



# Hybridation et goulots d'étranglements induits par l'activité humaine: génétique des populations, morphométrie et parasitologie appliquées au tilapia envahi et envahissant *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae)

Cyril Firmat

## ► To cite this version:

Cyril Firmat. Hybridation et goulots d'étranglements induits par l'activité humaine: génétique des populations, morphométrie et parasitologie appliquées au tilapia envahi et envahissant *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae). Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS059 . tel-00879836

HAL Id: tel-00879836

<https://theses.hal.science/tel-00879836>

Submitted on 5 Nov 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Laboratoire Biogéosciences, UMR CNRS 5561

THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Discipline : Biologie évolutive

par Cyril FIRMAT

le 4 novembre 2011

Hybridation et goulots d'étranglements induits par l'activité humaine : génétique des populations, morphométrie et parasitologie appliquées au tilapia envahi et envahissant *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae)

Directeur de thèse  
Paul ALIBERT

Co-encadrant de thèse  
Ulrich K. SCHLIEWEN

Jury

Jean-François AGNESE	IRD – Université Montpellier 2	Rapporteur
Emili GARCIA-BERTHOU	Université de Gérone	Rapporteur
Vincent DEBAT	MNHN – Paris	Examinateur
Thierry RIGAUD	CNRS – Université de Bourgogne	Membre invité
Bruno FAIVRE	Université de Bourgogne	Examinateur
Paul ALIBERT	Université de Bourgogne	Directeur de thèse
Ulrich K. SCHLIEWEN	ZSM – Munich	Co-encadrant de thèse



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Laboratoire Biogéosciences, UMR CNRS 5561

THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Discipline : Biologie évolutive

par Cyril FIRMAT

le 4 novembre 2011

Hybridation et goulots d'étranglements induits par l'activité humaine : génétique des populations, morphométrie et parasitologie appliquées au tilapia envahi et envahissant *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae)

Directeur de thèse  
Paul ALIBERT

Co-encadrant de thèse  
Ulrich K. SCHLIEWEN

Jury

Jean-François AGNESE	IRD – Université Montpellier 2	Rapporteur
Emili GARCIA-BERTHOU	Université de Gérone	Rapporteur
Vincent DEBAT	MNHN – Paris	Examinateur
Thierry RIGAUD	CNRS – Université de Bourgogne	Membre invité
Bruno FAIVRE	Université de Bourgogne	Examinateur
Paul ALIBERT	Université de Bourgogne	Directeur de thèse
Ulrich K. SCHLIEWEN	ZSM – Munich	Co-encadrant de thèse



## **Remerciements**

*Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe FED/BioME du Laboratoire Biogéosciences. Elle n'aurait pas pu être menée à bout sans la contribution d'un grand nombre de personnes. J'espère ne pas en oublier trop ci-dessous.*

*Tout d'abord celles qui ont bien voulu participer à ce projet et dont les contributions ont considérablement déterminé sa forme actuelle :*

*Je ne sais pas ce que cette thèse aurait pu devenir sans la contribution humaine et matérielle de Michèle Losseau. Merci pour ta confiance, ta patience pendant les hésitations du début, pour ces deux semaines de collecte, ton indispensable contribution (venue directement du terrain) tout au long de ma thèse, ton enthousiasme et ta passion pour les eaux douces africaines, sans oublier le super colis de la dernière ligne droite... J'espère que les pages qui suivent répondent bien à ta curiosité du départ sur les tilapias 'bizarres' de la Changane : tout n'est pas perdu ! Merci évidemment à Albert et toute la famille Losseau pour leur hospitalité à Maputo et l'aide matérielle indispensable à la réalisation de la mission.*

*Je remercie également Jos Snoek qui nous a mis en contact.*

*Un grand merci à Pierre Sasal sans qui les sections parasitologiques manqueraient à ce travail. Merci pour les bons conseils et les visites à Dijon motivantes.*

*Merci également à Antoine Pariselle pour sa disponibilité, ses renseignements taxonomiques et bibliographiques précieux et sa participation indispensable au projet.*

*Un merci et un coup de chapeau à Guillaume Mutin pour son opiniâtreté dans la dissection des branchies et dans la traque des monogènes, également indispensable à ce travail. Bonne chance !*

*Les personnes ou institutions qui ont bien voulu consacrer du temps à apporter une aide pour la collecte d'échantillons : En Guadeloupe : Stéphane Di Mauro et Hervé Magnin. En Nouvelle Calédonie : Christine Poellabauer, Clémentine Flourhe, David Lecchini, et les DENV des Provinces Nord et Sud. En Jamaïque : Sébastien Motreuil, Bruno David, Thierry Rigaud, Karl A. Aiken. Au Mozambique : Francesco Pariella et les autorités du Parc National de la Banhine. Egalement un grand merci à Jean-François Baroiller et Marc Canonne (CIRAD, Montpellier) qui ont accepté de me fournir des échantillons d'Oreochromis d'élevage.*

*Je tiens à remercier Messieurs Jean-François Agnès et Emili García-Berthou pour avoir accepté la tâche de rapporteurs, ainsi que les autres membres du jury : Messieurs Vincent Debat, Thierry Rigaud, Bruno Faivre, Paul Alibert et Ulrich K. Schliewen.*

*Paul Alibert et Ulrich K. Schliewen ont proposé de travailler sur le tilapia du Mozambique, ont été directeur et co-encadrant de thèse et ont relu des parties de ce manuscrit.*

*Messieurs Julien Claude, Jean-François Agnès et François Bretagnolle pour avoir été membres de mon comité de thèse au cours de ces trois ans.*

*Un merci à Michel Guiraud pour avoir partagé ses connaissances sur l'évolution des bassins du sud de l'Afrique.*

*Je tiens à remercier les personnes qui ont fourni une assistance ou un conseil technique toujours indispensable.*

*A Dijon : Christine Dubreuil, Maria Gaillard, Nathalie Guichard et Jean-Emmanuel Rollin. Jérôme Thomas notamment pour la place faite parmi les cailloux afin de ranger des poissons. Sans oublier Rémi Laffont pour son script trieur de photos R-X mais aussi et surtout pour des discussions passionnantes. Annie Marchand et Cindy Pers pour le soutien administratif.*

*A Munich : un ‘vielen Danke’( ?) à Dirk Neumann, Matthias Geiger, Andreas Dunz et à Nicolas Straube et sa bonne humeur contagieuse.*

*A Montpellier, je remercie Erick Desmarais, Frédérique Cerqueira, Jean-François Agnèse pour m’avoir permis de réaliser mes extractions dans de bonnes conditions au sein de leurs locaux.*

*Au centre de cancérologie Leclerc (Dijon), je remercie Thierry Caverot, Bernard Perrette et François Brunotte, d’avoir ouvert leur table de radiographie à des poissons formolés.*

*Un grand merci à l’équipe de la mission culture scientifique en particulier Lionel Maillet, Candice Chaillou, Elise Cellier-Holzem, Jean-François Desmarchelier pour vos efforts d’organisation et d’imagination, c’était un grand plaisir.*

*Je remercie également Bernard Frochot (et l’intermédiaire Bruno Faivre) grâce à qui j’ai pu obtenir une bourse Rotary.*

*Reste, il me semble, les personnes dont j’ai eu le plaisir de partager la compagnie pendant ces trois ans en terre inconnue. Le ‘club du midi’ : Clotilde, Rémi, Gaëlle, Paul-Arthur, Clémence et les familiers Marion et Ronan et puis bien sûr Elise la pétillante. Les nordistes Romain, Christine, Caro, Mark, Lucille, sans oublier Vincent pour les belles discussions au bord de l’eau. Les sudistes Nathalie, Aurélie, Paco, Christophe, Julien, Sylvain, Benjamin. Les centraux Thomas et Emmanuel pour la proximité discrète mais bienveillante... tous trop peu fréquentés, et j’en oublie.*

*Je n’oublie pas Gunther (et non tu n’es pas ‘non-remercié’ !) pour des discussions foisonnantes et le soutien ‘café brésilien/guarana’ de la fin.*

*Je remercie également Bernard Laurin qui m’a permis d’occuper (ou envahir) son bureau. Sans oublier Evelyne Debierre pour sa sympathie matinale.*

*Un grand merci à mes parents pour leur soutien sans faille, à ma sœur, et à ma famille de Roquetaillade et d’ailleurs. Aux amis toulousains, montagnards ou autres, toujours Présents !! Malgré la distance.*

*Et bien sûr, à Benoîte, pour ... la liste est longue.*

## Résumé

Les invasions biologiques sont reconnues comme un facteur évolutif important sur une échelle de temps courte. Elles affectent notamment la structure génétique des populations, les patrons d'évolution phénotypique et la richesse des faunes de parasites associées aux populations envahissantes. Cette étude se propose de quantifier les conséquences d'une invasion biologique suivant ces trois niveaux (génétique, phénotypique et parasitologique) en prenant pour exemple le cas du tilapia du Mozambique *Oreochromis mossambicus*. Ce cichlidé africain présente un statut remarquable en biologie de la conservation puisqu'il est à la fois (*i*) l'une des espèces les plus envahissantes au monde car dispersée à l'échelle globale au cours du XXème siècle et (*ii*) une espèce « quasi-menacée » (UICN) sur son aire native (partie du sud-est de l'Afrique) du fait de son hybridation massive avec d'autres *Oreochromis* sp. introduits. La démarche générale employée ici est de décrire l'histoire récente des populations à l'aide de marqueurs nucléaires (AFLP) et des séquences de l'ADN mitochondrial (ADNmt), puis de mettre en relation ces résultats génétiques avec la diversité morphologique et la parasitologie des populations. Deux systèmes différents ont été étudiés :

1) Au sein de l'aire native, l'étude se focalise sur le Limpopo inférieur et le sous-bassin de la Changane (Mozambique). Des patrons d'introgression incluant trois espèces en présence sont détectés, mais les hybrides sont peu fréquents et leur expansion limitée. Ces résultats sont de plutôt bonne augure pour la conservation d'*O. mossambicus* et ils permettent d'identifier deux zones de conservation prioritaires. L'étude des parasites indique une plus grande diversité parasitaire mais de faibles prévalences dans les sites de moindre valeur en conservation, ce qui pourrait favoriser le succès des espèces introduites et de leurs hybrides.

2) Parmi les territoires envahis, les AFLP et l'ADNmt soutiennent une homogénéité générale et une diversité génétique faible, qui sont interprétées comme le résultat d'un fort goulot d'étranglement précédant l'expansion à l'échelle mondiale. Une structure des populations en lien avec la géographie à large échelle (Nouvelle-Calédonie, Guadeloupe, Jamaïque) est cependant détectée. La variation de la forme du corps est également structurée à large échelle géographique, ce en dépit des fortes variations environnementales enregistrées à l'échelle locale. Cela suggère un effet des contraintes génétiques sur la diversification morphologique contemporaine. L'absence de parasites monogènes sur les populations introduites en Nouvelle-Calédonie peut être mise en relation avec un évènement fondateur, et est proposé comme l'un des facteurs ayant pu favoriser le succès de l'espèce.

En conclusion, une faible diversité génétique ne contraint vraisemblablement pas un potentiel envahissant élevé et une diversification rapide chez les tilapias.

**Mots-clés :** invasion biologique, évolution contemporaine, Cichlidae, hybridation, introgression, parasites monogènes, évènement fondateur, morphométrie géométrique, pression de propagule, tilapia.



## Abstract

Biological invasions are recognized as a significant evolutionary factor over short time scales. In particular, their effect is well recorded on the genetic structure of populations, the patterns of phenotypic evolution and the richness of parasite fauna associated to invasive populations. This study aims at quantifying the consequences of a biological invasion according to these three levels (genetical, phenotypical and parasitological) taking as example the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. This African cichlid is characterized by an unusual conservation status since it is both (*i*) ranked among the world's worst invasive species due to its global dispersion during the 20<sup>th</sup> century and (*ii*) sorted as "near-threatened" (IUCN) over its native range (a part of south-east Africa) because of massive hybridization with alien introduced *Oreochromis* species. The approach used in this study imply to describe the recent history of populations using nuclear (AFLP) and mitochondrial DNA (mtDNA) markers, and then to compare this genetic background to results describing the morphological and parasitological diversity of populations. Two different biological systems were studied:

1) Within the native range, the study focuses on the Lower Limpopo and the Changane sub-drainage (Mozambique). Introgression patterns involving the three co-occurring species were detected, but the frequency of hybrid is low and their geographic expansion is limited. These results provided rather good auspices for the conservation of *O. mossambicus*, and they allowed to identify two zones of high conservation priorities. The parasitological survey reveals high parasite richness and low prevalences among sites of low conservation values. This last pattern could favour the success of alien introduced species and their hybrids.

2) Among the invasive range of *O. mossambicus*, both AFLP and mtDNA support a strong genetic homogeneity and a low genetic diversity, a pattern interpreted as resulting from a strong population bottleneck preceding the events of global dispersion. A pattern of population structure related to large scale geography (New Caledonia, Guadeloupe, Jamaica) is nevertheless detected. Body shape variation is also primarily structured at large geographical scale, suggesting a role for genetic constraints on contemporary morphological diversification. The total absence of monogenean parasites in the populations of New Caledonia could result from a founding event and is suggested as a potential factor that could have favoured the *O. mossambicus*' success.

In conclusion, a low genetic diversity does not likely constraint a strong invasive potential and a rapid phenotypic diversification in tilapias.

**Keywords:** biological invasions, contemporary evolution, Cichlidae, hybridization, introgression, monogenean parasites, founding event, geometric morphometrics, propagule pressure, tilapia.



# Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>3</b>
i-1. Introduction – Contexte .....	3
i-2. Modèle et contexte biologique de la thèse .....	14
i-3. Objectifs – Organisation des résultats .....	19
<b>CADRE METHODOLOGIQUE .....</b>	<b>22</b>
m-1. Stratégie et historique de l'échantillonnage .....	22
m-2. Méthode d'échantillonnage .....	28
m-3. Méthodes moléculaires .....	30
m-4. Morphométrie géométrique .....	35
m-5. Parasitologie .....	36
<b>PARTIE I – AIRE D'ORIGINE.....</b>	<b>39</b>
SECTION I-1. GENETIQUE DES POPULATIONS DU LIMPOPO INFERIEUR (MOZAMBIQUE)	
[Manuscrit 1] .....	40
SECTION I-2. PARASITOLOGIE DES POPULATIONS DU LIMPOPO INFERIEUR (MOZAMBIQUE)	
[Manuscrit 2] .....	78
<b>PARTIE II – ZONES D'INTRODUCTIONS HORS D'AFRIQUE.....</b>	<b>94</b>
SECTION II-1. ORIGINE PHYLOGEOGRAPHIQUE, DIVERSITE, STRUCTURE GENETIQUE ET HETEROGENEITE AU NIVEAU GENOMIQUE DES POPULATIONS ENVAHISANTES .....	95
SECTION II-2. DIFFERENCIATION MORPHOLOGIQUE DES POPULATIONS ENVAHISANTES [Manuscrit 3] .....	122
SECTION II-3. EPIDEMIOLOGIE COMPAREE ENTRE L'AIRE NATIVE D' <i>O. MOSSAMBICUS</i> ET LA NOUVELLE- CALEDONIE, ET REVUE DE LA DIVERSITE DES MONOGENES BRANCHIAUX AFRICAINS HORS D'AFRIQUE .....	150
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>160</b>
Distribution géographique d' <i>O. mossambicus</i> .....	160
Contributions à la compréhension des invasions biologiques .....	161
Perspectives .....	163
<b>ANNEXES .....</b>	<b>189</b>
ANNEXE SECTION I-1.....	189
ANNEXE SECTION II-1 .....	197
ANNEXE SECTION II-2 .....	203
<i>Manuscrit supplémentaire “The alien threespot gourami in New Caledonia”</i> .....	204



# **INTRODUCTION GENERALE**

---

## **i-1. INTRODUCTION – CONTEXTE**

L'emprise croissante des activités humaines sur les écosystèmes est désormais reconnue comme un agent majeur de changement au niveau de la composition et de la structure génétique des populations (Stockwell et al., 2003; Crispo et al., 2011). Les facteurs à l'origine de ce phénomène sont identifiés par Stockwel et al. (2003) comme identiques à ceux causant l'augmentation actuelle du taux d'extinction d'espèces : surexploitation, fragmentation et dégradation des habitats et introduction d'espèces exotiques. Ils vont agir au niveau de la taille des populations (e.g. Uphyrkina et al., 2002), au travers de modification des régimes de sélection (e.g. Walsh et al., 2006) ou sur les flux de gènes entre populations ou espèces interfécondes (e.g. suppression de barrières géographiques, voir Crispo et al., 2011). Cette introduction se propose de faire un bref état des lieux de problématiques liées à l'impact de l'activité humaine sur les populations. Elle se structurera selon les différents angles abordés et approches utilisées dans ce travail (i.e. génétique des populations, hybridation, évolution phénotypique, parasitologie) dans le contexte général de la biologie et de l'évolution des populations envahissantes

## **Invasions biologiques et diversité génétique**

Les **invasions biologiques**, – lorsqu'une espèce exotique prolifère et s'étend en dehors de son aire de répartition native (Richardson et al., 2000; Blackburn et al., 2011) –, sont reconnues comme l'une des principales causes du déclin actuel de la biodiversité (Vitousek et al., 1997; Clavero & García-Berthou, 2005). Les populations envahissantes ont pour intérêt d'être particulièrement sujettes à des changements génétiques rapides. Les facteurs susceptibles de favoriser ce phénomène sont (*i*) la faible taille supposée des populations fondatrices qui implique une diversité génétique faible et fortement soumise à des effets de dérive durant les premiers stades de l'invasion (Allendorf & Lundquist, 2003) et (*ii*) des effets sélectifs forts associés à l'établissement et à l'adaptation de ces populations dans des environnements souvent nouveaux et divers (Lee, 2002).

Ces deux facteurs apparaissent en contradiction puisque la variation génétique est un prérequis indispensable à l'action de la sélection. En effet, une population introduite dans un nouvel environnement peut être perçue comme engagée dans une course entre adaptation et extinction (Orr & Unckless, 2008). Sur une échelle de temps courte, comme cela est le cas pour les populations envahissantes, le processus d'adaptation (i.e. l'augmentation en fréquence des allèles favorables dans les conditions rencontrées) doit être rapide afin de permettre la persistance de la population dans le nouvel environnement. La sélection doit donc agir sur la variation génétique préexistante (« *standing variation* ») et non sur de nouvelles mutations favorables, peu probables sur le court terme (Barrett & Schlüter, 2008). Ceci conduit à ce que certains auteurs ont qualifié de « paradoxe génétique des espèces envahissantes » (Allendorf & Lundquist, 2003; Roman & Darling, 2007). Autrement dit, comment des populations ayant subi un goulot d'étranglement peuvent-elles s'adapter avec succès au(x) nouveau(x) milieu(x) rencontré(s) sur l'aire d'introduction ? Encore plus curieux, comment, en dépit de leur faible diversité génétique,

les espèces envahissantes peuvent-elles, dans de nombreux cas, supplanter les espèces natives supposées *a priori*, localement adaptées (Allendorf & Lundquist, 2003) ?

Durant les années 2000, de nombreux cas empiriques ont permis de progresser vers la résolution de ce paradoxe (e.g. Kolbe et al., 2004; Facon et al., 2005; Kolbe et al., 2008). La solution proposée implique généralement de considérer l'introduction d'une espèce non pas comme un évènement rare et isolé, mais au contraire comme un évènement aisément répliquable car inclut au sein d'une tendance à la dispersion d'individus exotiques (les ‘propagules’) le long de routes favorables. Citons par exemple, l'intensité des voies de transport qui conduiraient à des introductions répétées dans un écosystème receveur (e.g. Kolbe et al., 2004). Par conséquent, une diversité génétique réduite chez les populations envahissantes ne serait pas aussi courante que ce qui est très généralement considérée. Ainsi, les introductions multiples limiteraient la dépression de consanguinité et autoriseraient une réponse à la sélection tout en limitant les processus démographiques stochastiques conduisant à l'extinction de petites populations (Lockwood et al., 2005; Roman & Darling, 2007). Par exemple, les populations envahissantes de la baldingère faux-roseau (*Phalaris arundinacea*), une poacée, présentent des diversités génétiques et des variances phénotypiques héritables plus élevées que les populations natives, ce qui est interprété comme le résultat d'introductions multiples favorisant ainsi le potentiel adaptatif des populations introduites (Lavergne & Molofsky, 2007). La **pression de propagule** – définie comme le produit entre le nombre d'individus introduits par évènement d'introduction et le nombre d'évènements d'introduction (Roman & Darling, 2007)<sup>1</sup> – est donc rapidement devenue un concept central en biologie des invasions afin d'expliquer le succès d'une espèce envahissante (Lockwood et al.,

---

<sup>1</sup> Définition complète fournie par Roman & Darling (2007) :

“**Propagule pressure:** A measure of the number of viable individual non-native organisms introduced to a recipient environment. Equal to the product of inoculum size (the number of propagules released with a single introduction event) and number of introduction events.”

2005; Hänfling, 2007). Cette tendance est particulièrement bien soulignée par Colautti et al. (2006) qui, à l'issu d'une méta-analyse, concluent que la pression de propagule doit être considérée comme le paramètre de base sous-tendant le succès d'une invasion. En d'autres termes, les autres facteurs potentiels qui déterminent le succès d'une invasion ou d'une espèce envahissante devraient être analysés en prenant en compte la pression de propagule comme trame de fond ou autrement dit, comme hypothèse nulle (Colautti et al., 2006). C'est donc dans ce contexte que l'étude de la phase de transport, des patrons et des mécanismes de dispersion des propagules prend tout son intérêt (Garcia-Berthou, 2007; Estoup & Guillemaud, 2010).

L'importance centrale de la pression de propagule en biologie des invasions, ou inversement l'influence négative des goulots d'étranglement sur le potentiel envahissant ont cependant été tempérées par Dlugosch & Parker (2008). La méta-analyse de ces auteurs tend à démontrer que chez les populations envahissantes, de fortes diversités génétiques résultant d'introductions multiples ne sont finalement observées que dans quelques cas qui tendent à être mis en exergue (cf. tableau i-A). Ceci mène Dlugosch & Parker (2008) à conclure que les introductions multiples ne sont généralement pas un ingrédient essentiel au succès d'une espèce envahissante, d'autant plus que l'expansion de cette dernière peut généralement précéder les introductions ultérieures.

