší známý fosilní záznam pro rod *Gymnogeophagus* (Casciotta & Arratia 1993). V budoucí fázi studie bude ale třeba testovat, zda na tuto časovou podobnost nemá v případě molekulárních dat významný vliv saturace genu cyt b, které je podle Farias et al. (2001) dosaženo na úrovni 15 % divergence.

Hypotetizovaný postup fylogeneze tedy směřuje z pobřežních řek do povodí dolní Uruguay a dále do střední Paraná (dvě terminální větve misionké vnitřní skupiny *G. gymnogenys*). Na základě našeho nekompletního souboru dat ovšem nelze stanovit konečnou hypotézu ani vyvozovat závěry o tom, jak významný byl podíl disperze či vikariance na uvedeném vývoji.

Crenicichla

Vzhledem ke skutečnosti, že dosud nebyla publikována molekulární fylogenetická studie rodu *Crenicichla* ani žádné jeho druhové skupiny, přináší tato práce vesměs nové a leckdy překvapivé skutečnosti. Fylogenetická analýza především odhalila zásadní nesoulad mezi molekulární diverzitou jižní skupiny a morfologickou definicí příslušných druhů; rozdílly byly zaznamenány u kladů zhruba odpovídajících druhovým komplexům *C. missioneira* a *C. niederleinii* (obr. 10). Vztah mezi diverzifikací tohoto rodu a jejím fenotypovým vyjádřením je (především v případě komplexu *C. missioneira*) opačný, než jaký byl zaznamenán u rodu *Gymnogophagus*; jeho projevem je morfologická odlišnost geneticky blízké příbuzných haplotypů.

Z taxonomického hlediska neodhalila analýza žádný rozpor v definici druhů *C. lepidota* a *C. gaucho* (obr. 10). Výsledky dále naznačují existenci dvou nepopsaných druhů, *C. sp. nov. 1* (C8,C9) a *C. sp. nov. 2* (C13,C14), které se dají dobře definovat jak molekulárně, tak na základě morfologie (obr. 11). V druhovém "komplexu" *C. niederleinii* tvoří z popsáných druhů monofylum pouze *C. yaha* a větev označená jako *C. sp. 2*; ta odpovídá druhu *C. tesay*, na jehož popisu v současnosti pracují argentínští ichtyologové (obr. 11). Haplotypy označené jako *C. sp. 1* (C16,C18,C82,C58 + C10) spojuje přítomnost výrazného podélného pruhu, tato skupina ale není monofyletická. Zbývající haplotypy pracovní sdužené do parafyletické skupiny *C. sp. 3* jsou morfologicky podobné. Mají vesměs příčné dvojpruhy charakteristické pro *C. niederleinii* (liší se však jejich počtem) a pro samice je typický oranžový pruh, který je z větší části umístěn v přední polovině těla. Největší nesoulad mezi fylogenetickou hypotézou vytvořenou na základě mitochondriálního genu ND2 a morfologickou diverzifikací odhalila analýza ve skupině *C. missioneira*. V tomto druhovém "komplexu" je míra příbuznosti mezi haplotypy největší (max. divergence 1,3 %) a morfologické rozdílly nejvýraznější (obr. 12).

Zajímavým námětem pro speciální studii je bezpochyby posledně jmenovaný komplex. Je pro něj typická přítomnost dvou nebo dokonce tří (lokalita L10B) blízké příbuzných "druhů" na stejné lokalitě, které se liší mj. přijímanou potravou a s ní spojenou morfologií ústního aparátu (*C. missioneira* - středně velká ústa, *C. minuano* - drobné tlamky, *C. tendybaguassu* - obrovské tlamy; obr. 12). Morfologická divergence se zdá být závislá na přítomnosti ostatních linií a s ní souvisejícím rozdělením potravní niky; pro exaktní důkaz je ale potřeba uskutečnit nové a cílené terénní sběry. Předběžné porovnání výsledků fylogenetické analýzy genu ND2 s nepublikovanými výsledky získanými na základě části sekvencí cytochromu b nedokázalo vyloučit ancestrální polymorfismus.