Comme le notent par exemple Roman & Darling (2007), plusieurs facteurs peuvent conduire au succès d'une invasion biologique en dépit d'une faible diversité. Citons par exemple le fait que la variance additive de traits impliqués dans l'adaptation ne soit pas nécessairement affectée avec la même intensité que la diversité génétique neutre généralement mesurée (e.g. Lindholm et al., 2005) puis le très possible rôle de la plasticité phénotypique permettant l'ajustement rapide du phénotype aux nouvelles conditions locales (Hendry et al., 2008). Par conséquent, le « paradoxe » demeure, mais a eu le mérite de rapprocher un peu plus la biologie

des invasions de la biologie évolutive au travers d'un recentrage du questionnement sur la variation génétique.

**Table i-A.** Summary of a suggested classification for biological invasions based on patterns of genetic diversity and admixtures. Here the two criteria are the occurrence of multiple introductions (columns) and the potential for hybridization with native gene pools (rows). References to recent case studies exemplifying each category, when found, are given in small characters.

Multiple introductions, i.e. high propagule pressure		
	No	Yes
<b>Hybridization and potential admixture with native species</b>	No → Population bottleneck and loss of genetic diversity <i>Leptinotarsa</i> potato beetle (Grapputo et al., 2005); <i>Solenopsis</i> fire ant (Ross & Shoemaker, 2008) <i>Carpodacus</i> house finch (Hawley et al., 2006); <i>Eichhornia</i> water hyacinth (Zhang et al., 2010); <i>Rana</i> American bullfrog (Ficetola et al., 2008);	→ High genetic diversity, sometime higher than native populations <i>Anolis</i> lizards (Kolbe et al., 2004; 2008); <i>Phalaris</i> grass (Lavergne & Molofsky, 2007); <i>Melanoides</i> snails (Facon et al., 2008) <i>Neovison</i> American mink (Zalewski et al., 2010)
	Yes → Three possible categories (Allendorf et al., 2001): (i) No introgression <i>Pseudorasbora</i> minnows (Konishi & Takata, 2004) (ii) Widespread introgression <i>Ambystoma</i> salamanders (Fitzpatrick et al., 2010) (iii) Complete Admixture New-Zealand mallard (Rhymer et al., 1994). Uncontestable recent examples of this category seems rather rare.	→ High genetic diversity and possible increased introgression potential expected No or at most rarely documented situation. See the section I.1 of the present study.

### Hybridation avec les espèces natives

Avant ce débat sur la pression de propagule, Rhymer & Simberloff (1996) avaient attiré l'attention sur un autre aspect sous-estimé des introductions d'espèces impliquant -tout comme pour la mise en contact de propagules- le mélange de génotypes différenciés : l'hybridation des espèces introduites avec les espèces natives ou ‘invasions avec hybridation’. Ce phénomène est longtemps resté difficile à détecter lorsque seules des observations sur les phénotypes ou

quelques marqueurs génétiques employés à petite échelle étaient généralement disponibles (Rhymer & Simberloff, 1996). Ses conséquences pour la biodiversité sont néanmoins significatives tant au niveau de l'intégrité génétique des espèces envahies que des écosystèmes (Rhymer & Simberloff, 1996; Brusati & Grosholz, 2006; Seehausen et al., 2008). Par exemple, la formation d'hybrides entre des salamandres natives et introduites (genre *Ambystoma*), en plus de menacer génétiquement l'espèce native, a des conséquences négatives sur les populations d'autres amphibiens à cause de l'activité prédatrice accrue des hybrides (Ryan et al., 2009; Fitzpatrick et al., 2010)<sup>2</sup>.

Afin de fournir aux biologistes de la conservation un cadre conceptuel permettant la prise de décisions pour la gestion de ces phénomènes, Allendorf et al. (2001) distinguent trois catégories d'invasions biologiques avec hybridation : (i) l'hybridation sans introgression génétique, où seule une F<sub>1</sub> stérile est formée ; (ii) l'hybridation avec introgression répandue, impliquant la formation d'hybrides au-delà de la F<sub>1</sub> mais avec persistance locale de populations non-introgressées ; (iii) le brassage génétique complet, avec peu ou pas de populations pures restantes. Ces trois cas impliqueront des activités de gestion différentes pour la préservation des espèces natives, respectivement : l'élimination des individus introduits et des hybrides (cas *i*), maintenir et favoriser l'expansion des populations pures (cas *ii*) et considérer si besoin la conservation des populations hybrides (cas *iii*).

Prédire un phénomène d'invasion biologique avec hybridation implique la prise en compte des barrières géographiques et écologiques à la dispersion et l'établissement de l'espèce exotique (comme dans tout cas d'invasion biologique) (Richardson et al., 2000; Blackburn et al.,

---

<sup>2</sup> Voir cependant : Ricciardi, A. & Atkinson, S. K. 2004. Distinctiveness magnifies the impact of biological invaders in aquatic ecosystems. *Ecology Letters* 7: 781-784.

Cette méta-analyse suggère que l'impact des espèces envahissantes tend à être plus élevé lorsque le genre de l'espèce introduite n'est pas originellement présent dans l'écosystème d'accueil. Ce résultat suggèrerait donc un coût écologique moindre pour les invasions biologiques avec hybridation relativement aux invasions sans hybridation avec les espèces natives.

2011) ainsi que des barrières reproductives déterminant la perméabilité mutuelle des génomes en présence (Mallet, 2005). Le potentiel évolutif des hybrides, relativement aux génotypes locaux, apparaît donc comme une composante centrale qui doit être considérée afin de comprendre et prédire un phénomène d'invasion biologique avec hybridation (Prentis et al., 2008). Par exemple, Verhoeven et al. (2011) prédisent que l'introgression doit se répandre tant que la fitness des hybrides reste supérieure au coût ‘masqué’ de la dépression de consanguinité propre à toute population (native) adaptée localement (i.e. notamment du fait de contraintes écologiques aux flux de gènes entrants). Encore une fois, ces considérations rejoignent un questionnement central – et tout particulièrement actuel – en biologie évolutive qui porte sur le rôle de l'hybridation interspécifique comme déterminant majeur des patrons de spéciation et de diversification (Seehausen, 2004; Nolte & Tautz, 2010).

Les invasions biologiques ont donc pour conséquence des modifications profondes de la composition génétique des populations. Le tableau i-A résume et fournit quelques exemples supplémentaires pour illustrer les paragraphes précédents. En bref, les deux agents principaux sont (i) les effets fondateurs et les effets de dérive qui en résultent et (ii) la mise en contact et le brassage de pools génétiques antérieurement isolés (qu'il s'agisse de deux populations introduites [introductions multiples] ou d'une population introduite et une population native [invasion avec hybridation]). À ces deux facteurs s'ajoutent des effets sélectifs agissant sur l'adaptation des populations envahissantes. Les conséquences de ces processus et leur ampleur ont conduit Vellend et al. (2007) à proposer que les invasions biologiques ne doivent pas seulement être perçues comme un agent de déclin de la biodiversité, mais également comme un facteur majeur de diversification évolutive - définie par Vellend et al. (2007) comme une augmentation de la variation génétique entre populations.

## **Changements phénotypiques**

L'augmentation de la variation génétique entre populations envahissantes peut également être détectée au niveau des phénotypes. Parmi les premières études mettant en évidence des changements phénotypiques 'rapides', Johnston & Selander (1964) rapportent une diversification phénotypique importante en un siècle environ chez le moineau domestique (*Passer domesticus*) introduit en Amérique du Nord et à Hawaï. La même année Berry (1964) note l'apparition, en 70 ans, de changements profonds de la morphologie du squelette chez une population insulaire de souris domestique (*Mus musculus*). Comme le soulignent Carroll et al. (2007), l'usage d'expériences en jardin commun dans les années 80 (et leur quasi-généralisation dans ce contexte) a permis de démontrer la possibilité d'une base héritable aux changements phénotypiques 'rapides' (e.g. Colautti et al., 2009; Franssen, 2011; voir également références citées par Carroll et al., 2007). Ces travaux ont ensuite engagé l'étude de l'évolution 'rapide' des phénotypes dans des registres de questions élargis et en prise avec des problématiques fondamentales en biologie évolutive. Citons notamment les sujets concernant : la contribution de la sélection aux patrons observés au niveau macroévolutionnaire (e.g. Reznick et al., 1997), la sélection de nouveaux phénotypes induisant la mise en place de barrières reproductives (i.e. la spéciation écologique, Hendry et al., 2000; Berner et al., 2010), la prédictibilité des trajectoires évolutives (Kolbe et al., 2007; Mathys & Lockwood, 2009) ou plus récemment la dynamique des interactions et du *feed-back* entre processus évolutifs et écologiques (i.e. les 'dynamiques éco-évolutives', pour une synthèse récente, voir Schoener, 2011).

Afin d'éviter l'emploi dans un tel contexte du terme « évolution rapide », relativement imprécis (ce qui est rapide pour un macro-évolutionniste ne le sera pas forcément pour un écologiste...), Stockwell et al. (2003) ont proposé le terme d' « **évolution contemporaine** », définissant le changement héritable d'un trait qui se produit en moins de quelques centaines de générations<sup>3</sup>. De façon générale, la comparaison des taux d'évolutions entre populations naturelles préservées et impactées par l'action anthropique tend à indiquer que l'activité humaine, incluant les introductions d'espèces, ‘accélère’ l'évolution des traits quantitatifs (pour une méta-analyse récente : Hendry et al., 2008). Ce type de constat a conduit à mettre en avant le potentiel des populations envahissantes à l'évolution contemporaine afin d'expliquer leur succès et leur capacité d'adaptation à de nouveaux milieux (Lee, 2002), puis en retour, de les mettre en avant comme modèles privilégiés pour étudier l'évolution sur des échelles de temps courtes (Westley, 2011).

L'étude des populations envahissantes comme modèle en évolution contemporaine, en particulier durant les années 2000, a très naturellement conduit à l'accumulation de données empiriques soutenant la possibilité de changements phénotypiques significatifs, observables sur des échelles de temps courtes et potentiellement générés selon différents processus neutres (dérive aléatoire) ou sélectifs (i.e. sélection naturelle, ou « tri spatial » durant la dispersion au sens de Shine et al., 2011). Ce n'est que récemment que quelques travaux se sont focalisés sur les contraintes pouvant peser sur l'évolution contemporaine. En comparant des populations d'épinoches post-glaciaires et historiques (i.e. « contemporaines »), Berner et al. (2010) discutent de l'effet des contraintes génétiques (variation faible) ou chronologiques (temps de divergence trop court depuis l'introduction) limitant l'ampleur de la différenciation morphologique

---

<sup>3</sup> Définition complète fournie par Stockwell et al. (2003) :

“**Contemporary evolution:** heritable trait evolution observed in contemporary time (i.e. less than a few hundred generations).”

adaptative lac *vs.* rivière au sein des populations historiques. Chez une plante envahissante, Colautti et al. (2010) mettent en évidence une covariation génétique entre des traits d'histoire de vie (date de floraison et taille à maturité) qui constraint l'adaptation des populations et leur expansion vers les hautes latitudes. Cette étude soutient ainsi Baccigalupo (2009) qui souligne l'importance de prendre en compte des covariations génétiques entre traits comme contraintes et prédicteurs du potentiel invasif d'une population. Ces nouveaux regards sur l'évolution des phénotypes chez des populations introduites renforcent considérablement leur intérêt en tant que modèles évolutifs. Une difficulté principale reste cependant la distinction et l'estimation de l'importance relative des composantes plastiques et héritables dans les différences observées à une échelle de temps contemporaine (Hendry et al., 2008; Westley, 2011).

### **Le double intérêt des parasites**

Aux niveaux génétiques et phénotypiques présentés ci-dessus s'ajoute un troisième type de marqueur d'intérêt pour l'étude des invasions biologiques. Il s'agit de la faune de parasites portée par les propagules à l'origine d'une invasion. En effet, la composition de cette faune est susceptible d'apporter des informations sur l'origine géographique des hôtes introduits et sur leur écologie comme cela peut s'avérer être le cas à de plus larges échelles chronologiques ou taxonomiques (e.g. Choudhury & Dick, 2001; Pariselle et al., 2011). La perte de parasites entre l'aire native et l'aire envahie est un patron attendu et bien documenté (Torchin et al., 2003). Ce phénomène résulte notamment des effets fondateurs à l'origine des populations introduites, tout comme pour la perte de diversité génétique. En effet, les espèces de parasites introduites, tout comme les allèles, ne représentent qu'un sous-ensemble de la diversité présente sur l'aire native. Les données parasitologiques et génétiques permettent donc d'inférer l'origine potentielle des

propagules introduites et l'intensité des goulots d'étranglement démographiques, puis de proposer des scénarios d'invasion compatibles avec les deux approches (Merella et al., 2010).

Les effets fondateurs ne sont pas les seuls déterminants de la diversité du cortège parasitaire d'une espèce envahissante. La perte de parasites peut aussi être générée par la contre-sélection des individus les plus parasités durant la phase de transfert et également par la diminution du taux de transmission des parasites, notamment en lien avec la faible densité des hôtes durant la phase de transmission (voir Dunn, 2009). Enfin, l'hôte introduit est également susceptible d'acquérir des nouveaux parasites provenant de l'écosystème d'accueil (e.g. Kvach & Skora, 2007). Quoi qu'il en soit, la tendance générale conduit globalement à une diminution de la diversité des parasites et de leur prévalence entre les populations natives et les populations envahissantes (Torchin et al., 2003; Prenter et al., 2004). Ce patron a conduit à proposer l'**« hypothèse de la perte des ennemis »**<sup>4</sup> qui stipule que la perte des parasites (et plus généralement des « ennemis », incluant donc les prédateurs) est un phénomène favorisant le succès des espèces envahissantes (Keane & Crawley, 2002; Mitchell & Power, 2003; Torchin et al., 2003). Si la perte des ennemis est solidement documentée en tant que *patron*, Colautti et al. (2004) suggèrent de le considérer avec prudence en tant que *processus* déterminant le succès des populations envahissantes. En effet, une multitude d'autres facteurs déterminent le potentiel envahissant d'une population et l'effet des parasites sur la fitness des hôtes est rarement quantifié en conditions naturelles. Cependant, puis qu'un parasite est par définition un organisme induisant un coût énergétique à son hôte, tout porte à penser que la perte de parasites ne peut avoir qu'un rôle favorable (ou au pire nul) sur l'établissement et la prolifération de l'hôte.

---

<sup>4</sup> Définition originale fournie par Keane & Crawley (2000), initialement pour les plantes envahissantes: “**Enemy release hypothesis** states that enemy release is an important mechanism for exotic plant invasiveness.”

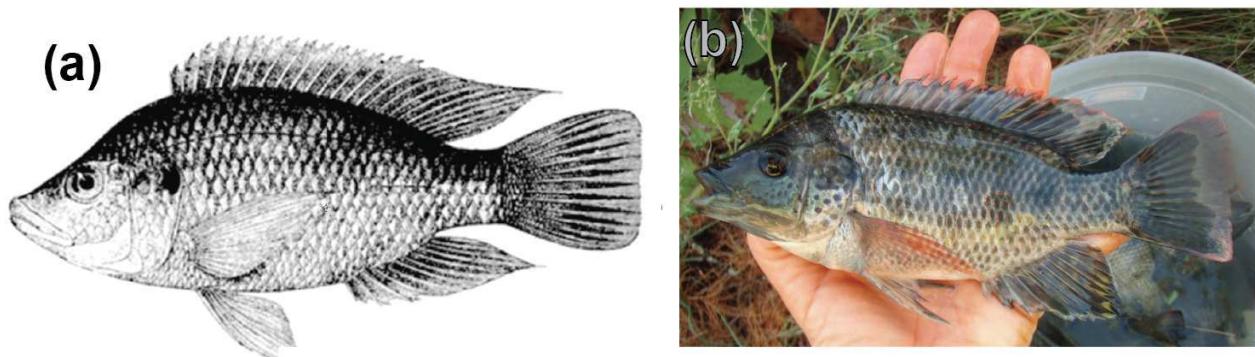
En résumé, l'étude des parasites associés aux populations envahissantes peut à la fois fournir des marqueurs pour reconstruire l'histoire de l'invasion, mais aussi des indications écologiques contribuant potentiellement à expliquer le succès l'espèce introduite.

## **i-2. MODELE ET CONTEXTE BIOLOGIQUE DE LA THESE**

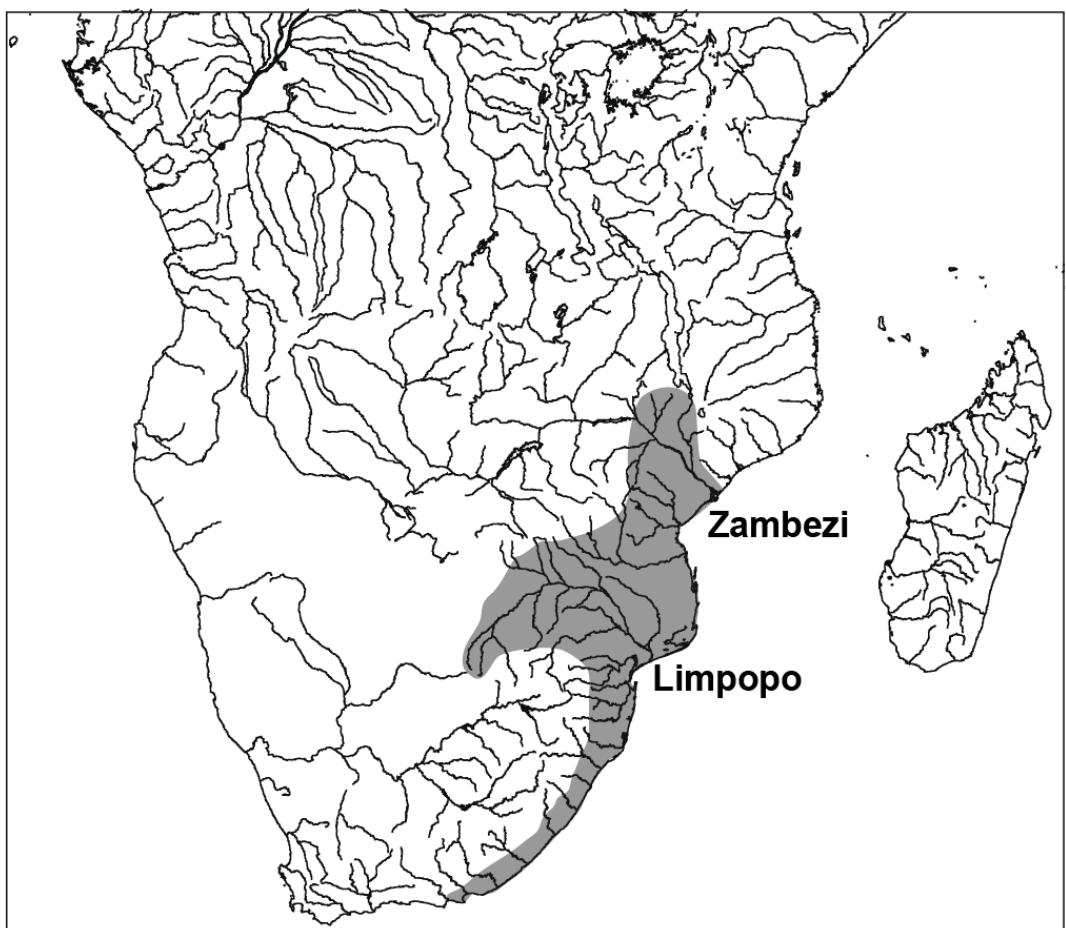
Un groupe particulièrement adéquat pour aborder les différents aspects évoqués ci-dessus est représenté par les tilapias. Le nom vernaculaire « tilapia » qualifie les représentants d'un groupe de poissons téléostéens de la famille des cichlidés, originaires d'Afrique et du Proche-Orient (Trewavas, 1983). Près d'une centaine d'espèces, attribuées à trois genres taxonomiques, sont couramment rassemblés au sein des tilapias : *Oreochromis*, *Sarotherodon* et *Tilapia*, respectivement caractérisés par des modes d'incubation des œufs dans la cavité buccale de la femelle, du mâle (ou parfois biparentale) et sur substrat. Les données phylogénétiques récentes ne soutiennent pas la monophylie des tilapias et placent la plupart des représentants du groupe à la base de la radiation des cichlidés Est-Africains (Schwarzer et al., 2009). Depuis les années 1930, les tilapias ont été dispersés à l'échelle mondiale à des fins aquacoles et de lutte biologique. Ils représentent aujourd'hui l'un des groupes de poissons d'eau douce le plus largement répandus à l'échelle mondiale avec les carpes (Costa-Pierce, 2003). Le total de la production aquacole actuelle de tilapias, en grande partie concentrée en Asie, est estimée à 2,5 millions de tonnes (FAO, 2011). Leur croissance et reproduction rapides et leur mise en culture aisée tant dans des contextes d'agriculture familiale que dans de grandes fermes aquacoles ont valu aux tilapias le surnom de « poulets aquatiques » (Coward & Little, 2001). Dans de nombreux cas, la dispersion des individus en dehors des piscicultures, ou bien des introductions directes dans les bassins versants, ont conduit à l'établissement en zones tropicales ou péri-tropicales de populations

viables qui ont fréquemment causé des dommages profond, dans les écosystèmes locaux (Canonico et al., 2005). De plus, le transfert d'espèces de tilapias au sein du continent africain a également eu des conséquences négatives sur les espèces de tilapias natives (e.g. Balirwa et al., 2003). L'interfécondité entre de nombreuses espèces peut en effet induire l'introgression et des effets irréversible de dilution et de menace des pools génétiques natifs (e.g. Angienda et al., 2011).

**Figure i-A.** Two representations of *Oreochromis mossambicus*. (a) Original drawing from Boulenger (1915, reproduced after Trewavas 1983) and (b) a specimen from the Linlangalinwe sampling station in the Changane River System (Mozambique).



**Figure i-B.** Reported native range (shaded area) of *O. mossambicus* (Pullin, 1988; D'Amato et al., 2007).



Si une seule espèce était particulièrement bien représentative, voire emblématique, des conséquences de l'effet des introductions de tilapias sur la biodiversité locale, il s'agirait du tilapia du Mozambique *Oreochromis mossambicus*, Peters 1852 (Figure i-A). Deux raisons distinctes justifient cette affirmation :

- (i) *O. mossambicus* a été la première espèce de tilapia dispersée à l'échelle mondiale. Avant 1939, *O. mossambicus* était seulement mentionnée sur son aire d'origine (Figure i-B) qui comprend les bassins du Limpopo et du Zambèze inférieur, des fleuves côtiers d'Afrique du Sud et du Mozambique, et qui s'étend au sud jusqu'à la rivière de Boesmans en Afrique du Sud (Skelton, 2001; Fishbase, 2011). Sa première présence hors d'Afrique est documentée sur la côte sud de l'île de Java (Indonésie) en 1939 où l'origine de son introduction reste inconnue. *O. mossambicus* aurait rapidement dispersé sur toute l'île à partir de cinq individus collectés dans la nature : supposément deux femelles et trois males (Schuster, 1952; Vass & Hofstede, 1952). Cette même souche a ensuite été dispersée à l'échelle mondiale. Pour quelques exemples, citons l'Asie (e.g. Malaisie en 1944, Taiwan en 1946, Thaïlande en 1949), l'arc Caraïbe (e.g. Ste. Lucie en 1949, Jamaïque en 1950, République Dominicaine en 1953) et le Pacifique (e.g. Nouvelle-Calédonie en 1954, Tahiti en 1957, Australie en 1978) (Atz, 1954; Devambez, 1964; Nelson & Eldredge, 1991; Fishbase, 2011). *O. mossambicus* s'est rapidement acclimaté à une large gamme de conditions environnementales (Pérez et al., 2006) et compte parmi les espèces de poissons d'eau douce les plus largement dispersés à l'échelle mondiale (Costa-Pierce, 2003). Sur certains territoires, il a cependant été remplacé par d'autres espèces de tilapias introduites ultérieurement (e.g. *Oreochromis niloticus*), notamment en Asie (Pullin, 1988; Costa-Pierce, 2003). Des conséquences négatives sur les écosystèmes et les populations d'organismes aquatiques natifs ont été fréquemment reportées (e.g. Keith,

2002; Canonico et al., 2005) au point qu'*O. mossambicus* apparaît sur le liste des 100 espèces les plus envahissantes au monde (Lowe et al., 2000).

- (ii) *O. mossambicus* est menacé sur son aire d'origine à cause de son hybridation avec l'espèce largement introduite *O. niloticus* originaire de la région nilo-soudanique. Par conséquent, *O. mossambicus* apparaît sur la liste rouge de l'IUCN parmi les espèces « quasi-menacées » (Cambray & Swartz, 2007). Les preuves les plus claires de l'hybridation entre les deux espèces proviennent du bassin du Limpopo où *O. niloticus* a probablement été introduit pour la première fois au début des années 1990 dans plusieurs lacs de barrages du Limpopo supérieur (van der Waal & Bills, 2000; Tweddle & Wise, 2007). Des hybrides entre les deux espèces ont par la suite été détectés dans le Limpopo supérieur (Moralee et al., 2000; D'Amato et al., 2007; van der Bank & Deacon, 2007). Par ailleurs, *O. niloticus* a également été introduit dans le Limpopo inférieur lors de la destruction d'une pisciculture par une crue majeure en 2000 (Schneider, 2003). Auparavant, *Oreochromis andersonii*, phylogénétiquement et phénotypiquement plus proche d'*O. mossambicus* (Trewavas, 1983; Nagl et al., 2001; Klett & Meyer, 2002), a été également introduit dans le Limpopo supérieur en 1973 (de Moor & Bruton, 1988) ce qui s'accorde avec la présence d'haplotypes mitochondriaux de l'espèce documentés dans le Limpopo (D'Amato et al., 2007).

Par conséquent, *O. mossambicus* fournit l'opportunité rare d'étudier au sein de la même espèce (i) la biologie et l'évolution de populations historiques isolées et (ii) un cas complexe d'invasion biologique impliquant la formation d'hybrides entre une espèce native et des espèces introduites. Par ailleurs, elle possède des particularités biologiques remarquables. Certaines sont communes à d'autres espèces de tilapias telles qu'un âge à la maturité relativement précoce qui

peut varier de 5 à 12 mois en fonction des conditions du milieu (Hodgkiss & Man, 1978), une fréquence des pontes très élevée puisque la période fraie (trois à quatre mois sur l'aire native) peut comporter jusqu'à cinq pontes par femelle (James & Bruton, 1992 et références citées). D'autres caractéristiques sont plus rares au sein des tilapias comme une grande tolérance à la salinité, puisque *O. mossambicus* peut survivre et se reproduire en eau de mer (Brock, 1954). Une étude expérimentale récente (Schnell & Seebacher, 2008) montre également la grande capacité d'*O. mossambicus* à maintenir ses fonctions physiologiques dans des conditions de température basses (12°C).

### **i-3 OBJECTIFS DE LA THESE - ORGANISATION DES RESULTATS**

Les objectifs de ce travail sont listés ci-dessous avec la structuration du présent manuscrit. De façon générale, pour les deux systèmes biologiques étudiés, la démarche générale employée consiste à (1) décrire l'histoire récente des populations échantillonnées au travers d'analyses génétiques (composition, structure, diversité) puis (2) à mettre en relation les résultats génétiques avec les données obtenues dans un second temps concernant la diversité morphologique et/ou des aspects parasitologiques (diversité et épidémiologie).

Cette thèse se compose donc de deux parties, chacune centrée sur un système d'étude : le système hybride du Limpopo inférieur (Mozambique) [**Partie I**] et les populations introduites d'*O. mossambicus* en dehors de son aire d'origine [**Partie II**].

-La section **I-1** (manuscrit d'article 1) est consacrée à la génétique des populations du Mozambique. Elle a pour objectif de déterminer la distribution des espèces introduites, leur

diversité et les patrons d’hybridation avec *O. mossambicus* dans le Limpopo inférieur (une zone qui n’a encore jamais fait l’objet d’études génétiques) et de mettre en évidence des populations possiblement préservées de l’introgression avec les espèces introduites.

-La section I-2 (manuscrit d’article 2) traite également de ce même système au travers d’une étude parasitologique ayant pour but de comparer l’épidémiologie et la richesse spécifique des parasites entre populations de faibles et de fortes valeurs en conservation pour *O. mossambicus*.

Les populations d’*O. mossambicus* natives identifiées comme non-affectées par l’invasion et l’hybridation avec d’autres tilapias seront utilisées comme éléments de comparaison dans la Partie II.

-La section II-1 a pour but de quantifier la diversité génétique des populations introduites d’*O. mossambicus* (avec les populations natives prises comme élément de comparaison), de préciser leur origine phylogéographique, de déterminer si une ou plusieurs introductions ont contribué à l’établissement de l’espèce hors de son aire d’origine et enfin, de décrire les patrons de différenciation contemporaine entre ces population à l’échelle du génome.

-La section II-2 (manuscrit d’article 3) est consacrée à une analyse de la différenciation morphologique contemporaine chez *O. mossambicus*. L’objectif principal sera d’évaluer le rôle des contraintes phylogéographiques (définies comme la combinaison de l’apparentement entre populations et des effets fondateurs tels qu’estimés en section II-1) et des facteurs environnementaux dans la structuration de la diversité morphologique apparue sur une échelle de temps contemporaine.

-Enfin, la section II-3 est consacrée à une analyse parasitologique comparée entre les populations d’*O. mossambicus* natives (section I-2) et envahissantes (Nouvelle-Calédonie). Les

résultats sont intégrés à une plus large échelle concernant la diversité parasitaire chez les tilapias introduits.

Auparavant, un chapitre méthodologique résumera des stratégies utilisées pour l'obtention des échantillons et des données.

# CADRE METHODOLOGIQUE

---

## **m-1. STRATEGIE ET HISTORIQUE DE L'ECHANTILLONNAGE**

Aucun matériel biologique n'était disponible en octobre 2008 lors de l'initiation de ce projet. Sa réalisation impliquait donc un effort de collecte important, tant sur l'aire d'origine d'*O. mossambicus* que sur des territoires où l'espèce été introduite. Cette partie a pour but de faire un rapport relatif au temps de ma thèse (Octobre 2008 - Décembre 2009) qui a été investi dans l'obtention des échantillons et de fournir un bilan récapitulant la stratégie d'échantillonnage employée. Elle vise également à mentionner pourquoi que le patron d'échantillonnage qui constitue la « matière première » de ce travail, pour ses points forts comme pour ses lacunes, résulte d'une stratégie planifiée tout autant que du hasard des rencontres lors de la mise en place de collaborations.

### **Echantillonnage au sein de l'aire d'origine d'*O. mossambicus***

L'obtention d'échantillons d'*O. mossambicus* sur son aire d'origine devait répondre à deux objectifs : (i) disposer d'échantillons de références auxquels comparer les populations envahissantes et (ii) décrire les patrons et la prévalence de l'hybridation d'*O. mossambicus* avec d'autres *Oreochromis* introduits (cf. D'Amato et al., 2007). Concernant le premier point, Keller & Taylor (2008) soulignent clairement la nécessité de disposer d'un échantillon représentatif de

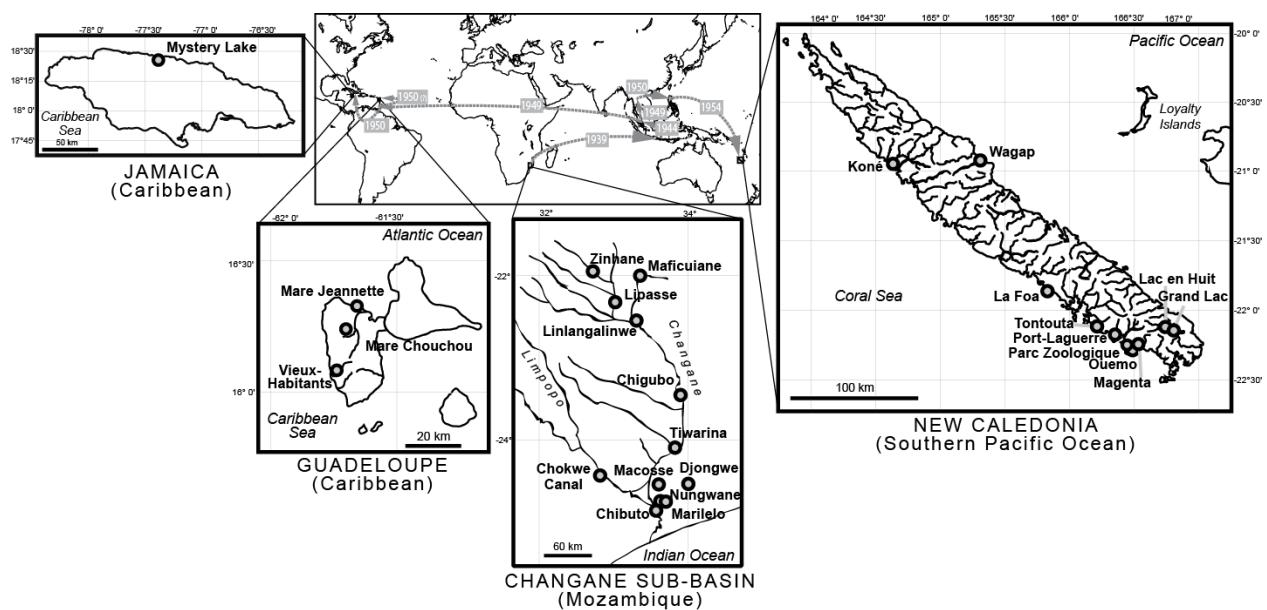
la variabilité d'une espèce envahissante sur son aire d'origine. En effet, l'origine phylogéographique d'un échantillon de référence pris sur l'aire d'origine peut appartenir à une unité phylogéographique distincte de celle à l'origine des populations envahissantes. Dans ce cas la différence observée entre l'aire native et l'aire envahie peut en premier lieu être attribuée à la variabilité géographique préexistante sur l'aire native, et non à un évènement de divergence associé à l'invasion. Un échantillonnage exhaustif de la variabilité des traits étudiés sur l'aire native apparaît donc comme la seule issue permettant de contourner cette difficulté. Cependant, l'organisation de plusieurs missions de terrain dans les divers drainages de l'aire d'origine (en plus de celles prévues dans les territoires envahis) était financièrement et chronologiquement irréalisables en début de projet, ce qui conduira par la suite à interpréter avec réserve les patrons de différenciation entre l'aire d'origine et les territoires envahis. Par ailleurs, l'introduction d'autres espèces du genre *Oreochromis* introduites sur l'aire native d'*O. mossambicus* et avec lesquelles l'hybridation est possible (D'Amato et al., 2007; van der Bank & Deacon, 2007) réduit considérablement le rayon d'action concernant la recherche de populations d'origine de référence. En effet, il peut s'avérer délicat de prévoir à partir du phénotype des populations échantillonnées si celles-ci représentent ou non des *O. mossambicus* non-introgressés (van der Bank & Deacon, 2007), et ont ou non de la valeur comme *O. mossambicus* natifs de référence.

Au début de ma thèse, j'ai cependant eu connaissance par l'intermédiaire du Professeur Jos Snoek (Musée Royal d'Afrique Centrale, Tervuren) des travaux entrepris au Mozambique par Michèle Losseau. M. Losseau menait depuis 2004 un inventaire ichthyologique de la rivière Changane (Figure m-A), un sous-drainage du bassin du Limpopo qui représente la zone humide la moins affectée par l'activité humaine et la plus vaste du bassin (Hugues & Hugues, 1992). Une forte hétérogénéité phénotypique des *Oreochromis* le long de la Changane avait été observée par M. Losseau (Losseau et al., soumis) et suggérait fortement la présence d'hybrides (e.g. patron

variable des rayures dans la nageoire caudale, voir Trewavas, 1983; van der Bank & Deacon, 2007). Ces observations faisaient écho aux cas d'hybridation entre *O. mossambicus* et *O. niloticus* qui avaient déjà été mis en évidence dans le bassin du Limpopo (Moralee et al., 2000; D'Amato et al., 2007). La mise à disposition de la plupart des échantillons déjà collectés et l'occasion offerte par la famille Losseau de réaliser une mission de terrain au Mozambique a déterminé la mise en place de la première partie de cette thèse.

Une partie des échantillons avait déjà été prélevée par M. Losseau lors de ses inventaires ichthyologiques (2006-2008). La mission de terrain de deux semaines, co-réalisée en juin-juillet 2009 avec M. Losseau, a permis d'échantillonner trois localités supplémentaires : deux susceptibles d'abriter des *O. mossambicus* non-introgressés dans les zones les plus reculées du système (Linlangalinwe et Lipasse) et une dans le Limpopo (Chokwe Canal) qui devait servir de point de référence en tant que zone fortement exposée à l'invasion d'espèces introduites. Elle a également permis de renforcer l'échantillonnage sur cinq localités d'intérêt (Macosse, Nungwane, Marilelo, Chibuto, Chigubo), et de prélever des branchies en vue d'analyses parasitologiques (Chigubo, Chokwe Canal, Macosse, Linlangalinwe). Plus de 300 spécimens ont été prélevés durant cette mission.

**Figure m-A.** Sampled areas and geographic distribution of the 26 sampled localities. Arrows and dates on the middle panel illustrate the recent history of the sampled populations according to Fishbase (2011).



### Echantillonnage en dehors de l'aire d'origine d'*O. mossambicus*

- Mission sur l'aire d'introduction

Il était nécessaire de centrer cette partie du projet sur l'un des territoires envahis, tant d'un point de vue pratique (minimiser le nombre et les coûts des missions) que scientifique (étudier des populations ayant une histoire récente commune). Le projet initial prévoyait de concentrer à Madagascar la majeure partie de l'échantillonnage. Cependant, quatre autres espèces d'*Oreochromis* sp. avaient été introduites dans les drainages de Madagascar (Arnoult, 1953; Fishbase, 2011) et avec pour certaines des cas d'hybridations interspécifiques déjà documentés (e.g. Daguet & Moreau, 1981) ce qui augurait un système génétique trop complexe pour étudier la différenciation rapide d'*O. mossambicus* (i.e. nécessité de disposer d'échantillons de référence représentatifs pour chaque espèce en présence, afin de contrôler la variation niveau interspécifique et liée à l'hybridation). De plus, la faible disponibilité des collaborations initialement prévues sur place et la crise politique malgache de début 2009 rendaient l'organisation d'une collecte très hasardeuse. Par conséquent une zone d'échantillonnage de substitution devait être rapidement identifiée. Elle devait répondre aux conditions suivantes :

**(1)** *O. mossambicus* est la seule espèce du genre introduite afin de permettre d'étude de la divergence en s'affranchissant de l'effet d'événements d'hybridation interspécifique récents. En effet, dans certains cas, *O. mossambicus* aurait même été partiellement ou totalement remplacé par des espèces introduites plus récemment (Pullin, 1988).

**(2)** Une superficie et un nombre de bassins colonisés importants permettant le prélèvement sur un nombre élevé de localités.

**(3)** La présence de conditions écologiques variables afin d'évaluer la part de facteurs environnementaux sur les patrons de divergence.

**(4)** La possibilité d'obtenir sans trop de difficultés les autorisations d'échantillonnages et d'exportation du matériel collecté. Par exemple, l'Inde, où l'exceptionnelle présence d'*O. mossambicus* en haute altitude (1050 m) est reportée (Raghavan et al., 2008), ne remplissait malheureusement pas ce dernier critère.

Après une comparaison des différents territoires où *O. mossambicus* est reporté comme introduit (Lowe et al., 2000; Fishbase, 2011), j'ai proposé de focaliser l'échantillonnage sur la Grande Terre de Nouvelle-Calédonie (Figure m-A). Ce territoire répondait aux quatre critères susmentionnés. Cependant des incertitudes demeuraient quant à la distribution effective d'*O. mossambicus* dans le réseau hydrographique de l'île (critère #2 ci-dessus). En effet la synthèse la plus récente concernant la distribution de l'espèce en Nouvelle-Calédonie (Marquet et al. 2003) ne témoignait que de deux sites de la partie sud de l'île où *O. mossambicus* était reporté avec certitude. Des échanges avec Dr. Christine Pollabauer (bureau d'étude Erbio), ont cependant encouragé à la réalisation d'une mission de trois semaines (coréalisée avec P. Alibert) qui s'est déroulée lors de la deuxième année de cette thèse (Novembre 2009). Le matériel collecté a été obtenu en décembre 2009.

La mission en Nouvelle-Calédonie a permis de récolter plus de 290 spécimens répartis sur dix localités (Figure m-A), tant en conditions salines (mangroves, mares en connexion avec le lagon) que d'eau douce (rivières, lacs et mares isolées).

- Autres échantillons hors de l'aire d'origine

Initialement, le projet prévoyait de récolter environ la moitié du matériel par le biais de collaborateurs établis à l'étranger. Il est nécessaire de mentionner ici les difficultés et les échecs qui peuvent être rencontrées lorsqu'il s'agit de convaincre, depuis l'autre côté du globe, des personnes tout d'abord inconnues de : capturer une trentaine de tilapias, acquérir et manipuler du formol dans des quantités souvent importantes (e.g. immerger dans du formol 30 spécimens de 200 grammes chacun environ), prélever et fixer des tissus à l'éthanol, numérotter les spécimens individuellement (activités avec lesquelles tous les acteurs de terrain ne sont pas forcément familiers), et enfin, de conditionner de façon adéquate les spécimens et d'expédier poissons et tissus en Europe avec toutes les difficultés financières et souvent légales (douanières et vétérinaires) que cela peut comporter. Quelques localités des Antilles ont cependant pu être échantillonnées grâce à l'exceptionnelle implication de contacts pris en 2008-2009 : une en Jamaïque (informations : Dr. K. Aiken, University of West Indies, Jamaica - prélèvements : S. Motreuil, Biogéosciences) et trois en Guadeloupe (S. DiMauro et H. Magnin, Parc National de Guadeloupe).

De nombreux contacts ont par ailleurs été initiés avec des bureaux d'études, des institutions publiques en lien avec l'environnement et des universitaires, mais n'ont pas eu le même succès. Par exemple, le petit matériel nécessaire à l'échantillonnage ainsi que des instructions détaillées ont été envoyés à un bureau d'étude en Martinique, sans suite du fait de la rareté ou de l'absence d'*O. mossambicus* dans leurs prélèvements à cette période. Par ailleurs, il

était risqué d’investir du temps et des ressources financières dans l’organisation de telles collectes à distances pour de nombreuses régions du globe (notamment une grande partie de l’Asie, e.g. De Silva & Ranasinghe, 1989) où *O. mossambicus* n’est pas l’espèce dominante et où elle aurait donc facilement pu être confondue par des non-spécialistes avec des populations de moindre intérêt pour ce projet.

#### ● Spécimens d’*Oreochromis niloticus* de référence

Des échantillons de référence pour *O. niloticus* ont été obtenus auprès de Dr. Jean-François Baroiller (unité Persyst du CIRAD, Montpellier) en prévision des approches génétiques et morphométriques. Des spécimens d’*O. andersonii* ont également été obtenus mais n’ont pas pu être inclus dans la partie génétique de ce travail.