Budoucí analýza musí proto mimo sekvenování některých jaderných genů zahrnovat další genetické metody (např. AFLP, mikrosatelity) a stejně tak metody pro rekonstrukci fylogeneze na poddruhové úrovni (např. haplotypové sítě). Kromě syntopické divergence morfologických znaků je třeba se potenciálně zaměřit i na studium případné sympatrické speciace v říčních systémech.

Studované linie rodu *Crenicichla* můžeme rozčlenit do tří biogeografických skupin. Nížinnou faunu zastupuje *C. lepidota*, jejíž disperzní potenciál se zjevně odrazil v obrovském areálu rozšíření. Výskyt tohoto druhu nad Cataratas del Iguazú se dá vysvětlit disperzí starší než je doba vzniku vodopádu (divergence C46,C47,50 vs. C7 = 1,9 %), případně též mechanismem souvisejícím s přepojením toku Paranáy popsáným v souvislosti s rodem *Australoheros*. Horskou faunu tvoří zástupci z povodí Uruguay: *C. gaucho* a tři druhy komplexu *C. missioneira* (*C. missioneira*, *C. minuano* a *C. tendybaguassu*). Výskyt těchto druhů na argentinském území definitivně potvrdily teprve naše terénní sběry. Do fauny přechodné můžeme zařadit druhy ze střední (a horní) Paranáy, které zahrnují komplex *C. niederleinii* a dva dosud nepopsané druhy *C. sp. nov. 1* a *C. sp. nov. 2*. Pro zformulování biogeografické hypotézy nejsou prozatím k dispozici haplotypy příslušející druhům popsáným mimo území Misiones, na jejichž získání se v současnosti pracuje. Exempláře z typových lokalit těchto neargentinských taxonů poslouží zároveň jako srovnávací materiál pro vzájemnou homologizaci a dokončení fylogenetické analýzy.

Souhrn

- 1) Provincie Misiones posloužila jako vhodná oblast pro zahájení studií zabývajících se evolucí čeledi Cichlidae v povodí La Plata a přilehlých pobřežních řekách. Misiones hostí přechodnou faunu obou velkých říčních systémů (Paraná a Uruguay) oddělených centrálním pohořím; nabízí tak jedinečnou možnost studovat na malém území ichtyofaunu čtyř geografických oblastí. Definice těchto oblastí se ukázala být smysluplnou. Přestože je dnes vodopád Iguazú absolutní protiproudou bariérou, na historii studovaných rodů neměl výraznější vliv; jejich diverzifikace je podstatně staršího data než odhadovaná doba vzniku vodopádu (1 - 1,5 mil. let). Naproti tomu se na formování ichtyofauny zjevně podílely nižší, ale výrazně starší vodní stupně (Moconá).
- 2) Zvolené rody *Australoheros*, *Gymnogeophagus* a *Crenicichla* se ukázaly být vhodným modelem pro studium evolučních mechanismů i historických biogeografických událostí, neboť se ve sledovaných charakteristikách vhodně doplňují:
 - Každý z rodů má svou svébytnou biogeografickou historii, které se vzájemně prolínají. Rod *Australoheros* má největší diverzitu v horní a střední Uruguay. Tato řeka byla spíše než Paraná jeho diverzifikačním centrem. Je tedy horskou (a přechodnou) skupinou z povodí Uruguay. *Gymnogeophagus* je naproti tomu pobřežní skupina, která se do oblasti dostává sekundárně, a to v několika liniích. Rod je nížinnou a přechodnou skupinou z pobřeží. *Crenicichla* obsahuje linie s různými místy diverzifikace, a je tak pojítkem celého projektu; zahrnuje horské, nížinné i přechodné prvky.
 - *Gymnogeophagus* a *Crenicichla* zahrnují druhové komplexy. U prvně jmenovaného se jedná o kryptické druhy, které mají výrazné molekulární divergence, ale jsou z lidského pohledu morfologicky špatně rozlišitelné. U druhého rodu se vyskytuje situace opačná; morfologicky dobře odlišitelné druhy nejsou molekulárně divergované a speciace je mnohem mladšího data a lokálnějšího charakteru.
- 3) Cílem do budoucna zůstává propojit znalosti získané z území Misiones s údaji z oblasti jižní Brazílie a Paraguaye, a dokončit tak fylogenetickou a biogeografickou analýzu uvedených rodů; rovněž se pokusit o lokální mikroevoluční a populační studie rodu *Crenicichla* a *Gymnogeophagus* v rámci Misiones vedoucí k poodhalení speciálních mechanismů. Na těchto projektech bych se rád podílel v rámci svého případného doktorského studia.