### **m-2. METHODE D’ECHANTILLONNAGE SUR LE TERRAIN**

Les spécimens sont prélevés à l’aide d’éperviers, de sennes (Mozambique) ou de filets à mailles variables. L’aide de pêcheurs locaux a été fort utile, voire indispensable, tant au Mozambique qu’en Nouvelle-Calédonie. Les spécimens capturés sont euthanasiés dans une solution d’huile essentielle de clou de girofle. En prévision des analyses parasitologiques, les arcs branchiaux du côté droit pour certains individus sont prélevés et isolés dans des tubes Falcon (50 ml) contenant une solution d’éthanol à 80%. Un morceau de nageoire pectorale est systématiquement prélevé et conditionné individuellement dans une solution d’éthanol à 96%. La cavité abdominale est injectée avec une solution de formol à 8% et les spécimens sont placés individuellement dans un sac plastique zippé, numéroté et rempli de formol de façon à ce que la

fixation se déroule lorsque le spécimen est à plat afin d'éviter les torsions du corps. Les sacs contenant les spécimens sont ensuite percés et immergés dans une solution de formol (8%) contenue dans un récipient large et étanche (cf. Figure m-B). Pour le transport aérien, les spécimens sont séchés individuellement et conditionnés dans des contenants étanches pour éviter les émanations et fuites de formol. Ils sont ensuite lavés et immergés dans une solution d'alcool à 80% au laboratoire.

**Figure m-B.** Field daily-life situations illustrating the material organization for the two sampling sessions. In Mozambique (a), formalin-preserved specimens were stored in a large coolbox fixed on the roof of the car and in several “white and red” wide neck drums in New Caledonia (b). Note the use of a picnic area as a field lab in New Caledonia.



### m-3. METHODES MOLECULAIRES

#### -Extractions d'ADN

Etant donnée la sensibilité de la méthode de génotypage employée (AFLP) à la qualité des extraits d'ADN, l'utilisation de kits d'extractions en colonne s'est avérée indispensable afin d'obtenir des extraits d'ADN homogènes et exempts de traces d'inhibiteurs potentiels de PCR (e.g. phénol). Les extractions d'ADN ont été réalisées pour 960 individus à l'aide de kits d'extractions Qiagen® DNeasy Blood and Tissue Kits suivant le protocole du fournisseur. Les extraits d'ADN ont été dosés à l'aide d'un spectromètre NanoDrop ND8000® puis dilués à une concentration de  $25 \text{ ng}.\mu\text{l}^{-1}$ . Ces étapes préliminaires ont été réalisées à la plateforme de génomique environnementale de l'IFR 119, à Montpellier en Janvier 2010.

#### -Marqueurs nucléaires : choix de la technique et méthodologie employée

L'utilisation de marqueurs nucléaires avait pour objectif (*i*) d'estimer la diversité génétique des populations échantillonnées, (*ii*) de déterminer la présence d'hybrides et la nature des possibles patrons d'introgression au Mozambique, (*iii*) d'établir la structure génétique des populations et, dans un second temps, (*iv*) de détecter la présence de portions du génome potentiellement sous l'influence de la sélection. Deux types de marqueurs permettaient de d'obtenir des génotypes pour un nombre important d'individus à des coûts financiers raisonnables : des marqueurs microsatellites (prévus initialement) et des marqueurs AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphism, Vos et al., 1995). Cette dernière technique est basée sur l'amplification sélective de fragments issus d'une étape de digestion enzymatique du génome entier (une description illustrée du principe général de la technique est disponible, par exemple, dans les publications suivantes : Mueller & Wolfenbarger, 1999; Meudt & Clarke, 2007). Au niveau des attendus, la principale différence entre les deux approches est que les microsatellites sont des marqueurs dits *co-dominants* (permettant la distinction entre les individus homozygotes [AA] et les hétérozygotes [Aa]) tandis que les AFLP sont des marqueurs dits *dominants* (pas de distinction possible entre le géotype AA et Aa). C'est-à-dire que seul un « phénotype » est fourni par les AFLP (i.e. l'allèle dominant *A* est présent ou absent), et non l'intégralité de l'information par locus. Un second point de différence est que les AFLP permettent d'extraire de l'information pour un nombre important de loci (plusieurs dizaines) par étape de PCR, contrairement aux microsatellites. En résumé, à effort technique sensiblement équivalent, les AFLP permettent théoriquement de génotyper un plus grand nombre de loci mais avec seulement une information partielle à chaque locus.

La sélection d'un des deux types de marqueurs pour la réalisation de cette étude a fait l'objet de réflexions, étant donné la diversité des questions posées et les deux contextes généraux étudiés (e.g. hybridations *vs.* goulots d'étranglement possibles). A ma connaissance, deux

comparaisons directes AFLP-microsatellites ont été publiées. Campbell et al. (2003) obtiennent à partir d'un cas empirique (écotypes sympatriques de Corégones) des résultats plus nets avec 172 loci AFLP qu'avec six microsatellites. Les auteurs attribuent cette différence au faible nombre de loci microsatellites analysés. Garoia et al. (2007) arrivent à une conclusion similaire en comparant les performances des AFLP (153 loci) et des microsatellites (15 loci) pour décrire la structure génétique de populations de soles communes. Ces résultats peuvent être comparés à une étude théorique récente (Guillot & Carpentier-Skandalis, 2011) qui montre que dans le cadre d'une approche d'assignation bayésienne (e.g. Pritchard et al., 2000), le nombre de marqueurs dominants utilisés (e.g. AFLP) doit être égal à 1,7 fois le nombre de marqueurs co-dominants (e.g. microsatellites) afin d'atteindre une précision similaire. Ce résultat tend donc à soutenir l'intérêt des AFLP étant donné la facilité technique de génotyper 1,7 fois plus de loci AFLP que de microsatellites (tout du moins en règle générale et avec un budget « moyen »). Cependant, le grand nombre de marqueur microsatellites développés et cartographiés chez *Oreochromis* sp. (Lee et al., 2005), permettrait possiblement d'augmenter leur représentativité du génome en les sélectionnant simplement sur chacun des 24 groupes de liaison identifiés. Ceci pourrait augmenter la résolution d'une étude basée sur un nombre de loci microsatellites limité par rapport à des espèces où les microsatellites ne sont pas cartographiés (minimiser la redondance d'information liée au déséquilibre de liaison).

Il n'existe visiblement pas de comparaison directe (sur les mêmes échantillons) des deux types de marqueurs dans un contexte de perte récente de diversité génétique (i.e. introduction avec effet fondateur). Cependant, chez des populations récemment introduites de pinsons domestiques, Hawley et al. (2006) notent une perte de diversité génétique en se basant sur 10 microsatellites alors qu'auparavant Wang et al. (2003) ne détectaient aucune trace d'effet fondateur sur les mêmes populations en se basant sur 363 loci AFLP. Ceci est à mettre en

parallèle avec le fait que la richesse allélique est une variable ignorée pour les marqueurs dominants, alors qu'il s'agit visiblement d'un excellent estimateur d'un goulot d'étranglement récent (voir Dlugosch & Parker, 2008). Par conséquent, l'utilisation des microsatellites pourrait être préférée pour l'estimation de l'intensité des goulots d'étranglement récents (des méthodes d'inférence étant d'ailleurs développées pour des marqueurs co-dominants, Cornuet & Luikart, 1996). Le choix a dû finalement se porter sur les marqueurs AFLP car cette approche permet de génotyper un grand nombre d'individus avec moins de temps et de difficultés techniques que les microsatellites (en théorie), et était déjà utilisée sur des cichlidés au Zoologische Staatssammlung, München. Son avantage potentiel était de fournir suffisamment de loci pour estimer d'éventuels patrons d'introgression non-neutres (e.g. Gagnaire et al., 2009) au Mozambique (la faible fréquence des hybrides dans le système n'a finalement pas permis de tester raisonnablement cette hypothèse).

La procédure utilisée correspond au protocole original de Vos et al. (1995) modifié selon Herder et al. (2008). Une phase de restriction-ligation est effectuée en une seule étape (37°C durant 2h, 16°C durant 8h) avec les enzymes *MseI* (1 unité) et *EcoRI* (5 unités). Des adaptateurs PCR spécifiques aux sites de digestion ont été associés aux fragments avec une unité de Ligase. Une PCR pré-sélective est effectuée avec ajout d'une base à chaque amorce (*EcoRI*-A et *MseI*-C). A cette étape, les produits de PCR sont déposés sur gel afin de vérifier leur qualité. Les amplifications sélectives sont effectuées avec deux bases supplémentaires ajoutées en 3' pour six combinaisons d'amorces (*EcoRI*\*-*MseI*): **ACA**\*-CAA; **ACA**\*-CTT; **ACT**\*- CTC; **ACC**\*-CTG; **ACT**\*- CTG; **ACT**\*-CAC. Les fragments obtenus sont séparés sur un séquenceur à capillaires ABI 3130 (PE Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) avec un marqueur de taille interne (ROX 500 XL). La qualité de chaque *run* est contrôlée visuellement et les fragments sont enregistrés entre 80 et 500 paires de bases (pb) avec un seuil minimal de fluorescence de 50

unités. Sur un total de 960 échantillons, 748 ont fourni des résultats de qualité suffisante pour être inclus dans les analyses ultérieures (soit 22% d'échantillons retirés). La répétabilité des génotypes par locus (Bonin et al., 2004; Pompanon et al., 2005) est estimée à environ 97,8% sur la base de 16 échantillons répliqués de 2 à 9 fois tout au long de la procédure. Les données brutes AFLP ont été obtenues fin Novembre 2010.

#### -Marqueur mitochondrial

J'ai tenu à ajouter à l'étude des marqueurs AFLP les données de séquence d'une portion de l'ADN mitochondrial (ADNmt)<sup>5</sup>. Au moins trois raisons justifiaient ce choix dans le contexte de ce travail. Il est tout d'abord vraisemblable que considérer un seul type de marqueur pour l'étude des cas d'hybridation ne peut offrir qu'une vision partielle des échanges génétiques entre les populations ou espèces en présence (e.g. Aboim et al., 2010). Par conséquent utiliser un second marqueur présentant un mode de transmission différent peut offrir une vision plus complète d'un phénomène d'hybridation (e.g. cas de discordances cyto-nucléaires qui mettent en évidence des événements d'hybridation anciens). Deuxièmement, estimer la diversité des propagules introduites dans le Limpopo est une tâche délicate (voire impossible) à partir de marqueurs anonymes étant donné la possible introgression avec les génomes natifs. L'analyse des séquences de l'ADNmt peut fournir des premières données fiables dans ce contexte. De façon générale, la variation de l'ADNmt des populations envahissantes peut offrir des informations claires sur leur histoire démographique récente (e.g. Ficetola et al., 2008; Vidal et al., 2010). Enfin, une étude de l'ADNmt donnait l'occasion d'ouvrir une fenêtre sur la (les) origine(s) phylogéographique(s) des populations envahissantes. En effet, des séquences mitochondrielles (région contrôle principalement) déjà disponibles et représentant des populations natives (e.g.

---

<sup>5</sup> Approche prévue initialement mais considérée non-prioritaire par la suite.

D'Amato et al., 2007) pourraient permettre de remplacer les populations envahissantes dans le contexte phylogéographique de l'aire d'origine.<sup>6</sup>

L'amplification d'un fragment de 385 pb de la région contrôle est effectuée suivant le protocole de D'Amato et al. (2007) légèrement modifié concernant les conditions de PCR, les conditions suivantes fournissant de meilleurs résultats d'amplification : 5 minutes à 94°C; 35 cycles à 94°C pour 30 s, 58°C pour 40 s, 72°C pour 45 s ; suivit de 5 min à 72°C. Les produits sont purifiés et séquencés par le service de séquençage Macrogen® selon un protocole standard. L'obtention des données pour l'ADNmt de 268 individus a été effectuée au laboratoire Biogéosciences, et s'est achevé en mai 2011.

Les méthodes d'analyse de données (AFLP et ADNmt) seront détaillées dans les sections I-1 et II-1.

#### **m-4. MORPHOMETRIE GEOMETRIQUE**

Une analyse de morphométrie géométrique est mise en œuvre afin de quantifier la morphologie externe du corps. La morphologie externe de 450 spécimens est quantifiée à l'aide 14 points repères ou *landmarks* (Figure m-C) enregistrés à partir de photos numériques avec le logiciel OPTIMAS v6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring MD, USA). La taille centroïde (la racine carrée de la somme des distances au carrées des landmarks au centroïde; Bookstein, 1991) est extraite et utilisée comme estimateur de la taille du corps. Les coordonnées *x-y* sont soumises à une superposition procruste partielle (Rohlf & Slice, 1990) afin de retirer les effets de la taille,

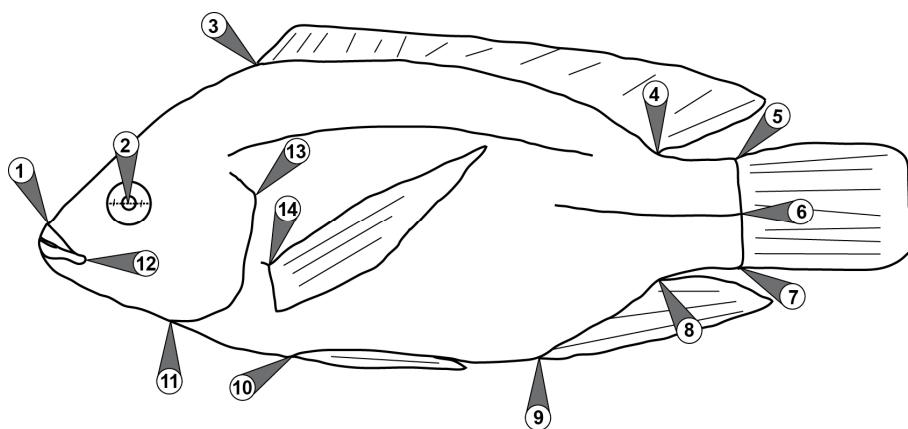
---

<sup>6</sup> Une quatrième raison était de confirmer que les spécimens prélevés en Nouvelle-Calédonie appartenaient bien à *O. mossambicus*, puisque la littérature (Marquet et al. 2003 ; Hytec & Mary 2010) suggérait une forte probabilité de confusion avec *Sarotherodon occidentalis*, le second tilapia introduit sur l'île.

de l'orientation et de la position du spécimen sous l'objectif, et de ne conserver que la variation de forme. Les coordonnées obtenues sont ensuite projetées orthogonalement sur l'espace des formes tangent. Ces étapes sont effectuées sous R (R Development Core Team, 2008) à l'aide des codes de Claude (2008). Les analyses statistiques de ces données seront détaillées dans la section II-2.

Par ailleurs, des images radiographiques (rayons-X) ont été obtenues pour plus d'un millier de spécimens en juillet 2010 au centre de cancérologie Leclerc (CHU, Dijon). A l'heure actuelle (septembre 2011), ces images sont encore en cours d'analyse en utilisant une procédure analogue à celle décrite ci-dessus. Ces résultats ne seront donc pas présentés ici (voir partie « Perspectives » en fin de manuscrit).

**Figure m-C.** The 14 landmarks used for geometric morphometric analyses. Anatomical definitions of landmarks are provided in section II-2.



## m-5. PARASITOLOGIE

La partie parasitologique de ce travail s'est centrée sur les parasites branchiaux (ectoparasites) du groupe des monogènes (Platyhelminthes: Monogenea: Ancyrocephalidae). Au

moins deux raisons justifiaient ce choix. Du point de vue technique, tout d'abord, des données parasitologiques pour les monogènes peuvent être extraites à partir d'un prélèvement des arcs branchiaux stockés dans l'éthanol (cf. section m-2) puis analysées en laboratoire (les dissections sur le terrain étaient dans tous les cas impossibles par manque de temps et de matériel adapté sur place). Ceci évite d'endommager le corps des hôtes également destinés à une analyse morphométrique. Ensuite, d'un point de vue taxonomique, les monogènes branchiaux de cichlidés africains forment un groupe hautement diversifié avec plus de 80 espèces décrites dont une proportion significative est reportée sur *Oreochromis* (Pariselle & Euzet, 2009). Enfin, une relative spécificité de ces parasites est notée au niveau spécifique et leur systématique à récemment été révisée et synthétisée (Pariselle & Euzet, 2009; le Roux & Avenant-Oldewage, 2010). Enfin, les monogènes branchiaux peuvent induire un coût sur la survie ou la reproduction de leur hôte (intérêt #1, détaillé plus haut) (e.g. Sasal, 2006; Xu et al., 2007) et accompagner leurs hôtes hors d'Afrique continentale comme cela est attesté chez des populations introduites de tilapias introduites (intérêt #2) (e.g. Rakotofiringa, 1986; Jimenez-Garcia et al., 2001).

Les arcs branchiaux du côté droit excisés et stockés dans l'alcool (section m-2) sont disséqués sous loupe binoculaire. Les monogènes sont prélevés à l'aide d'une aiguille (ordre de grandeur de taille d'un monogène : 500 µm), placés entre lame et lamelle dans une solution de berlèze qui éclaircit les tissus mous, puis finalement identifiés après observation au microscope suivant les critères relatifs à la morphologie de leurs pièces scléritifiées (Pariselle & Euzet, 2009). Un total de 217 hôtes a été analysé.



# **PARTIE I**

---

## **Aire d'origine**

**Invasions biologiques avec hybridations interspécifiques :  
Génétique des populations et parasitologie des *Oreochromis* du  
Limpopo inférieur**

# **SECTION I-1. Génétique des populations du Limpopo Inférieur (Mozambique)**

## **Manuscrit 1 :**

**Title:** Successive human-mediated hybridization and population structure in the endangered cichlid *Oreochromis mossambicus*

Manuscript in preparation

(To be submitted to *Diversity & Distribution*)

## **ABSTRACT**

**Aim** Invasion-mediated hybridization account among the major and pernicious threats to native biodiversity. The Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* is especially concerned by this phenomenon since recognized by the IUCN as an endangered taxa due to its genetic admixture with invasive congeneric species (*O. niloticus* and *O. andersonii*). Our aim is to: (1) clarify the pattern of the geographic expansion of the invasive species and hybrids, (2) investigate the main factors likely to affect their spread, (3) identify *O. mossambicus* populations not affected by hybridization and (4) estimate their genetic diversity and structure to provide a first conservation genetic baseline.

**Location** The Limpopo River system with a special focus on its lower section (Mozambique) and the Changane River which represents the largest wetland of the drainage.

**Methods** We used mitochondrial DNA sequences and 383 AFLP loci to assess the respective distribution and frequencies of pure and hybrid individuals and to quantify the genetic diversity and structure in both invasive and native species.

**Results** Bayesian assignment tests and species-specific haplotypes distribution both indicate the low frequency of invasive and hybrids genotypes throughout the system but support the extant of interspecific genetic introgression. One invasive species (*O. andersonii*) appears genetically more widespread. *O. mossambicus* populations with no traces of hybridization are recovered and exhibits a low but significant genetic structure.

**Main conclusions** Evidences for only a limited expansion of alien species and their hybrids in the Lower Limpopo contrast with the previous estimates and provide rather hopeful auspices for the conservation of *O. mossambicus*. The spread of invaders is suspected to be constrained by a set of geographic and ecological barriers. The genetic diversity of the invasive species is suspected to determine their respective success. The head of the main Changane drainage and part of the surrounding wetlands were identified as refugial zones for *O. mossambicus* and should therefore receive high conservation priorities.

**Keywords:** Biological invasions, intermittent river, introgression, tilapia, hybridization, wetlands.

## INTRODUCTION

The increasing human influence on earth ecosystems is recognized to cause major alterations in patterns of genetic exchanges between populations and species (Crispo *et al.*, 2011). The translocation of exotic species that freely hybridize with native ones ranks among the most important factors leading to genetic homogenization and species collapse (Rhymer & Simberloff, 1996; Seehausen *et al.*, 2008). This situation therefore implicates challenging issues for conservation biologists (Allendorf *et al.*, 2001). To delineate management strategies, it is necessary to characterize patterns of gene admixture and to identify processes involved in the spread and introgression of the invasive gene pool. Hybridization is recognized as a major force in evolutionary biology (Seehausen, 2004; Nolte & Tautz, 2010) and the evolutionary potential of hybrid lineages has to be fully considered in a conservation context (Prentis *et al.*, 2008). Hybridization can introduce new genetic variation likely to promote local adaptation and large scale expansion of invasive hybrid lineages (e.g. Facon *et al.*, 2005; Nolte *et al.*, 2005). Furthermore, admixture might occur even if there is selection against the non-native parent in the new environment (Verhoeven *et al.*, 2011) or if hybrid fitness rapidly decreases over hybrid generations (Muyllefeld *et al.*, 2009). Genetic admixture is therefore likely to vary according to intrinsic outbreeding depression and extrinsic environmental effects, leading to a broad range of introgression patterns across hybrid systems. Verhoeven *et al.* (2011) predict that introgression might occur if heterosis or hybrid vigor tends to compensate the ‘hidden’ inbreeding cost inherent to locally adapted populations. Unfortunately, heterosis and inbreeding cost are generally difficult to estimate in the wild. Therefore, potential proxies of heterosis and inbreeding costs need to be described and discussed to obtain a better picture.

Allendorf *et al.* (2001) distinguished three categories of human-mediated hybridization according to the frequency and the expansion of hybrids within the native species’ range: (1)

hybridization without genetic introgression (i.e. the hybrids beyond the F<sub>1</sub> generation are nonexistent), (2) hybridization with widespread introgression but pure populations persist, and (3) complete admixture. The outcome of an invasion-mediated hybridization towards one of these three categories will be constrained by two interacting sets of barriers. The first set includes geographical and ecological constraints to range expansion on aliens, as in any cases of invasions (see Blackburn *et al.*, 2011 for a recent synthesis). Once the native and invasive species in sympatric conditions, the second set consists in reproductive barriers and in the fitness of the hybrids that will determine the prevalence and the fate of admixed genotypes and the mutual permeability of the genomes (Mallet, 2005). Estimates of the frequency, composition and expansion dynamics of hybrids are therefore necessary baseline data for assessing the future of a hybrid system and to deduce management policies.

Critical cases of human mediated invasion associated to interspecific hybridization are widespread in the so called tilapias, a paraphyletic and diverse group of mostly African cichlids. Natural interspecific hybridization is a pervasive phenomenon in tilapias (Agnèse *et al.*, 1998; e.g. Rognon & Guyomard, 2003; Schliewen & Klee, 2004) that recently gained a dramatically increased potential after numerous worldwide introductions of several species for aquacultural purposes, most of them belonging to the genus *Oreochromis* (Canonico *et al.*, 2005). *Oreochromis* species are very popular species intensively used in aquaculture of tropical and subtropical regions across the world since the 1950s. Anthropogenic translocations of *Oreochromis* within Africa were reported to induce several cases of interspecific hybridization posing severe threats to the genetic integrity of native local species (e.g. Gregg *et al.*, 1998; Moralee *et al.*, 2000; Nyingi & Agnese, 2007; Angienda *et al.*, 2011). Aquaculture performances and yields of many domestic native *Oreochromis* populations breed in Africa became significantly lower than wild populations due to inadequate management practices (Gregg *et al.*,

1998; Brummett, 2008; Brummett & Ponzoni, 2009). Thus, conservation genetics of native *Oreochromis* populations is an issue of high importance for the development of new strains in the future as well as for the preservation of the African freshwater communities.

The present study focuses on the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*, a species classified as “near threatened” on the IUCN Red List because of hybridization with the widely introduced *Oreochromis niloticus* (Cambray & Swartz, 2007), a species that is native to the nilo-sudanic region. The native range of *O. mossambicus* comprises several drainages of south-eastern Africa delineated by the Eastern Cape (South Africa) southward to part of the Zambezi basin in Mozambique northwards. It includes the Limpopo basin and several coastal rivers (Skelton, 2001).

### **Invasion history of the Limpopo System**

The Limpopo River system provided the most extensive evidences for the spread of *O. niloticus* and its hybridization with native *O. mossambicus* (Moralee *et al.*, 2000; van der Waal & Bills, 2000; D'Amato *et al.*, 2007; van der Bank & Deacon, 2007). *O. niloticus* was probably introduced in the Upper Limpopo system (Zimbabwe) in the early 1990s from a population previously established in Lake Kariba. Several dams in the Upper Limpopo System were stocked with *O. niloticus* in some cases with several tens of thousands specimens (Tweddle & Wise, 2007). Its first record in the Upper Limpopo (South Africa) was in 1996 (van der Bank & Deacon, 2007). Later field collections (1998) combined with allozyme analyses revealed the presence of interspecific hybrids (Moralee *et al.*, 2000) which was later confirmed by D'Amato *et al.* (2007). In addition, a second independent *O. niloticus* introduction occurred along with the floods in 2000 leading to the escape of *O. niloticus* specimens from a fish farm located in the Lower Limpopo River (Schneider, 2003).

*O. niloticus* nonetheless is not the first alien *Oreochromis* species having spread in the Limpopo System. In 1973, *Oreochromis andersonii* specimens originating from the Okavango River are known to have been released in the Upper Limpopo (Bostwana; de Moor & Bruton, 1988). Its genetic persistence has been confirmed by *O. andersonii* haplotypes recovered in the Upper Limpopo (D'Amato *et al.*, 2007).

### **Location and objectives of the study**

All previous genetic studies mainly concerned samples collected in the Upper Limpopo close to the known zones of introductions (Moralee *et al.*, 2000; D'Amato *et al.*, 2007; van der Bank & Deacon, 2007) with addition of some minor samples in the Olifants' River (South Africa, D'Amato *et al.*, 2007), providing thus an incomplete picture of the genetic situation of the whole system. Unfortunately, there are no genetic data of the *Oreochromis* populations of the lower reaches of the Limpopo although this zone is of major concern for the conservation of *O. mossambicus* because it potentially shelters genetically pure population. Moreover, there are no fine-grained genetic data concerning the autochthonous structure and diversity of pure *O. mossambicus* populations at a local scale.

The Changane drainage is the main tributary of the Lower Limpopo and an intermittent dry land river which represents the largest and least disturber wetland of the Limpopo system (Hugues & Hugues, 1992). Most of the time and especially during the dry season, the Changane River mainstream is reduced to a succession of disconnected ponds with often extreme eutrophic and/or saline conditions, the latter related to soil factors (Losseau *et al.*, submitted). The upper reaches of the Changane River are connected to a seasonally endorheic basin (i.e. closed drainage) only connected to the rest of the system during rare and infrequent major (i.e. decennial) flood events. During dry periods, local soil conditions favor the formation of highly

saline swamps in the central part of the system, exposing the freshwater fauna to extreme ecological conditions (salinity level sometime reaching ca. 25 g.l<sup>-1</sup>; Losseau *et al.*, submitted). The drainage is also surrounded by permanent lakes isolated from the mainstream, which collectively represent a substantial area (Hugues & Hugues, 1992). This peculiar hydrological situation therefore provides a geographically fragmented and ecologically heterogeneous system and constitutes an ideal opportunity to shed light on the factors determining the spread of neozoa and associated hybrids genomes in the Limpopo system as well as to identify potential *O. mossambicus* populations of high conservation values.

In this study, we combine mitochondrial DNA sequence data with several hundred nuclear AFLP markers, in order (1) to assess the invasion of *Oreochromis niloticus* in the Changane-Lower Limpopo *O. mossambicus* metapopulation as a model system to characterize the spread of alien and hybrid genomes across geographical and ecological barriers, (2) to quantitatively describe the genetic variation of the invasive populations and investigate the main factors likely to affect their spread, (3) to identify *O. mossambicus* populations not affected by hybridization, and (4) to estimate the autochthonous diversity and population structure among unaffected *O. mossambicus* populations to provide a first baseline for the conservation genetics of this endangered species.

## METHODS

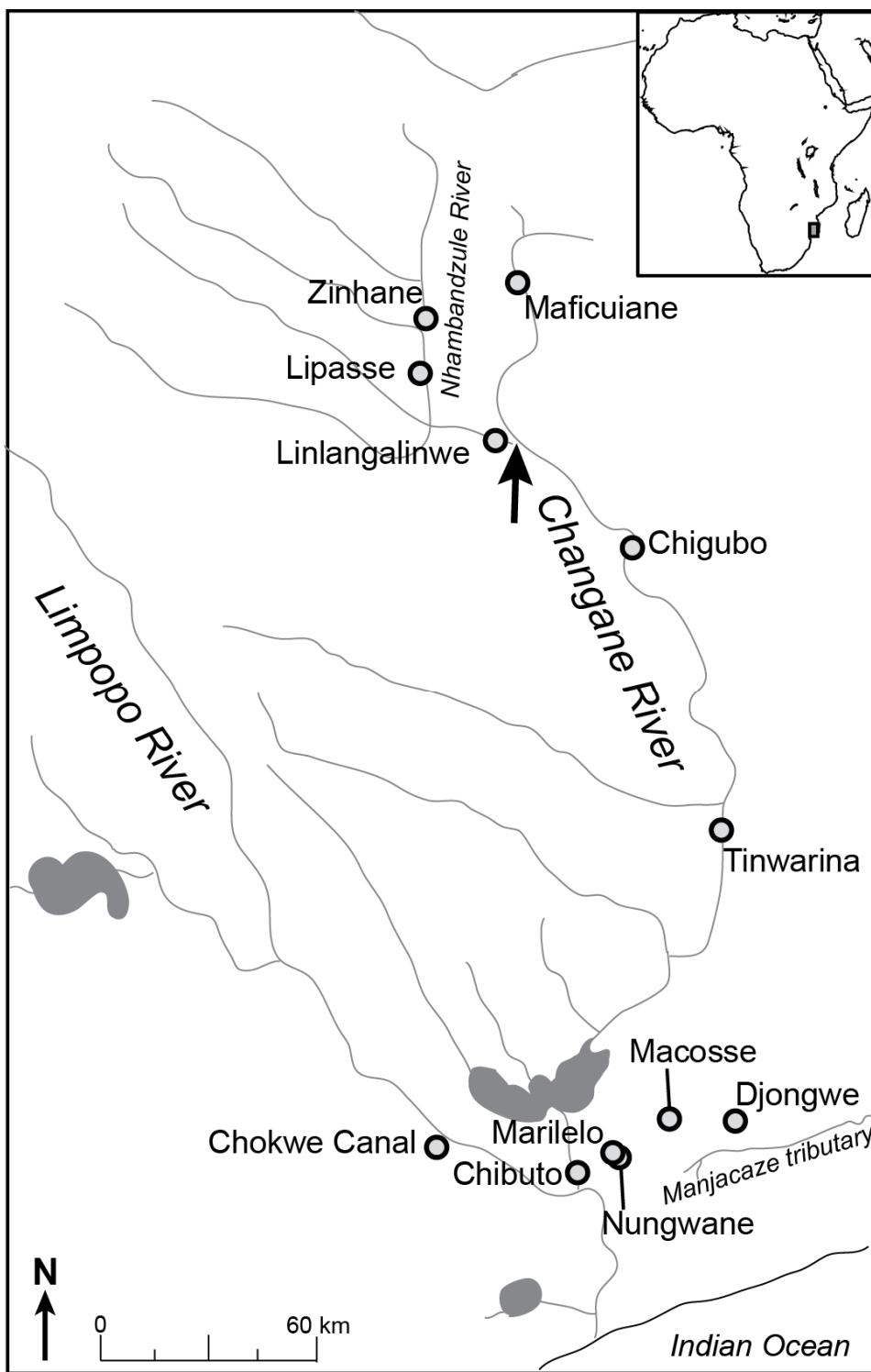
### **Sampling procedure and DNA isolation**

Specimens were collected along the Changane drainage and in the Limpopo between 2006 and 2009. A total of 13 sampling sites were selected (Figure 1; Table 1). Sampling stations were selected in order to provide landmarks for the progression of aliens and hybrids across the region. Variable ecological conditions, degree of hydrological isolation from the Limpopo and

phenotypic insights for the possible presence of alien *Oreochromis* (Losseau *et al.*, submitted) were taken as selection criteria. One site was chosen in the main Limpopo drainage (Chokwe Canal), which is supposedly invaded. Another site is located in the lower reaches of the Changane River (Chibuto) close to its junction with the Limpopo, and also supposedly invaded. Four sampling sites representing endorheic lakes located along the Changane (Nungwane, Marilelo, Macosse, Djongwe) were also sampled. Three more stations are located along the Changane River (Tiarina, Chigubo, Maficuiane) were selected along the Changane River. The first two stations, Tiwarina and Chigubo, are respectively characterized by brackish (up to ca. 7 g.l<sup>-1</sup>) and saline waters (up to ca. 25 g.l<sup>-1</sup>) due to local soil conditions (Losseau *et al.*, submitted). The latter station (Maficuiane) is an ephemeral restwater pool situated about 30 km down the river origin. Finally, three sampling stations, all also ephemeral, were chosen within the headwater endorheic system. Zinhane and Lipasse stations are located on the Nhambanzule River, which runs from the North into the central wetlands of the Banhine National Park (BNP). The Linlangalinwe station represents a pool located on the Chefyu River, the channel connecting the BNP and the Changane main channel during major flood periods. In addition, pure-breed *O. niloticus* specimens from a laboratory strain (CIRAD unit, Montpellier, France) were included in the analysis as *O. niloticus* reference samples.

Specimens were euthanatized with an overdose of clove oil and a pectoral fin-clip was taken and preserved in 96% ethanol. Total genomic DNA was extracted using Qiagen DNeasy® Tissue Kit according to the manufacturer's protocol and set adjusted to a standard concentration of 25 ng. $\mu$ l<sup>-1</sup>.

**Figure 1.** Locations of the 13 sampling localities in the Lower Limpopo-Changane System. The black arrows point the zone of hydrological disconnection of the Banhine endorheic system from the Changane River mainstream.



### **Mitochondrial DNA sequencing**

For 176 individuals, we amplified and sequenced a 385 bp fragment of the mtDNA control region based on the protocol of D'Amato *et al.* (2007). PCR conditions were: 5 min at 94°C; then 35 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 40 s, 72°C for 45 s, followed by 72°C for 5 min. Purified PCR fragments were sequenced by the Macrogen® Sequencing Service using a standard procedure.

### **AFLP genotyping**

We followed a version of the Vos *et al.* (1995)'s original protocol as modified according to Herder *et al.* (2008). DNA fingerprint for 376 individuals were generated for six restrictive primer pair combinations (EcoRI-ACA/MseI-CAA; EcoRI-ACA/MseI-CTT; EcoRI-ACT/MseI-CTC; EcoRI-ACC/MseI-CTG; EcoRI-ACT/MseI-CTG; EcoRI-ACT/MseI-CAC). Fragments were separated on an ABI 3130 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) with an internal size standard (ROX 500 XL). The quality of each run was visually inspected. Fragments were scored for each primer combination between 80 and 500 bps using GeneMapper® v.4.0 with a fluorescence detection threshold of 50 units. To reduce fragment-size homoplasy the maximum bin width and the minimum distance between two adjacent bins were respectively fixed at 0.4 and 0.5 bp (Herder *et al.*, 2008), a combination of values providing a low the genotyping error rate in our dataset (see below).

Genotyping error rate was estimated using the ratio of mismatches to the total number of replicated markers (Bonin *et al.*, 2004; Pompanon *et al.*, 2005) for a total of 16 replicated samples during the entire procedure (mean: 3.9 replicates per sets; range: 2 – 9 and 62 total replicated samples representing 16.2% of the total sample). The final repeatability was 97.8% for

423 polymorphic loci (range 56 – 89 loci per primer combinations, see supplementary material S1).

**Table 1.** Sampled localities and summary statistics of genetic diversity.

Locality	Coordinates	AFLP			MtDNA						
		N	He	SD-He	Species	N	Nhap	Hd	SD-Hd	$\pi$	SD- $\pi$
Djongwe	S24°31'22.2" E33°56'29.4"	17	0.0607	0.0055	<i>O. mossambicus</i>	11	6	0.7273	0.1444	0.0128	0.0035
Macosse	S24°30'37.3" E33°45'10.2"	27	0.0408	0.0043	<i>O. mossambicus</i>	12	3	0.7121	0.0691	0.0092	0.0025
Nungwane	S24°37'25.9" E33°35'26.6"	25	0.0446	0.0045	<i>O. mossambicus</i>	12	6	0.8788	0.0595	0.0107	0.0029
Marilelo	S24°37'33.4" E33°35'16.6"	27	0.0427	0.0042	<i>O. mossambicus</i>	9	5	0.8611	0.0872	0.0104	0.0030
Zinhane	S22°20'19.3" E33°04'04.3"	37	0.0460	0.0044	<i>O. mossambicus</i>	12	6	0.8485	0.0744	0.0085	0.0023
Lipasse	S22°28'18.4" E33 02'30.0"	28	0.0412	0.0044	<i>O. mossambicus</i>	13	4	0.7179	0.0888	0.0083	0.0022
Linlangalinwe	S22°39'06.1" E33°17'21.2"	24	0.0448	0.0045	<i>O. mossambicus</i>	13	8	0.8590	0.0886	0.0077	0.0020
Maficuinae	S22°13'02.6" E33°19'33.4"	27	0.0363	0.0040	<i>O. mossambicus</i>	12	4	0.7121	0.1053	0.0065	0.0017
Chigubo	S22°56'49.0" E33°40'39.0"	38	0.0455	0.0043	<i>O. mossambicus</i>	13	6	0.8333	0.0815	0.0075	0.0020
					<i>O. andersonii</i>	1	1	—	—	—	—
Tiwarina	S23°43'27.0" E33°54'43.7"	33	0.0434	0.0046	<i>O. mossambicus</i>	12	4	0.5606	0.1540	0.0051	0.0014
					<i>O. andersonii</i>	1	1	—	—	—	—
Chibuto	S24°40'25.6" E33°30'13.1"	42	0.0457	0.0045	<i>O. mossambicus</i>	23	9	0.8696	0.0407	0.0190	0.0046
	—	—	—	—	<i>O. niloticus</i>	4	1	0	0	0	0
Chokwe Canal	S24°38'07.0" E33°04'37.9"	28	0.0599	0.0052	<i>O. mossambicus</i>	3	3	1.0000	0.2722	0.0106	0.0059
		—	—	—	<i>O. niloticus</i>	17	1	0	0	0	0
		—	—	—	<i>O. andersonii</i>	8	5	0.8571	0.1083	0.0116	0.0035
Cirad	—	23	0.0414	0.0043	<i>O. niloticus</i>	—	—	—	—	—	—

He: Gene diversity (AFLP);  
Nhap: number of haplotypes; Hd: haplotype diversity;  $\pi$ : nucleotidic diversity  
SD: standard deviation

## Data analyses

### mtDNA data analyses

MtDNA sequences were aligned using the ClustalW algorithm (Thompson *et al.*, 1994) in BioEdit (Hall, 1999) and corrected manually. *Oreochromis* control region haplotypes already revealed a strong species level taxonomic clustering under parsimony (D'Amato *et al.* 2007). Thus, species assignments of our new haplotypes were obtained by plotting them in a haplotype genealogy including already published sequences (Supplementary Material S2) using the functions *haplotype* and *haploNet* of the *pegas* R package (Paradis, 2010). We also used this approach to control that the haplotypes attributed to the same species *a posteriori* clusters

together in homogeneous and individualized haplotype groups (Supplementary Material S3) before performing within-species analyses. Haplotype and Nei (1987)'s nucleotide diversity were computed by locality and species (when a mixture of species haplotypes is recovered for a given locality, see Results). A hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) was performed to evaluate levels of differentiation. To test if lacustrine populations represent a distinct genetic group relatively to riverine ones, we used a two level model: the first level opposes riverine to lacustrine localities and the second one considers variation between localities within the first level. AMOVA was performed using the *amova* function of the *pegas* package (Paradis 2010) and significance was assessed after 10000 permutations.

#### *AFLP data analyses*

Since our dataset includes localities sampled over several years (i.e. Nungwane, Marilelo, Chibuto, Macosse), a preliminary analysis was performed to assess for significant chronological differentiation in computing  $F_{ST}$  between years for each sampling site in AFLP-SURV (Vekemans *et al.*, 2002) using the Zhivotovsky (1999)'s Bayesian procedure and a uniform prior distribution to estimate allele frequencies from dominant markers. No significant  $F_{ST}$  were detected (all within site  $F_{ST} = 0$ ) and samples of each locality from different years were therefore pooled..

AFLP-SURV was also used to estimate nuclear genetic diversity per sampling locality using the same procedure. Two different approaches were used to identify hybrids or parental status of individuals. The Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000) takes into account dominant data (Falush *et al.*, 2007) and was used to test for significant patterns of clustering. Analyses were run three times for each number of clusters ( $K$ ) from 1 to 13 using a 100 000 steps burn-in period followed by 400 000 MCMC repetitions. We did not use the clustering model considering sample group information (the LOCPRIOR option, Hubisz *et*

*al.*, 2009) since we assumed the potential co-occurrence of individuals from several genetic clusters within the same locality. The optimal  $K$  was determined from the log probability of data given  $K$  using the  $\Delta K$  criteria (Evanno *et al.*, 2005). Since three *Oreochromis* species were recovered in the Limpopo drainage from mtDNA (D'Amato *et al.*, 2007), we also checked the results provided by STRUCTURE for  $K = 3$  in order to detect a geography-related structure or a correlation with *O. andersonii* haplotypes for the individual posterior probability of assignment to the third cluster. Results from STRUCTURE were compared to those of NEWHYBRIDS (Anderson & Thompson, 2002; Anderson, 2008) that compute the posterior probabilities for each individual to be assigned to the following classes: *O. mossambicus*, *O. niloticus*, first generation hybrids ( $F_1$ ), second generation hybrids ( $F_2$ ) and backcrosses with each parental species ( $BC_{mossambicus}$ ,  $BC_{niloticus}$ ). This program was run with uniform priors and with 100 000 burn-in steps followed by 300 000 iterations to estimate individual posterior probabilities.

To evaluate population structure within *O. mossambicus* localities likely unaffected by other species, we used a subset of the original dataset including only populations for which no clues for hybridization were detected in the prior analyses (i.e. eight populations, 213 individuals and 277 polymorphic loci). Genetic differentiation was measured by calculating pairwise  $F_{ST}$  from allelic frequencies computed with the Bayesian method (Zhivotovsky, 1999) in AFLP-SURV (Vekemans *et al.*, 2002). The significance of  $F_{ST}$  was determined based on 10 000 permutations with Bonferroni correction for multiple tests. As for mtDNA (see above), we performed an AMOVA based on a simple matching distance matrix among individuals. A STRUCTURE analysis was finally performed using a similar procedure as for the full dataset (see above). Here, following the recommendations of Hubisz *et al.* (2009), we used both the new (with LOCPRIOR) and the original (no LOCPRIOR) clustering models.

Finally we tested for a correlation between AFLP and mtDNA differentiation within *O. mossambicus*. For mtDNA, pairwise matrix of  $\Phi_{ST}$  were computed between *O. mossambicus* localities using the *amova* function in *pegas* (Paradis, 2010) according to Excoffier et al. (1992). The similarity between this matrix and the pairwise  $F_{ST}$  matrix was tested using Mantel test associated to 10000 permutations and performed in the *ape* R package (Paradis *et al.*, 2004).