Literatura

- Altekar G., Dwarkadas S., Huelsenbeck J.P. & Ronquist F. (2004) Parallel Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20: 407–415
- Benzaquem D.C., Feldberg E., Porto J.I.R., Gross M.C. & Zuanon J.A.S. (2008) Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae). *Genetics and Molecular Biology* 31(1 [suppl.]): 250-255
- Bermingham E., McCaVerty S.S. & Martin A.P. (1997) Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. In: Kocher T. & Stepien C.A. (eds.), *Molecular Systematics of Fishes*, pp. 113–128. Academic Press, San Diego, CA
- Bizerril C.R.S.F. (1994) Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. *Acta Biologica Leopoldensia* 16(1): 51-80
- Bremer K. (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295–304
- Bremer K. (1988) The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795–803
- Cabrera A.L. (1976) Regiones fitogeográficas argentinas. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería* II(1), ACME
- Cajz V. (2004) Současný stav poznatků o oherském riftu. *Essentia* 36/2003, <http://www.essentia.cz>
- Casciotta J.R., Almirón A.E. & Gómez S.E. (2006a) A new species of *Australoheros* (Teleostei: Perciformes: Cichlidae) from the río Iguazú basin, Argentina. *Zoologische Abhandlungen (Dresden)* 55: 77-83
- Casciotta J.R., Almirón A.E. & Gómez S.E. (2006b) *Crenicichla yaha* sp. n. (Perciformes: Labroidei: Cichlidae), a new species from the río Iguazú and arroyo Uruguay basins, northeastern Argentina. *Zoologische Abhandlungen (Dresden)* 56: 107-112
- Casciotta J. & Arratia G. (1993) Tertiary cichlid fishes from Argentina and reassessment of the phylogeny of New World cichlids. *Kaupia* 2:195–240
- Casciotta, J. R., Gómez S.E. & Toresanni N.I. (1995) '*Cichlasoma*' *tembe*, a new cichlid species from the río Paraná, Argentina (Osteichthyes: Labroidei). *Ichthyological Explorations of Freshwaters* 6(3): 193-200
- Concheiro Pérez G.A.C., Říčan O., Ortí G., Bermingham E., Doadrio I. & Zardoya R. (2007) Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome *b* gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 91-110
- Farias I.P., Ortí G., Sampaio I., Schneider H. & Meyer A. (2001) The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Journal of Molecular Evolution* 53: 89-103