## RESULTS

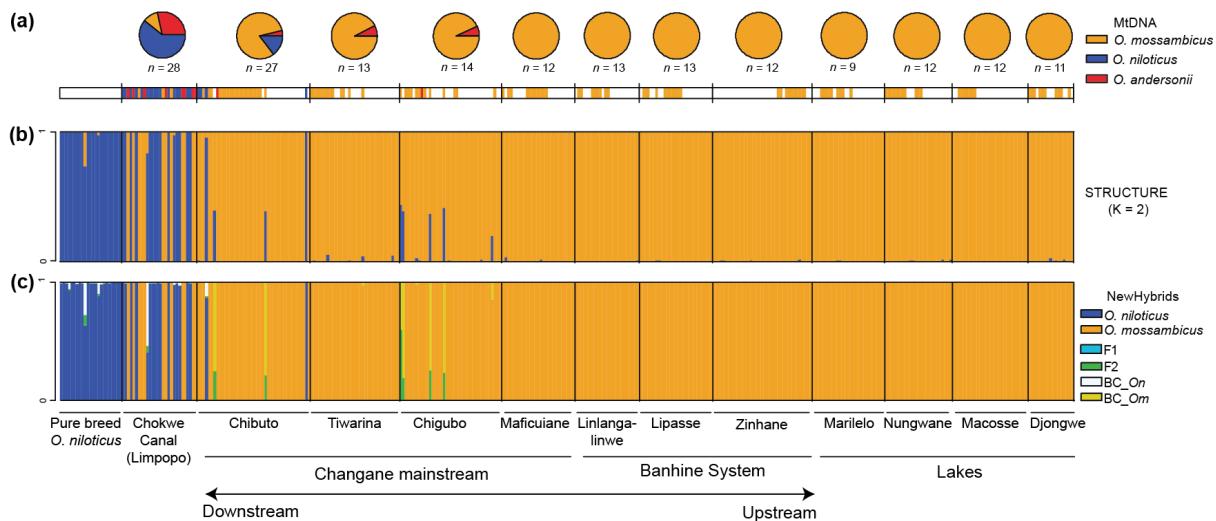
### Distribution of mtDNA haplotypes

MtDNA analysis revealed the presence of haplotypes from three *Oreochromis* species in the Limpopo / Changane system (Figure 2a). *O. mossambicus*, *O. niloticus* and *O. andersonii* haplotypes co-occur in the Limpopo River (Chokwe) and in the Lower Changane River close to the connection with the Limpopo (Chibuto). *O. mossambicus* mtDNA is the most frequent across localities (range: 81-100%) except in the Limpopo River where *O. niloticus* haplotypes are dominant (61%). *O. andersonii* haplotypes were recovered in the Limpopo and in the lower and middle reaches of the Changane River and absent elsewhere. Six different haplotypes were recovered in the *O. andersonii* sample (11 individuals; accession numbers: xx1-xx6) while a single haplotype was found for *O. niloticus* (21 individuals; accession number: yy). This haplotype differs from the three haplotypes previously recovered in the Limpopo (Fig. 3a). The set of *O. andersonii* haplotypes of Chokwe Canal exhibits a high diversity falling within in the range of values found for native *O. mossambicus* populations (Table 1). Three of the *O. andersonii* haplotypes were previously recovered in the Limpopo Drainage and three others are new ones (Fig. 3b).

Twenty-five *O. mossambicus* haplotypes were recovered from a total of 151 individuals (accession numbers: zz1-zz25). The AMOVA performed on sequence data indicated no

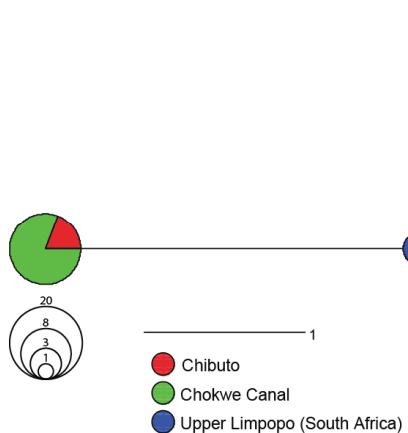
significant differentiation between lacustrine and riverine *O. mossambicus* populations (variance explained = 3.65%;  $\Phi_{CT} = 0.0004$ ;  $P = 1$ ) but a significant population divergence between localities although this level explained a rather weak proportion of the

**Figure 2.** Distribution of haplotypes and AFLP genotypes in the Changane-Lower Limpopo system. (a) Pie charts of haplotype per species and individual correspondence of the haplotypes with the rest of the figure. (b) STRUCTURE barplot for  $K = 2$  showing the assignment values of individuals from the 13 localities sampled in the Lower Limpopo-Changane system. The first group is reference *O. niloticus* samples. (c) Same plot obtained with NEWHYBRID with two possible parental and four hybrid categories.

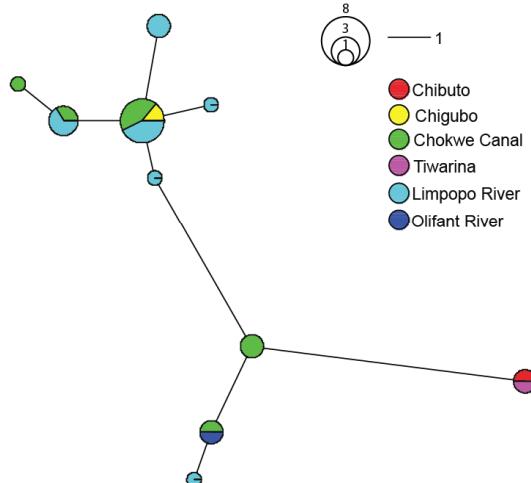


**Figure 3.** Haplotype genealogies of the two alien species in the Limpopo System (preliminarily identified as *O. niloticus* or *O. andersonii* respectively by comparison to Genbank sequences, see Methods).

(a) *Oreochromis niloticus*

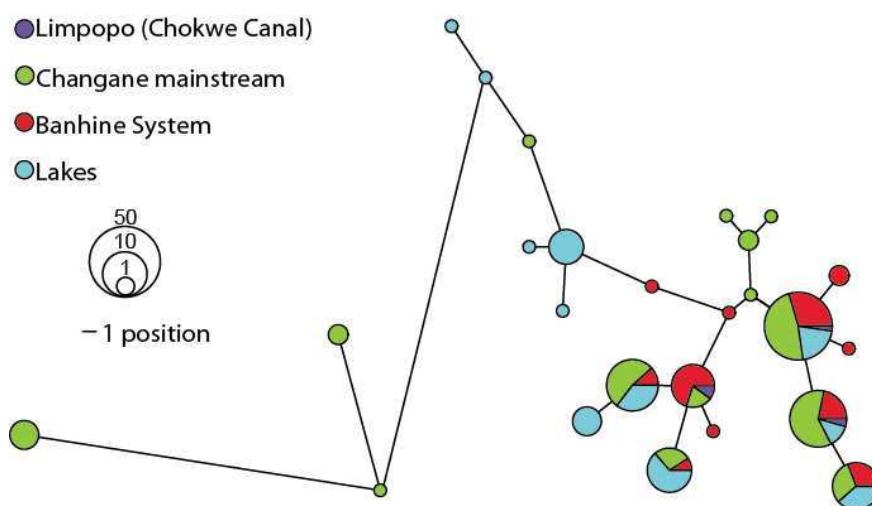


(b) *Oreochromis andersonii*



total molecular variance (12.72%;  $\Phi_{CT} = 0.0012$ ;  $P = 0.001$ ). The haplotype genealogy illustrates this relative genetic homogeneity (Fig. 4) showing that the most common haplotypes occur throughout the system (Lakes, Changane mainstream and endorheic drainage). The Djonwe locality appears as a notable exception since most of the sequenced individuals (10/11) bear haplotypes not recovered elsewhere (Supplementary Material S4).

**Figure 4.** Haplotype genealogy of *O. mossambicus* haplotypes found within the Changane-Lower Limpopo system (preliminarily identified as *O. mossambicus* by comparison to Genbank sequences, see Methods).



### Prevalence and patterns of hybridization

AFLP data analyzed with STRUCTURE indicated that the most likely number of clusters is  $K = 2$  according to the  $\Delta K$  criteria (Supplementary Material S5). The reference *O. niloticus* individuals and part of the samples from Chokwe Canal and Chigubo are clearly assigned to the first cluster (Fig. 2b). Individuals of the second cluster (i.e. *O. mossambicus* genotypes) dominate the samples from the upper and middle reaches of the Changane River and the lakes. Clear-cut evidences for admixed nuclear genotypes were only found at Chibuto and Chigubo at low frequencies (2/42 individuals [5%] and 5/38 individuals [13%] respectively). The NEWHYBRIDS

analysis reveals a similar pattern as STRUCTURE (Fig. 2c) and indicates that the previously identified admixed genotypes are *O. mossambicus* backcrosses or later generation *O. mossambicus*-dominant hybrids except for one individual (Chokwe Canal) which is likely an *O. niloticus*-dominated hybrid genotype. To sum-up, localities likely hosting allochthonous species and hybrid individuals are found in the Limpopo (Chokwe Canal) and in the lower and middle reaches of the Changane sub-drainage (Chibuto, Chigubo). Not surprisingly, the highest values of gene diversity were found for these four samples.

Individual comparisons of AFLP based assignments and mtDNA (Fig. 2 a-c) reveal three individuals exhibiting an *O. mossambicus* nuclear genotype with an *O. niloticus* mitochondrial haplotype. All three occur in the Limpopo (Chokwe Canal,  $N = 2$ ) and in the Lower Changane (Chibuto,  $N = 1$ ). STRUCTURE results with  $K = 3$  (not shown) indicate that individuals bearing an *O. andersonii* haplotype does not tend to be more likely assigned to the third – hypothetically *O. andersonii* – cluster than specimens with an *O. mossambicus* haplotype (Student *t*-test, d.f. = 133,  $P = 0.79$ ).

### AFLP genetic structure within *O. mossambicus*

Genetic structure within *O. mossambicus* was evaluated including the eight localities showing no trace of alien genotypes. Pairwise  $F_{ST}$  (Table 2) reveal no differentiation between the four riverine localities (all  $F_{ST} = 0$ ). The Macosse lake is also no significantly differentiated from the rest of the system (all  $F_{ST} \leq 0.0011$ ). The three other lacustrine localities generally exhibit strong levels of differentiation with all or part of the system (Table 2). Especially, the Djongwe lake exhibits strong levels of differentiation with all the others localities except with the two lakes Macosse and Nugwane. A Mantel test supported a significant correlation between pairwise mtDNA  $\Phi_{ST}$  and AFLP  $F_{ST}$  matrices ( $Z = 0.018$ ;  $P = 0.014$ ). However, this correlation became

unsignificant once the most divergent locality (Djongwe) was removed ( $Z = 0.003$ ;  $P = 0.210$ ) indicating that the only highly congruent differentiation between nuclear and mitochondrial markers concerns Djongwe Lake.

The AMOVA supported that variation in the AFLP dataset is not significantly structured according to a lacustrine-riverine distinction (0.59% variation explained,  $F_{CT} = 0.0002$ ,  $P = 1$ ). The between locality level also explained a weak proportion of the variance (0.86%) but remained significant ( $F_{ST} = 0.0004$ ,  $P = 0.006$ ).

The STRUCTURE analyses with and without the LOCPRIOR option provide different but congruent results. For both approaches the  $\Delta K$  criteria reveals that the most likely number of clusters equals 2 (without LOCPRIOR,  $\Delta K = 163.15$ , with LOCPRIOR  $\Delta K = 0.90$  at  $K = 2$ , Supplementary Material S6 and S7). However, the rather weak gain of likelihood relative to  $K = 1$  with the LOCPRIOR model tends to indicate the absence of clustering in the data. This is supported by the distribution of the posterior probabilities of individual assignments ( $Q$ ) at  $K = 2$  revealing no patterns of clustering for both models (Supplementary Material S8). Additional inspection of individual  $Q$  with  $K$  from 3 to 6 does not indicate any clustering pattern in the *O. mossambicus* samples (Supplementary Material S9).

**Table 2.** Pairwise AFLP  $F_{ST}$  comparison within the *O. mossambicus* populations preserved from hybridization with alien *Oreochromis* species.

	Maficuiane	Linlangalinwe	Lipasse	Zinhane	Macosse	Marilelo	Nungwane	Djongwe
Maficuiane								
Linlangalinwe	0.0000							
Lipasse	0.0000	0.0000						
Zinhane	0.0000	0.0000	0.0000					
Macosse	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010				
Marilelo	0.0019	0.0000	0.0014	0.0047**	0.0011			
Nungwane	0.0046**	0.0000	0.0043**	0.0060**	0.0005	0.0000		
Djonwge	0.0072**	0.0030*	0.0037*	0.0070**	0.0011	0.0031*	0.0000	

Values come from AFLP-SURV.

---

\* Significant at  $P = 0.05$  - \*\* Significant at  $P = 0.01$

---

## DISCUSSION

Our results show that interspecific hybridization in the Limpopo system may lead to occasional introgression with many pure *O. mossambicus* populations remaining in the upper part of the Changane River and in surrounding lakes. This situation would fit with the case #2 defined by Allendorf *et al.* (2001). The presence of hybrids in the Lower Limpopo and in the Lower and Middle reaches of the Changane River are in accordance with previously published results for the upper part of the Limpopo (Moralee *et al.*, 2000; D'Amato *et al.*, 2007; van der Bank & Deacon, 2007). Our study brings a more comprehensive view of this study system for invasion-mediated hybridization and its dynamic in evidencing heterogeneous patterns of genetic admixture between localities. With regards to what was expected from previous genetic investigations (Moralee *et al.*, 2000; D'Amato *et al.*, 2007; van der Bank & Deacon, 2007), the most striking aspect of our results is the low occurrence of hybrids in the Lower Limpopo, in spite of the strong exposition of this system to hybridizing allochthonous species. This may be related to several factors such as date and patterns of alien *Oreochromis* sp. introductions, distance from the sites of introduction and local ecological conditions.

### Patterns of hybrid expansion

MtDNA indicate at least two events of alien mtDNA lineages dispersal in the Lower Limpopo/Changane. The first one involved *O. andersonii*, a species released in 1973 ca. 600 km upstream to the Changane River in the upper Limpopo drainage (de Moor & Bruton, 1988).

Therefore, the *O. andersonii* haplotype expansion likely occurred downstream in the Limpopo River and then again upstream until the Middle reaches of the Changane River (Chigubo). Second, *O. niloticus* mtDNA introgression in the *O. mossambicus* gene pool is also evidenced by few individuals in the Limpopo as well as in lower Changane. Hybridization events leading to cytonuclear discordances is not rare in oreochromine cichlids (Rognon & Guyomard, 2003; Schliewen & Klee, 2004) and can probably occur over contemporary time-scales (Nyingi & Agnese, 2007). The peculiarity of the Limpopo system is that *O. mossambicus* experienced two recent successive events of partial (and possibly ongoing) mtDNA introgression. Several factors are likely to promote cytonuclear discordance in tilapia such as unidirectional hybridization or unbalanced sex-ratio of hybrids generations (see Rognon & Guyomard, 2003). *O. mossambicus* x *O. niloticus* backcrosses involving female *O. niloticus* are reported in experimental conditions (Mateo *et al.*, 2004) and could have led to the observed pattern in the wild. The fact that mtDNA introgression also occurred from *O. andersonii* to *O. mossambicus* suggests some similarities in the processes of expansion and introgression for both alien species, such as potential female-biased dispersal and hybridization.

*O. niloticus* haplotypes previously recovered in the upper Limpopo (D'Amato *et al.*, 2007) apparently did not apparently reach the lower part of the system where a different haplotype is found. Interestingly, this upstream *vs.* downstream geographic segregation of the *O. niloticus* haplotypes is interpretable with regards to the two reported introduction events respectively in the Upper (Tweddle & Wise, 2007) and in the Lower (Schneider, 2003) Limpopo. MtDNA therefore probably reflects the historical and geographical patterns of *O. niloticus* introduction in the Limpopo system. *O. niloticus* mtDNA, although found at high density close to its zone of introduction in the upper Limpopo, is less widespread than *O. andersonii* mtDNA. At least three

factors constraining the spread of *O. niloticus* relatively to *O. andersonii* may have contributed to this differential pattern.

First, the *O. andersonii* introduction likely precedes by at least 15 years the two recognized releases of *O. niloticus* (de Moor & Bruton, 1988; van der Waal & Bills, 2000; Schneider, 2003). As a consequence, the rarity of *O. niloticus* in the system may simply correlate with the little time since introduction.

Second, much higher mtDNA diversity was observed in *O. andersonii* indicating that this species did not experience a genetic bottleneck as severe as for *O. niloticus*. This agrees with the fact that *O. andersonii* was introduced from a population directly coming from its native range (Okavango Drainage; de Moor & Bruton, 1988) supposedly more diverse than the already translocated invasive populations (Upper Limpopo) or the aquaculture strain (Lower Limpopo) from which *O. niloticus* established (Schneider, 2003; Tweddle & Wise, 2007). MtDNA diversity therefore suggests a higher propagule pressure for *O. andersonii* than for *O. niloticus* which is not surprising given the proximity between the *O. andersonii* and *O. mossambicus* native ranges (see e.g. D'Amato *et al.* 2007). However, a single introduction is documented for *O. andersonii* while two introductions occurred for *O. niloticus* (de Moor & Bruton, 1988; Schneider, 2003; Tweddle & Wise, 2007). A high propagule pressure coupled with genetic admixture between invasive lineages coming into contact is often recognized as a factor enhancing invasive and adaptive potentials through the formation of new allelic combinations between several amalgamated invasive lineage (Kolbe *et al.*, 2004; Facon *et al.*, 2005; Lockwood *et al.*, 2005). For example, this factor likely favored the invasion success of several poorly diverse but interbreeding aquaculture sources (Consuegra *et al.*, 2011). However, the distribution of *O. niloticus* haplotypes suggests that this species did not benefit from admixture between its two poorly diverse sources (Upper and Lower Limpopo sources). Thus, the much higher genetic diversity of *O.*

*andersonii* –as estimated from mtDNA– could have favored its broader expansion in the drainage relatively to *O. niloticus*.

Third and last, *O. andersonii* is phylogenetically closer to *O. mossambicus* than to *O. niloticus* (Trewavas, 1983). Thus, genetic incompatibilities with *O. mossambicus* are expected to be lower for *O. andersonii* than for *O. niloticus* leading to weaker intrinsic barriers to introgression and genetic spread for the first species. In summary, time since introductions, patterns of genetic diversity and possible role of genetic incompatibilities between alien species and *O. mossambicus* could explain the broader expansion of *O. andersonii* haplotypes in the system. Time since introduction can be considered as a baseline explanation, but the differential expansion of *O. andersonii* was probably accelerated by the two others factors.

A previous survey of recent invasion-mediated hybridization in *Oreochromis* reports rapid replacements and disappearances of the native or resident species. For example, introduction of *O. niloticus* in the previously established *Oreochromis macrochir* population in a lake of Madagascar has led to a dominance of one species (*O. niloticus*) and to the extirpation of *O. macrochir* after only ten years (Daguet & Moreau, 1981). In a dam within the Limpopo drainage, van der Waal reports the replacement of *O. mossambicus* by *O. niloticus* in less than ten years (Tweddle & Wise, 2007). In a second dam, Weyl (2008) documents the invasion of *O. niloticus* in less than one year, but with no evidence for the replacement of *O. mossambicus* over this time scale. Alternatively, previous studies in the upper part of the Limpopo System indicate strong inter-annual variation in the frequency of introduced species and hybrids based on allozymic data (Moralee *et al.*, 2000; van der Bank & Deacon, 2007). Shortly after the first *O. niloticus* introduction (i.e. possibly four to eight years), Moralee *et al.* (2000) used allozymic data and reported 86% of *O. niloticus* or hybrids and 14% of *O. mossambicus* ( $N = 257$ ). Using a similar approach for fish sampled in 2002 and 2006, van der Bank & Deacon (2007) only identified 25%

of alien or hybrids in 2002 ( $N = 63$ ) and 35% in 2006 ( $N = 103$ ) suggesting that the frequency of preserved *O. mossambicus* genotypes can drastically vary with time in a riverine system.

Our results show that hybrid frequency and invasion patterns also strongly vary spatially. Furthermore, *O. niloticus* expansion and *O. mossambicus* local extinction in the Lower Limpopo are not as dramatic as previously reported for invaded lakes (Tweddle & Wise, 2007; Weyl, 2008) and for some sections of the Upper Limpopo (Moralee *et al.*, 2000; van der Waal & Bills, 2000; van der Bank & Deacon, 2007). Riverine systems such as the Changane River are submitted to annual floods and droughts that may drastically alter patterns of genetic connectivity between populations over short time scales (Crispo & Chapman, 2010). Pure *O. mossambicus* specimens remain dominant in the most isolated and remote parts of the system (here the upstream section and the surrounding lakes). One may hypothesize therefore, that downstream dispersal events from head of the system during floods may help to keep the proportion of hybrids within the most frequently connected lower stream sections of the Limpopo and lower Changane Rivers low. Thus, temporarily isolated and still unintrogressed headwater *O. mossambicus* populations could act as refugia preventing the total replacement by aliens and hybrids.

### **Environmental variation and alien genotypes expansion**

A mosaic of extreme environmental conditions are bring together along the Changane River System, from highly saline or brackish ponds in the middle reaches to eutrophic restwater swamps in the head sections (Losseau *et al.*, submitted). The heterogeneous pattern of hybrids genotypes distribution the lower and middle Changane River suggests a potential influence of these local ecological conditions in constraining the spread of alien species and their hybrids. Extreme habitats characterized by long episodes of extreme eutrophic conditions, such as

restwater swamps, are expected to challenge the establishment and spread of alien species that would be less favored under hypoxia than the supposedly locally adapted *O. mossambicus* populations. Furthermore, in contrast to *O. niloticus*, *O. mossambicus* is recognized as a highly saline tolerant species (Stickney, 1986). The saline conditions found in the middle reaches would potentially act as a barrier in constraining upstream expansion of downstream fish fauna including *Oreochromis* hybrids (Losseau *et al.*, submitted). The presence of dominant *O. mossambicus* hybrid genotypes in saline conditions (Chigubo) can be explained by the experimentally supported saline tolerance of *O. mossambicus* x *O. niloticus* hybrids (Kamal & Mair, 2005; Lutz *et al.*, 2010) which is maintained over successive backcrosses with pure *O. mossambicus* from the F<sub>1</sub> generation (Mateo *et al.*, 2004). Although this extensive experimental framework should be carefully considered for comparison with field conditions, our data suggest that the saline barrier could allow the maintenance of a low proportion of *O. mossambicus*-dominated genotypes but constraint the spread of *O. niloticus*-dominated genotypes like those found at high frequency in the Lower Limpopo (freshwater).

Extreme salinity and drought conditions are only two among the multiple potential factors that could determine the future of this system. For example, food availability should be considered since *O. niloticus* is expected to compete with *O. mossambicus* given the clear dietary overlap of the two species (Zengetya *et al.*, 2011). In addition, lower parasite prevalences and intensities were found among localities of low conservation value in the Lower Limpopo (Firmat *et al.*, submitted) which could result in competitive advantages to allochthonous and hybrid specimens and therefore promote their expansion. Despite these ecological insights, the prevalence of hybrids in the Changane River remains relatively low, and identification of refugial areas of high importance for *O. mossambicus* conservation remains feasible. Disentangling the respective contributions of geographical and ecological barriers responsible for the maintenance

the genetic integrity in these relictual populations now appears as a primary topic for the conservation of *O. mossambicus*. This would be achieved by extensive genomic scan approaches in order to estimate the putative adaptive genetic variation (see e.g. Bonin *et al.*, 2007) within and among several preserved *O. mossambicus* populations sampled in variable saline and hypoxic conditions. In a second step, these results should be compared to those obtained from admixed *Oreochromis* populations sampled across as much variable conditions. Such an approach and dataset would be demanding in term of sampling effort, but represents the next steps to define to evaluate the vulnerability of *O. mossambicus* conservation units and the impact of the invasion-mediated hybridization on the dilution and loss of local adaptive variation. Genetic surveys before and after major flood events (e.g. Crispo & Chapman, 2010) could as well allow estimating the frailty of contemporary genetic structures facing to intermittent breaking of geographic and ecological barriers to gene flow.

### **Genetic structure and diversity in native *O. mossambicus***

The preserved *O. mossambicus* populations recovered in the Changane System exhibits a substantial amount of genetic diversity contrasting with the depleted genetic diversity reported for *O. mossambicus* populations that were exported worldwide during the 20<sup>th</sup> century (McKinna *et al.*, 2010; Firmat *et al.*, unpublished results). Populations from the Changane System could therefore represent potential sources for *O. mossambicus* restocking in critically invaded areas (e.g. the Upper and mainstream Limpopo), as well as for the development of valuable aquaculture tilapia strains based on well diversified autochthonous populations (Brummett & Ponzoni, 2009).

We did not detect any pattern of clustering among the native *O. mossambicus* populations neither significant differentiation between riverine and lacustrine habitats for both nuclear and mitochondrial markers. These results indicate that the *O. mossambicus* populations included in

this study constitute a relatively homogeneous gene pool despite their notable geographical isolation. The null  $F_{ST}$  values found between the four populations of the headwater region is surprising given the current strong isolation between each swamp. This absence of differentiation in different water bodies of the headwaters has to be considered with regards of the recent history water flow variation. A major flood occurred in 2000 which had connected all swamps hydrologically and hereby allowed homogenize the genetic variation. Sampled localities were disconnected two or three years thereafter as a result of increased drought. Riverine populations therefore have remained permanently isolated for last five or six years. This short time lapse was probably too short to lead to a detectable genetic differentiation between the sampled localities. Floods have already been evidenced as major homogenizing factor erasing isolation by distance patterns in riverine cichlids (Crispo & Chapman, 2010). We suggest that this is the case in the Changane River system too, with temporal variation in genetic structure due to prolonged drought phases alternate with major flood events allowing for amalgamation of intermittently isolated fish populations.

The highest levels of genetic differentiation are found among comparisons involving three out four isolated lacustrine stations (Marilelo, Nungwane, Djongwe) *vs.* the four headwater stations (Zinhane, Lipasse, Linlangalinwe, Maficuiane). The Macosse Lake, that represents the largest permanent body of water included in this study, exhibits no significant genetic differentiation with the rest of the system. These results suggest that geographic distance, isolation over geological time scales (i.e. since the last major Pleistocene sea level fluctuation or extreme floods events connecting lakes to rivers), possibly combined with an increased drift effect in populations from small water bodies could have induce this within-drainage differentiation pattern. The D'Amato *et al.* (2007)'s analyses performed at the scale of the whole *O. mossambicus* native range indicated a genetic differentiation among drainages. Focusing at a

narrower geographical scale provide a finer picture of the *O. mossambicus* genetic structure, indicating that the naturally fragmented *O. mossambicus* habitat induce a subtle genetic differentiation within-drainages and potentially several conservation units to manage at the local scale.

## CONCLUSION

Our results provide rather hopeful auspices for the conservation of *O. mossambicus* in the face of introductions of allochthonous *Oreochromis* species in the Limpopo drainage. We provide evidence for only a limited expansion of alien species and their hybrids in the Lower Limpopo despite multiple introductions. Our results indicate that the spread of hybrids in the system is rather slow probably due to geographical and ecological barriers. The peculiarity of the Limpopo hybrid system is that the endangered *O. mossambicus* received two successive waves of interspecific genetic introgression from introduced species. Currently, these two invasive species exhibit very different levels of genetic variation that potentially correlate with their respective invasive abilities. This result appeals further investigation on the role of propagule pressure and genetic diversity in the success of biological invasions involving genetic introgression of supposedly locally adapted native species.

In addition, we identified two refugial zones that should henceforth receive high priority for the conservation of *O. mossambicus*: the head of the Changane drainage and the lakes surrounding the Lower Changane River. That the four lakes included in the study are populated by native *O. mossambicus* strongly suggests that the surrounding wetland system around the Changane (a considerable water surface, Hugues & Hugues 1992) represents an ideal refuge zone for the species. The absence of genetic structure among native riverine *O. mossambicus*

populations suggests that major floods may help to homogenize temporarily isolated riverine populations. Furthermore, we show that hybrids are able to spread over long distances in upstream direction. In the long term, it can therefore be expected that the genetic integrity of riverine populations will be threatened by hybrid expansion mediated by future flood events. The genetic integrity of the more isolated lacustrine populations is therefore less precarious over the long term. Alerting people against stocking *Oreochromis* sp. in these localities and prohibiting the development of allochthonous tilapia aquaculture in the region should therefore be considered among the first conservation actions, while further studies will be required to better understand the roles of geographic, ecological and reproduction barriers on hybrids expansion.

## REFERENCES (Section I-1)

- Agnèse, J.-F., Adèpo-Gourène, B. & Pouyaud, L. (1998) Natural hybridisation in tilapias. *Genetics and Aquaculture in Africa* (ed. by Orstom).
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P. & Wenburg, J.K. (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 613-622.
- Anderson, E.C. (2008) Bayesian inference of species hybrids using multilocus dominant genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **363**, 2841-2850.
- Anderson, E.C. & Thompson, E.A. (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, **160**, 1217-1229.
- Angienda, P., Lee, H., Elmer, K., Abila, R., Waindi, E. & Meyer, A. (2011) Genetic structure and gene flow in an endangered native tilapia fish (*Oreochromis esculentus*) compared to invasive Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Yala swamp, East Africa. *Conservation Genetics*, **12**, 243-255.

- Blackburn, T.M., Pysek, P., Bacher, S., Carlton, J.T., Duncan, R.P., Jarosík, V., Wilson, J.R.U. & Richardson, D.M. (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, **26**, 333-339.
- Bonin, A., Nicole, F., Pompanon, F., Miaud, C. & Taberlet, P. (2007) Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. *Conservation Biology*, **21**, 697-708.
- Bonin, A., Bellemain, E., Eidesen, P.B., Pompanon, F., Brochmann, C. & Taberlet, P. (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, **13**, 3261-3273.
- Brummett, R.E. (2008) Genetic quality of cultured tilapia stocks in Africa. *World Aquaculture*, **39**, 46-72.
- Brummett, R.E. & Ponzoni, R.W. (2009) Concepts, Alternatives, and Environmental Considerations in the Development and Use of Improved Strains of Tilapia in African Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, **17**, 70-77.
- Cambray, J. & Swartz, E. (2007) *Oreochromis mossambicus*. In: *IUCN Red List of Threatened Species*. . [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Canonico, G.C., Arthington, A., McCrary, J.K. & Thieme, M.L. (2005) The effects of introduced tilapias on native biodiversity. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*, **15**, 463-483.
- Consuegra, S., Phillips, N., Gajardo, G. & de Leaniz, C.G. (2011) Winning the invasion roulette: escapes from fish farms increase admixture and facilitate establishment of non-native rainbow trout. *Evolutionary Applications*, In press.
- Crispo, E. & Chapman, L.J. (2010) Temporal variation in population genetic structure of a riverine African cichlid fish. *Journal of Heredity*, **101**, 97-106.

Crispo, E., Moore, J., Lee-Yaw, J., Gray, S. & Haller, B. (2011) Broken barriers: Human-induced changes to gene flow and introgression in animals: An examination of the ways in which humans increase genetic exchange among populations and species and the consequences for biodiversity. *Bioessays*, **33**, 508-518.

D'Amato, M.E., Esterhuyse, M.M., van der Waal, B.C.W., Brink, D. & Volckaert, F.A.M. (2007) Hybridization and phylogeography of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* in southern Africa evidenced by mitochondrial and microsatellite DNA genotyping. *Conservation Genetics*, **8**, 475-488.

Daguet, J. & Moreau, J. (1981) Hybridation introgressive entre deux espèces de *Sarotherodon* (Pisces, Ciclidae) dans un lac de Madagascar. *Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle* **4**, 689-703.

de Moor, I.J. & Bruton, M.N. (1988) *Atlas of alien and translocated indigenous aquatic animals in southern Africa. A report of the Committee for Nature Conservation Research National Programme for Ecosystem Research*, Port Elizabeth, South Africa.

Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611-2620.

Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M.A. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.

Facon, B., Jarne, P., Pointier, J.P. & David, P. (2005) Hybridization and invasiveness in the freshwater snail *Melanoides tuberculata*: hybrid vigour is more important than increase in genetic variance. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 524-535.

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 574-578.

Gregg, R.E., Howard, J.H. & Shonhiwa, F. (1998) Introgressive hybridization of tilapias in Zimbabwe. *Journal of Fish Biology*, **52**, 1-10.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.

Herder, F., Pfaender, J. & Schliewen, U.K. (2008) Adaptive sympatric speciation of polychromatic "roundfin" sailfin silverside fish in Lake Matano (Sulawesi). *Evolution*, **62**, 2178-2195.

Hubisz, M.J., Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1322-1332.

Hugues, R.H. & Hugues, J.S. (1992) *A directory of African wetlands*. IUCN, UNEP, WCMC, Cambridge.

Kamal, A. & Mair, G.C. (2005) Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. *Aquaculture*, **247**, 189-201.

Kolbe, J.J., Glor, R.E., Schettino, L.R.G., Lara, A.C., Larson, A. & Losos, J.B. (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, **431**, 177-181.

Lockwood, J.L., Cassey, P. & Blackburn, T. (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 223-228.

Lutz, C.G., Armas-Rosales, A.M. & Saxton, A.M. (2010) Genetic effects influencing salinity tolerance in six varieties of tilapia (*Oreochromis*) and their reciprocal crosses. *Aquaculture Research*, **41**, e770-e780.

Mallet, J. (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 229-237.

Mateo, D., Aguilar, R., Campos, W., Katalbas, M., Severa, F., Sanares, R., Edra, R., Chevassus, B., Lazard, J., Morrisens, P., Baroiller, J.F. & Rognon, X. (2004) Salinity tolerance of *Oreochromis niloticus* and *O. mossambicus* F1 hybrids and their successive backcrosses. *Proceeding of the Sixth International Symposium on Tilapia Aquaculture* (ed. by R. R. Bolivar, G. Mair and K. Fitzsimmons), pp. 426-438. Bureau of Fisheries and Aquatic Resources, Manila, Philippines.

McKinna, E.M., Nandlal, S., Mather, P.B. & Hurwood, D.A. (2010) An investigation of the possible causes for the loss of productivity in genetically improved farmed tilapia strain in Fiji: inbreeding versus wild stock introgression. *Aquaculture Research*, **41**, e730-e742.

Moralee, R.D., van der Bank, F.H. & van der Waal, B.C.W. (2000) Biochemical genetic markers to identify hybrids between the endemic *Oreochromis mossambicus* and the alien species, *O. niloticus* (Pisces : Cichlidae). *Water SA*, **26**, 263-268.

Muhlfeld, C.C., Kalinowski, S.T., McMahon, T.E., Taper, M.L., Painter, S., Leary, R.F. & Allendorf, F.W. (2009) Hybridization rapidly reduces fitness of a native trout in the wild. *Biology Letters*, **5**, 328-331.

Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.

Nolte, A.W. & Tautz, D. (2010) Understanding the onset of hybrid speciation. *Trends in Genetics*, **26**, 54-58.

Nolte, A.W., Freyhof, J., Stemshorn, K.C. & Tautz, D. (2005) An invasive lineage of sculpins, *Cottus* sp (Pisces, Teleostei) in the Rhine with new habitat adaptations has originated from hybridization between old phylogeographic groups. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **272**, 2379-2387.

- Nyingi, D.W. & Agnese, J.F. (2007) Recent introgressive hybridization revealed by exclusive mtDNA transfer from *Oreochromis leucostictus* (Trewavas, 1933) to *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in Lake Baringo, Kenya. *Journal of Fish Biology*, **70**, 148-154.
- Paradis, E. (2010) pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, **26**, 419-420.
- Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*, **20**, 289-290.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E. & Taberlet, P. (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, **6**, 847-859.
- Prentis, P.J., Wilson, J.R.U., Dormontt, E.E., Richardson, D.M. & Lowe, A.J. (2008) Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*, **13**, 288-294.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Rhymer, J.M. & Simberloff, D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 83-109.
- Rognon, X. & Guyomard, R. (2003) Large extent of mitochondrial DNA transfer from *Oreochromis aureus* to *O. niloticus* in West Africa. *Molecular Ecology*, **12**, 435-445.
- Schliewen, U.K. & Klee, B. (2004) Reticulate sympatric speciation in Cameroonian crater lake cichlids. *Frontiers in Zoology*, **1**, 5.
- Schneider, M.F. (2003) Ocorrência das espécies comerciais exóticas de peixe no Rio Limpopo depois das cheias no ano 2000. *Boletim de Investigação Florestal, December 2003*, 31-36.
- Seehausen, O. (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 198-207.

- Seehausen, O., Takimoto, G., Roy, D. & Jokela, J. (2008) Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Molecular Ecology*, **17**, 30-44.
- Skelton, P.H. (2001) *A complete guide to the freshwater fishes of Southern Africa*. Struik Publishers, Cape Town.
- Stickney, R.R. (1986) Tilapia tolerance of saline waters: a review. *The Progressive Fish Culturist* **48**, 161-167.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Trewavas, E. (1983) *Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia*. Cornell University Press, Ithaca New York.
- Tweddle, D. & Wise, R. (2007) Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). The economic impact and appropriate management of selected invasive alien species on the African continent, Appendix 3. *Final Report prepared for the Global Invasive Species Programme* (ed. by R. Wise, B. Van Wilgen, M. Hill, F. Schulthess, D. Tweddle, A. Chabi-Olay and H. Zimmerman).
- van der Bank, F.H. & Deacon, A. (2007) Increased backcrossing has reduced the usefulness of morphological and allozyme data for identifying *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* (Teleostei: Cichlidae) and their hybrids in the Pafuri reach of the Luvuvhu River in the Kruger National Park, South Africa. *Afr J Aquat Sc*, **32**, 193-196.
- van der Waal, B. & Bills, R. (2000) *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) now in the Limpopo River System. *S Afr J Sc*, **96**, 47-48.
- Vekemans, X., Beauwens, T., Lemaire, M. & Roldan-Ruiz, I. (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of

a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, **11**, 139-151.

Verhoeven, K.J.F., Macel, M., Wolfe, L.M. & Biere, A. (2011) Population admixture, biological invasions and the balance between local adaptation and inbreeding depression. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **278**, 2-8.

Weyl, O.L.F. (2008) Rapid invasion of a subtropical lake fishery in central Mozambique by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces : Cichlidae). *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*, **18**, 839-851.

Zengeya, T., Booth, A., Bastos, A. & Chimimba, C. (2011) Trophic interrelationships between the exotic Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and indigenous tilapiine cichlids in a subtropical African river system (Limpopo River, South Africa). *Environmental Biology of Fishes*, **in press**

Zhivotovsky, L.A. (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, **8**, 907-913.

# **SECTION I-2. Parasitologie des populations du Limpopo inférieur (Mozambique)**

## **Manuscrit 2 :**

(Soumis à *Folia Parasitologica*)

**Title:** Monogenean parasites epidemiology and diversity of the native and alien *Oreochromis* cichlids from the Lower Limpopo drainage (Mozambique)

**Running head:** Monogeneans of native and alien cichlids

### **Authors:**

Cyril FIRMAT <sup>1\*</sup>

Guillaume MUTIN <sup>1</sup>

Paul ALIBERT <sup>1</sup>

Michèle LOSSEAU <sup>2</sup>

Antoine PARISELLE <sup>3</sup>

Pierre SASAL <sup>4</sup>

### **Affiliations:**

<sup>1</sup> UMR CNRS 5561 Biogéosciences - Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France.

<sup>2</sup> Polana Caniço A, Maputo, Mozambique.

<sup>3</sup> IRD (ex-ORSTOM)/ISE-M, UR226/UMR5554, Université Montpellier II 34095 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>4</sup> Laboratoire d'Excellence CORAIL, USR 3278 CNRS-EPHE CRIODE, Papetoai, 98729 Moorea, French Polynesia

\*Corresponding author: Cyril Firmat

Email: [cyril.firmat@u-bourgogne.fr](mailto:cyril.firmat@u-bourgogne.fr),

Telephone: (+) 33 (0)3 80 39 63 76 - Fax: (+) 33 (0)3 80 39 63 87

## **ABSTRACT**

Biological invasions involving interspecific hybridization between native and alien species represent a significant threat to biodiversity. However, little is known about the consequences for parasites and their impact in such a context. The Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* recently became an endangered species due to its widespread hybridization with the alien *Oreochromis niloticus* and others congeneric species released within its native range. Here we investigate monogenean parasites diversity and epidemiology in the *Oreochromis* cichlids focusing on sampling localities of high and low conservation values in the Lower Limpopo River System (Mozambique). We found a lower infection level and a higher monogenean species richness associated to the presence of a mixture of host genotypes. Although monogenean infection and diversity probably vary in the system according to several environmental parameters, lower parasite susceptibility in alien and hybrid hosts and the introduction of new parasites along with host species are suspected. This analysis of monogenean infection shed light on a first possible ecological factor that could contribute to explain the successful establishment and spread of alien *Oreochromis* and their hybrids in the Limpopo River System.

**KEYWORDS:** epidemiology; hybridization; biological invasion; tilapia

## INTRODUCTION

Biological invasions, the establishment and proliferation of species introduced out of their native range, are now recognized as a primary threat to world ecosystems (Vitousek et al. 1997, Clavero & García-Berthou 2005). Parasite lost during host introduction or parasite transfers between hosts can lead to drastic changes in parasite diversity for both native and alien hosts (review in Dunn 2009). Conversely, variations in parasite infection and diversity are likely to affect the fate of a biological invasion process through effects on host fitness (e.g. the enemy release hypothesis, see Torchin et al. 2002, Prenter et al. 2004). Thus, comparing parasites diversity and epidemiology in native and invasive species can yield key insights to better understand some aspects of biological invasion processes and even lead to suggest specific conservation practices. A peculiar but significant aspect of biological invasions involves cases of hybridization of the alien taxa with indigenous species (Rhymer & Simberloff 1996) and already contributed to the genetic extinction of many taxa in dramatically increasing genetic exchanges between species pairs (Allendorf et al. 2001, Crispo et al. 2011). However, parasitological comparative studies already conducted in the context of biological invasions have often involved phylogenetically distant and non-hybridizing pairs of alien and native host species (e.g. Jimenez-Garcia et al. 2001, Smith & Carpenter 2006, Roche et al. 2010). If host-parasite interactions have been well studied in naturally hybridizing hosts (Moulia 1999), to our knowledge, no parasitological survey already compared potentially interbreeding host species in a contemporary biological invasion context.

The present work focuses on the *Oreochromis* cichlid species of the lower Limpopo drainage. *Oreochromis mossambicus*, the Mozambique tilapia, is an emblematic fish of the southern African continental waters as well as an important food resource in many tropical and subtropical territories across the world. Recent introductions for aquaculture purposes of

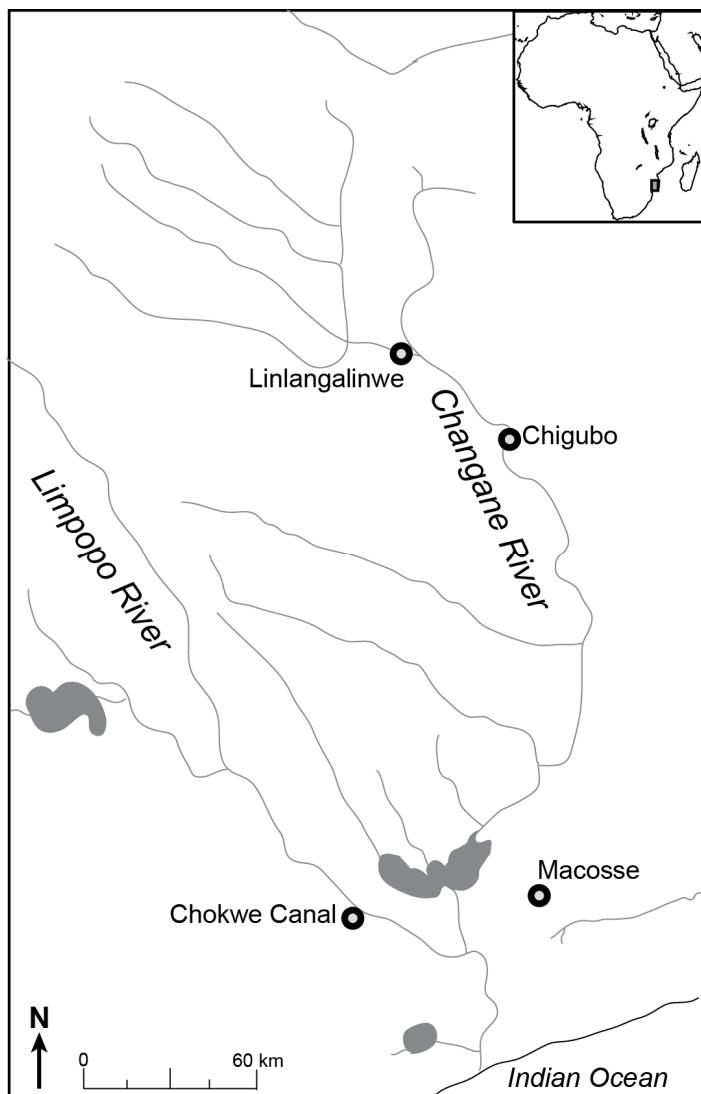
the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the Limpopo drainage (van der Waal & Bills 2000, Schneider 2003) have led to the spread on this species in the system in some cases to hybridization with *O. mossambicus* (Moralee et al. 2000, D'Amato et al. 2007, van der Bank & Deacon 2007). This situation is of major concern for conservation and aquaculture activities in Southern Africa (van der Waal & Bills 2000) and led to the report of *O. mossambicus* as a near threaten species on the IUCN Redlist due to its massive hybridization with *O. niloticus* (Cambray & Swartz 2007). However, the reality of the alien *Oreochromis* introductions and genetic admixtures is probably more complex than generally assumed (i.e. threat by hybridization with *O. niloticus* only), with successive events of *Oreochromis* species release, hybridization and introgression. For example, mitochondrial haplotypes of *Oreochromis andersonii*, a second alien species previously introduced in the drainage before *O. niloticus* (Sashi Dam, Bostwana, de Moor & Bruton 1988) was recovered in the Limpopo (D'Amato et al. 2007). However, *O. mossambicus* populations of high conservation values were recently genetically identified in parts of the Changane sub-drainage (by multilocus genotyping and mtDNA; Firmat et al. unpublished), the main tributary of the Lower Limpopo. The Lower Limpopo therefore provides a contrasted genetic situation to investigate parasite diversity and epidemiology between hosts populations of little and high conservation values.