- Farias I.P., Orti G., Sampaio I., Schneider H. & Meyer A. (1999) Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage. *Journal of Molecular Evolution* 48:703–711
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791
- Froese R. & Pauly D. (eds., 2008) FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (10/2008)
- Galindo-Leal C. & Câmara I. de G. (eds., 2003) The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook. Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International, Island Press, Washington - Covelo - London
- Hall, T. (2004) BioEdit Sequence Alignment Editor. Copyright ©1997-2004 Tom Hall, Isis Pharmaceuticals, Inc. Version 6.0.5., <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Hall, T. (2005) BioLign Alignment and Multiple Contig Editor. Copyright ©2000-2005, Tom Hall. Version 4.0.6.2., <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Hanzelka J. & Zikmund M. (1956) Tam za řekou je Argentina. 3. vydání 1964, Nakladatelství politické literatury, Praha
- Heckel J.J. (1840) Johann Natterer's neue Flussfische Brasilien's nach den Beobachtungen und Mittheilungen des Entdeckers beschrieben (Erste Abtheilung, Die Labroiden). *Annalen des Wiener Museums der Naturgeschichte* 2: 325-471
- Hubert N. & Renno J.-F. (2006) Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography* 33: 1414-1436
- Huelsenbeck J. P. & Ronquist F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetics trees. *Bioinformatics* 17: 754–755
- Chebez J.C. (1996) Fauna Misionera, Catálogo Sistemático y Zoogeográfico de los Vertebrados de la Provincia de Misiones (Argentina). L.O.L.A., Buenos Aires
- Irwin D.M., Kocher T.D. & Wilson A.C. (1991) Evolution of the cytochrome b gene in mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32: 128-144
- Kullander S.O. (1983) A Revision of the South American Cichlid Genus *Cichlasoma*. Stockholm, Swedish Museum of Natural History
- Kullander S.O. (1981) Cichlid fishes from the La Plata basin. Part I. Collections from Paraguay in the Muséum d'Histoire Naturelle de Genève. *Revue suisse de zoologie* 88(3): 675-692
- Kullander S.O. & de Lucena C.A.S. (2006) A review of the species of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) from the Atlantic coastal rivers of southeastern Brazil from Bahia to Rio Grande do Sul States, with descriptions of three new species. *Neotropical Ichthyology* 4(2): 127-146
- Loiselle P.V. (1985) The Cichlid Aquarium. Tetra Press, Melle, Germany

- López H.L., Morgan C.C. & Montenegro M.J. (2002) Ichthyological ecoregions of Argentina. Probiota: Serie Documentos N° 1, La Plata, Buenos Aires, Argentina
- de Lucena C.A.S. (2007) Two new species of the genus *Crenicichla* Heckel, 1840 from the upper rio Uruguay drainage (Perciformes: Cichlidae). *Neotropical Ichthyology* 5(4): 449-456
- de Lucena C.A.S. & Kullander S.O. (1992) The *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) species of the Uruguai River drainage in Brazil. *Ichthyological Explorations of Freshwaters* 3(2): 97-160
- Lundberg J.G. (1998) The temporal context of the diversification of Neotropical fishes. In: Malabarba L.R., Reis R.E., Vari R.P., Lucena Z.M.S. & Lucena C.A.S. (eds), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, pp. 49-68. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil
- Lundberg J.G., Marshall L.G., Guerrero J., Horton B., Malabarba M.C.S.L. & Wesselingh F. (1998) The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: Malabarba L.R., Reis R.E., Vari R.P., Lucena Z.M.S. & Lucena C.A.S. (eds), *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, pp. 13-48. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil
- McLennan D.A. (1994) A phylogenetic approach to the evolution of fish behaviour. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 430-460
- Miranda Ribeiro A. (1918) Dos gêneros e três espécies novas de peixes Brasileiros determinados nas coleções do Museu Paulista. *Revista do Museu Paulista, Sao Paulo* 10:787-791
- Mittermeier R.A., Gil P.R., Hoffmann M., Pilgrim J., Brooks T., Mittermeier C.G., Lamoreux J. & da Fonseca G.A.B. (2004) Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. CEMEX, S.A. de C.V
- Myers N. (1988) Threatened Biotas: 'Hotspots' in Tropical Forests. *The Environmentalist* 8: 1-20
- Nylander J. A. A. (2004) Mrmodeltest v2. [Computer Software]. Evolutionary Biology Centre: Uppsala University
- Otoni F.P., Oyakawa O.T. & Costa W.J.E.M. (2008) A new species of the genus *Australoheros* from the rio Ribeira do Iguape basin, São Paulo, Brazil (Labroidei: Cichlidae: Cichlasomatinae). *Vertebrate Zoology* 58(1): 75-81
- Palumbi S., Martin A., Romano S., McMillan W.O., Stice L. & Grabowski G. (1991) The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu
- Pereyra S. & García G. (2008) Patterns of genetic differentiation in the *Gymnogeophagus gymnogenys* species complex, a neotropical cichlid from South American basins. *Environmental Biology of Fishes* 83: 245-257
- Piálek L. (2006) Rešerše ke studiu biogeografie cichlid Guyanské vysočiny. Bakalářská práce, Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice
- Ploeg A. (1991) Revision of the South American cichlid genus *Crenicichla* Heckel, 1840, with description of fifteen new species and consideration on species groups, phylogeny and biogeography (Pisces, Perciformes, Cichlidae). Univ. Amsterdam, Netherlands

- Posada D. & Crandall K. A. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818
- Potter P.E. (1997) The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: A natural history. *Journal of South American Earth Sciences* 10(5-6): 331-344
- Reis R.E., Kullander S.O. & Ferraris C.J. (2004) Checklist of freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre
- Reis R. E. & Malabarba L.R. (1988) Revision of the neotropical cichlid genus *Gymnogeophagus* Ribeiro, 1918, with descriptions of two new species (Pisces, Perciformes). *Revista Brasileira de Zoologia* 4: 259-305
- Ribeiro A.C. (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology* 4: 225-246
- Ringuet R.A. (1975) Zoogeografía y ecología de los peces de aguas continentales de la Argentina y consideraciones sobre las áreas ictiológicas de América del Sur. *Ecosur* 2(3): 1-122
- Rodríguez M.S. & Miquelarena A.M. (2005) A new species of *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae) from the Paraná and Uruguay River basins, Misiones, Argentina. *Zootaxa* 945: 1-15
- Ronquist F. & Huelsenbeck J. P. (2003) Mrbayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574
- Řičan O., Zardoya R. & Doadrio I. (2008) Phylogenetic relationships of Middle American cichlids (Cichlidae, Heroini) based on combined evidence from nuclear genes, mtDNA, and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 941–957
- Řičan O. & Kullander S.O. (2008) The *Australoheros* (Teleostei: Cichlidae) species of the Uruguay and Paraná River drainages. *Zootaxa* 1724: 1-51
- Řičan O. & Kullander S.O. (2006) Character- and tree-based delimitation of species in the 'Cichlasoma' facetum group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research* 44(2): 136-152
- Řičan O. & Kullander S.O. (2003) '*Cichlasoma*' *scitulum*: A New Species of Cichlid Fish from the Río de La Plata Region in Argentina, Brazil and Uruguay. *Copeia* 4, 794–802
- Schaefer S.A. (1998) Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluriformes: Loricariidae). In: Malabarba L.R., Reis R.E., Vari R.P., Lucena Z.M.S., Lucena C.A.S. (eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, pp. 375-400. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil
- Smith W.L., Chakrabarty P. & Sparks J.S. (2008) Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* 24: 625-641
- Stawikowski, R. & Werner, U. (2004) Die Buntbarsche Amerikas. Band 3: Erdresser, Hecht- und Kammbuntbarsche. Eugen Ulmer, Stuttgart

Stiassny M.L.J. & Gerstner C.L. (1992) The parental care behavior of *Paratilapia polleni* (Perciformes, Labroidae), a phylogenetically primitive cichlid from Madagascar, with a discussion of maternal care in the family Cichlidae. *Environmental Biology of Fishes* 34: 219-233

Svoboda J. F. & autorský kolektiv (1960) *Naučný geologický slovník*. Nakladatelství ČSAV, Praha

Swofford D. L. (1998) *Paup**. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Willis S.C., Nunes M.S., Montaña C.G., Farias I.P. & Lovejoy N.R. (2007) Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 291-307

Wimberger P.H., Reis R.E. & Thornton K.R. (1998) Mitochondrial Phylogenetics, Biogeography, and Evolution of Parental Care and Mating Systems in *Gymnogeophagus* (Perciformes: Cichlidae). In: Malabarba L.R., Reis R.E., Vari R.P., Lucena Z.M.S. & Lucena, C.A.S. (eds.), *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, pp. 69-84. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil

Zardoya R. & Doadrio I. (1999) Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European Cyprinids. *Journal of Molecular Evolution* 49: 227–237