## MATERIAL AND METHODS

### **Sampling localities and host collection**

Fish specimens were collected in June-July 2009 during a single two weeks sampling session in order to avoid seasonal variation in parasite abundance already reported for *O. mossambicus* in Southern Africa (Madanire-Moyo et al. 2011). We sampled a total of 69 fish from four localities selected for the varying genetic background of sampled populations (Figure 1). Chokwe Canal (S24°38'07.0", E33°04'37.9") is a waterway connected to the Limpopo mainstream. Prominent vertical bars indicating the presence of *O. niloticus* or its

**Figure 1.** Geographic location of the Lower Limpopo and sampling localities.



hybrids (van der Waal & Bills 2000, van der Bank & Deacon 2007) are observable among the sampled specimens which is in line with preliminary genetic analyses (Firmat et al. unpublished data). Chigubo ( $S22^{\circ}56'49.0''$ ,  $E33^{\circ}40'39.0''$ ) is a brackish water pool located in the Changane mainstream. Specimens are stunted (i.e. exhibit growth retardation) and traces of hybridization are confirmed by the presence of *O. andersonii* mtDNA (unpublished data). Linlangalinwe ( $S22^{\circ}39'06.1''$ ,  $E33^{\circ}17'21.2''$ ) is a freshwater pool located in the endorheic basin of the Banhine National Park which is only connected to the rest of the system during

and after exceptional flood periods (the last one occurred in 2000). Macosse ( $S24^{\circ}30'37.3''$ ,  $E33^{\circ}45'10.2''$ ) is an isolated freshwater lake fully disconnected from the Changane-Limpopo system. Hydrographic configuration of the last two localities, phenotypic observations and preliminary genetic data all support that the Linlangalinwe and Macosse specimens represent native *O. mossambicus* populations prevented until now from contact with alien *Oreochromis*.

### **Parasite collection and identification**

We focused on gill monogenean parasites due to their broad and well described taxonomic diversity for *Oreochromis* (Pariselle & Euzet 2009). The four gill arches from the right side of 69 fish specimens were excised on the field and stored in a 80% ethanol solution. Monogenean parasites were subsequently counted in the lab and taxonomic assignations were performed using the framework of Pariselle and Euzet (2009). Parasite prevalence and intensity were computed for each locality. In addition, hosts standard length (*SL*) and mass (*M*) were recorded on the field. The condition factor of hosts (*K*) was calculated according to the formula  $K = M SL^{-3}$  (Bolger & Connolly 1989).

### **Statistical analyses**

We used generalized linear models (GLMs) to evaluate the effects of predictors on the infection by monogeneans. For count data response variables such as parasite abundance, the use of GLMs is recommended over linear model performed with a transformed response variable (e.g. the widespread used  $\log(x+1)$  transformation) in order to avoid bias in the final results (O'Hara & Kotze 2010). Effects on parasite abundance were tested with a quasi-poisson error structure that provided a better fit based on deviance compared with residual degrees of freedom of our model (see O'Hara & Kotze 2010). In a second GLM, parasite prevalence (the individual status of infection, a binary response variable) was tested with a

binomial error structure. The predictors tested for both models were sampling localities and host size (*SL*) that was considered as a covariate since monogenean infection can correlate with fish size as already reported in *O. mossambicus* (Madanire-Moyo et al. 2011). The interaction term between the two factors was removed because found unsignificant in both models. The effects of sampling localities and parasite abundance on host condition factor *K* were tested simultaneously in a linear model. All the statistical analyses were performed using the R environment (R Development Core Team 2008).

## RESULTS

### Diversity

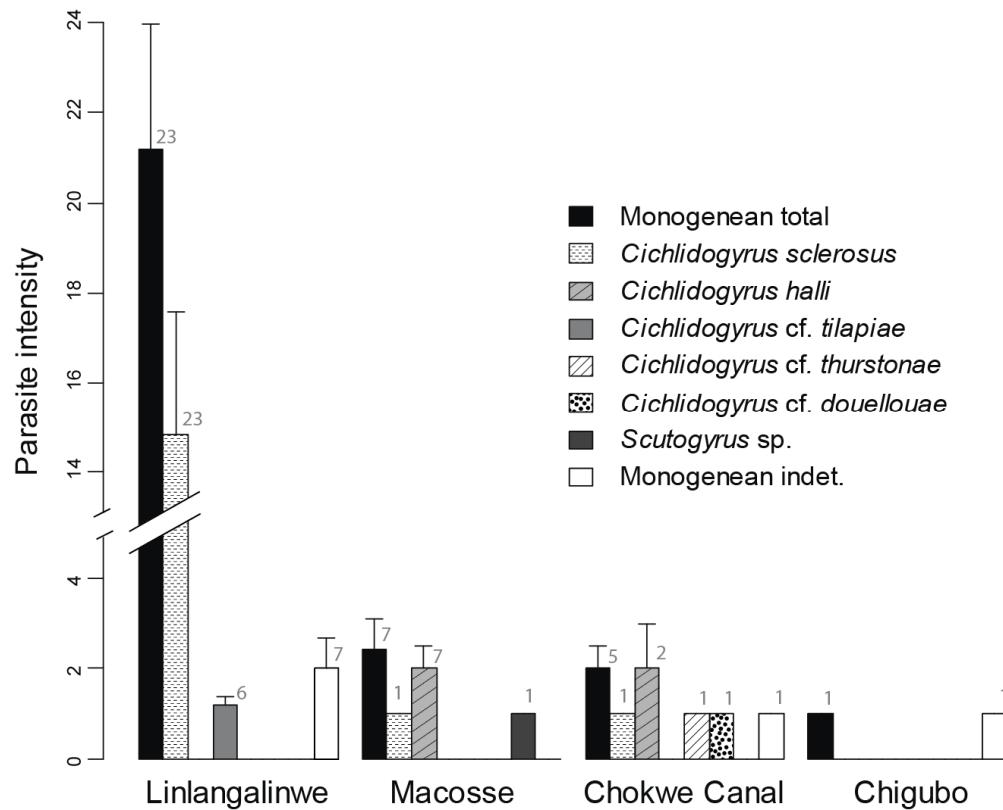
A total 387 monogenean specimens were recovered among which 371 were in a preservation state allowing a taxonomic assignation. Six taxa were identified. Their distribution among the four sampling localities is shown in table 1. The highest species richness was found at Chokwe Canal with four species while only three and two species were respectively recovered at Macosse and Linlangalinwe. The most widespread and abundant species was *Cichlidogyrus sclerosus* which was found in the three localities where parasites were identified and was highly dominant in the monogenean community of Linlangalinwe (321/337 identified parasites, Figure 2). The second most abundant species was *Cichlidogyrus halli* occurring at Macosse where it is the most frequently found species (14/26 identified parasites) and Chokwe Canal (4/8 identified parasites). A very low proportion of the parasites (6/337) collected in Linlangalinwe were assigned to *Cichlidogyrus* cf. *tilapia*, a species not found elsewhere in the system. Three additional taxa were represented by a single specimen: *Cichlidogyrus* cf. *thurstonae*, *Cichlidogyrus* cf. *douellouae* from Chokwe Canal and *Scutogyrus* sp. from Macosse. The very rare occurrence of these three taxa prevents accurate systematic assignations or description.

**Table 1.** Number of host per sampling station ( $N$ ), mean host size (standard length,  $SL$ ), condition factor ( $K$ ), prevalence (%) and intensity range (min-max) of infection by monogeneans per sampling locality.

Locality	Linlangalinwe	Macosse	Chokwe Canal	Chigubo
$N$	23	8	21	17
Host size ( $SL$ mm) – Mean $\pm$ SD	$148.9 \pm 14.08$	$121.4 \pm 13.22$	$110.9 \pm 14.75$	$102.5 \pm 6.44$
Host $K$ ( $\times 100$ ) – Mean $\pm$ SD	$3.82 \pm 0.38$	$3.83 \pm 0.39$	$4.26 \pm 0.42$	$3.47 \pm 0.34$
Monogenean total	100% <sup>a</sup> (4-62)	87.5% <sup>a</sup> (1-5)	28.6% <sup>b</sup> (1-4)	5.9% <sup>b</sup> (1)
<i>Cichlidogyrus sclerosus</i>	100% (3-62)	12.5% (1)	9.5% (1)	0
<i>Cichlidogyrus halli</i>	0	87.5% (1-4)	9.5% (1-3)	0
<i>Cichlidogyrus cf. tilapiae</i>	21.7% (1-2)	0	0	0
<i>Cichlidogyrus cf. thurstonae</i>	0	0	4.8% (1)	0
<i>Cichlidogyrus cf. douellouae</i>	0	0	4.8% (1)	0
<i>Scutogyrus</i> sp.	0	12.5% (1)	0	0
Monogenean indet.	26.1% (1-4)	0	4.8% (1)	5.9% (1)

<sup>a</sup> and <sup>b</sup> identify pairs of populations that does not significantly differ ( $P > 0.05$ ) by their total prevalences according to pairwise tests for proportions comparison.

**Figure 2.** Mean parasite intensities for each locality. Vertical lines indicate the standard error of the means. Numbers above bars are the number of infected hosts per category.

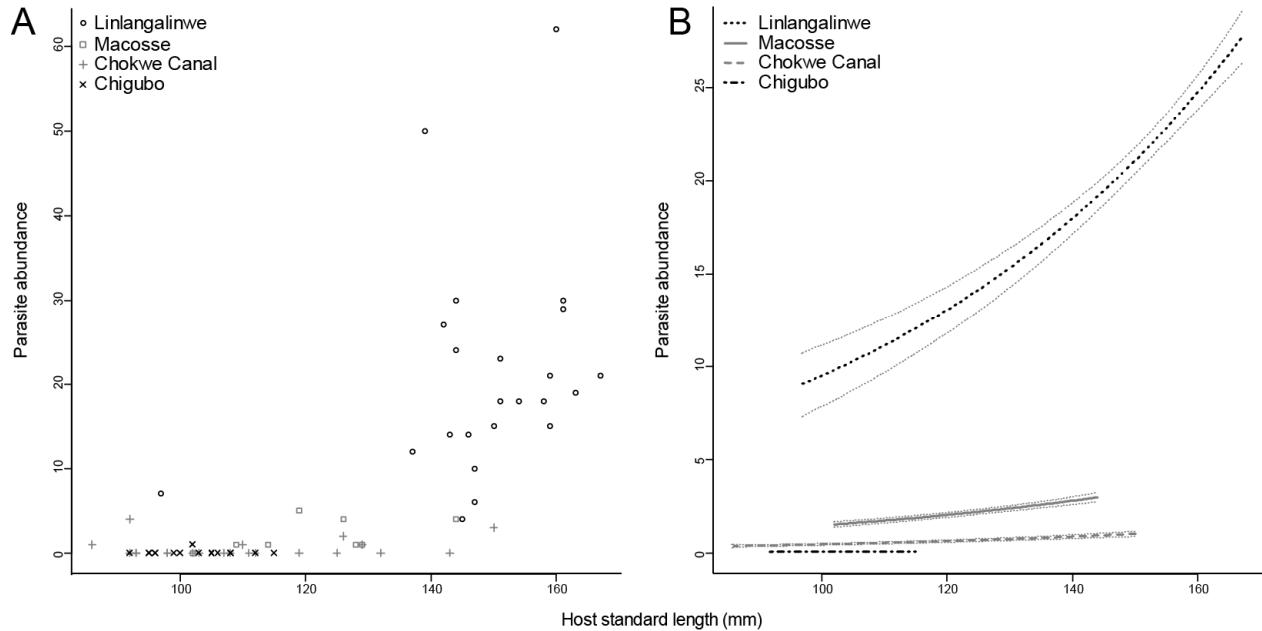


## Epidemiology

Contrasted pattern of monogeneans prevalence and abundance were recorded in the four sampling localities (Table 1, Figure 3). A clearly higher prevalence was recorded in

native *O. mossambicus* populations of Linlangalinwe and Macosse comparatively to Chokwe Canal and Chigubo. Only one parasite was found for this latter locality. Difference in prevalence was highly significant between localities (df: 3, 64; Deviance = 54.336;  $p < 0.0002$ ) but not influenced by host size (df: 1, 64; Deviance = 38.76;  $p = 0.227$ ). Parasite abundance (Table 1) was significantly different among localities (df: 3,64; Deviance = 397.60;  $p < 0.0001$ ) and at a lower extent also significantly influenced by host size (df = 1,64; Deviance=215.55;  $p = 0.025$ ). Figure 3 shows that the highest abundances were found in hosts from Linlangalinwe and Macosse in comparison to Chokwe Canal and Chigubo where very low abundances were recorded (Table 1). Similar mean parasite intensities were nevertheless recorded for Macosse and Chokwe Canal (respectively 2.42 and 2.00 for all monogeneans; Figure 2). No significant effect of parasite abundance on host condition factor was detected (df: 1,64;  $F = 1.11$ ;  $p = 0.296$ ) even if condition factor differ significantly among sampling localities (df: 3,64;  $F = 13.34$ ;  $p < 0.0001$ ) with the higher and lower values found for the Chokwe Canal and Chigubo respectively and similar intermediate values for the Linlangalinwe and Macosse localities (Table 1).

**Figure 3.** A. Parasite abundance as a function of host size. B. Values of parasite abundance predicted by a generalized linear model (see Methods) for each locality. 99% confidence intervals based on 100 bootstrap replicates are indicated when not confounded with the fitted lines (i.e. all cases except Chigubo).



## DISCUSSION

Our results highlight contrasted patterns of monogenean parasite diversity and infection in *Oreochromis* along the Lower Limpopo System. Among the six species recovered in the present study, *C. sclerosus*, *C. halli* and *C. tilapia* were previously identified in *O. mossambicus* populations sampled in three dams of the Upper Limpopo, South Africa (Olivier et al. 2009, Madanire-Moyo et al. 2011). Monogenean specimens from Chokwe Canal attributed to *C. cf. thurstonae* and *C. cf. douellouae* provide the very first records for these species or their close relatives in the Limpopo drainage. *Cichlidogyrus* sp. was recovered on *O. niloticus* in African aquacultures out of its native range (Akoll et al. 2011) as well as in established populations of Central America (Jimenez-Garcia et al. 2001, Roche et al. 2010) indicating that *O. niloticus* can be introduced and established with its monogenean parasites. We therefore suggest that the highest species richness found where a mixture of host

genotypes occurs could be a direct consequence of the introduction of alien monogenean species along with their alien host species. Moreover, inter-host transfers of *Cichlidogyrus* sp. were reported between deeply divergent host lineages such as alien *Oreochromis* and native Central American Cichlids (genus *Cichlasoma*, Jimenez-Garcia et al. 2001). Thus, the release of several *Oreochromis* species in the Lower Limpopo could have led to the transfer of monogenean species between native and invasive hosts or their hybrids. However, the current knowledge on the specificity of these monogenean species with their cichlid host taxa prevents further interpretations in this context. The distribution of monogenean taxa in the system also reveals differences between the two localities yielding preserved *O. mossambicus* populations. The *Scutogyrus* genus is only found at Macosse while never recovered among the 337 identified specimens in Linlangalinwe. *C. sclerosus* is highly represented in Linlangalinwe and rare at Macosse where *C. halli* is the dominant species. The monogenean community pattern observed in Macosse is congruent with those recently reported for other lakes of the Upper Limpopo System (Madanire-Moyo et al. 2011) suggesting that this difference in monogenean communities could result from an environmental effect (lakes vs. ponds) or from the biogeographic specificity of the Banhine endorheic system.

The very low prevalence and abundance found at Chigubo is probably related to extreme salinity levels recorded at this locality (total dissolved solids reaching 25 ppt) that is likely to have negative impact monogenenean infection. Interestingly, low total prevalence and abundance are found at the invaded locality of Chowke Canal relatively to non-invaded localities (Linlangalinwe and Macosse). This could result from a lower sensitivity of aliens and their hybrids to the local parasites and would be in line with the enemy release hypothesis often advocated to explain the success of invaders (Keane & Crawley 2002). Gill monogenean infection can be a factor of severe mortality in *Oreochromis* (Xu et al. 2007), although no significant effect of parasite abundance on host condition factor was detected in

the present study. Condition factor does not necessarily reliably estimate monogenean infection costs and fish individual fitness because of possible compensatory increase in foraging activity (Sasal 2006) or indirect consequences of monogenean infection on swimming performance and predator avoidance (Shirakashi et al. 2008). However, excluding the highly saline locality of Chigubo, the highest condition factor values were found at Chokwe Canal associated to low levels of infection. Overall, our results are consistent with a release of parasite pressure for localities where hybridization occurs. This is further supported by similar high monogenean prevalence values recently reported for *O. mossambicus* populations in dams of the Upper Limpopo (73.2%; Madanire-Moyo et al. 2011) and for *O. niloticus* in aquacultures (52.1%; Akoll et al. 2011). Possible hybrid vigor against parasites (e.g., Moulia et al. 1995) can be hypothesized to explain this result. We suggest that the lower infection associated with a mixture of host genotypes might partly contribute to predict the spread of alien *Oreochromis* or their hybrids in the Limpopo Drainage.

In conclusion, we showed that a lower infection level and higher parasite species richness were associated to the presence of a mixture of host genotypes. With regards to previous works, these two points respectively allow to suggest (1) the introduction of new parasites along with alien hosts and (2) a lower susceptibility to monogenean infection in alien or hybrid hosts. This could constitute a first possible ecological factor to explain the successful establishment and expansion of alien *Oreochromis* and their hybrids in the Limpopo River System. Additional comparative surveys including the introduced aquacultures host strains and others species transplanted in the system (e.g. *O. andersonii*) could provide informative data to explain the origin of the monogenan parasite diversity in the Lower Limpopo. Our results also appeal for experimental studies to understand the limits to monogenean host specificity and the possible role for host hybridization in parasite transfers between native and invasive species.

## **Acknowledgements**

Albert Losseau furnished an invaluable help and assistance for sampling organization. Francisco Pariela (Banhine National Park, Mozambique) provided sampling authorization (n°0002/2009) and its team provided field assistance. This study is contributed by the team BioME of the UMR5561-CNRS and partly funded by a Rotary International travel grant.

## **References (Section II-2).**

- Akoll P, Konecny R, Mwanja W, Nattabi J, Agoe C, Schiemer F (2011) Parasite fauna of farmed nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and african catfish (*Clarias gariepinus*) in uganda. Parasitology Research:In press
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: Setting conservation guidelines. Trends Ecol Evol 16:613-622
- Bolger T, Connolly PL (1989) The selection fo suitable indexes for the measurement and analysis of fish condition. J Fish Biol 34:171-182
- Cambray J, Swartz E (2007) *Oreochromis mossambicus* IUCN Red List of Threatened Species [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Clavero M, García-Berthou E (2005) Invasive species are a leading cause of animal extinctions. Trends Ecol Evol 20:110-110
- Crispo E, Moore J, Lee-Yaw J, Gray S, Haller B (2011) Broken barriers: Human-induced changes to gene flow and introgression in animals: An examination of the ways in which humans increase genetic exchange among populations and species and the consequences for biodiversity. Bioessays 33:508-518
- D'Amato ME, Esterhuyse MM, van der Waal BCW, Brink D, Volckaert FAM (2007) Hybridization and phylogeography of the mozambique tilapia *oreochromis*

*mossambicus* in southern africa evidenced by mitochondrial and microsatellite DNA genotyping. Conserv Genet 8:475-488

de Moor IJ, Bruton MN (1988) Atlas of alien and translocated indigenous aquatic animals in southern africa. A report of the committee for nature conservation research national programme for ecosystem research, Vol 144, Port Elizabeth, South Africa

Dunn AM (2009) Parasites and biological invasions. In: Advances in parasitology, Vol 68. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, p 161-184

Jimenez-Garcia MI, Vidal-Martinez VM, Lopez-Jimenez S (2001) Monogeneans in introduced and native cichlids in mexico: Evidence for transfer. J Parasitol 87:907-909

Keane RM, Crawley MJ (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. Trends Ecol Evol 17:164-170

Madanire-Moyo GN, Matla MM, Olivier PAS, Luus-Powell WJ (2011) Population dynamics and spatial distribution of monogeneans on the gills of *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) from two lakes of the limpopo river system, south africa. J Helminthol 85:146-152

Moralee RD, van der Bank FH, van der Waal BCW (2000) Biochemical genetic markers to identify hybrids between the endemic *Oreochromis mossambicus* and the alien species, *O. niloticus* (Pisces : Cichlidae). Water SA 26:263-268

Moulia C (1999) Parasitism of plant and animal hybrids: Are facts and fates the same? Ecology 80:392-406

Moulia C, Lebrun N, Loubes C, Marin R, Renaud F (1995) Hybrid vigour against parasites in interspecific crosses between two mice species. Heredity 74:48-52

O'Hara RB, Kotze DJ (2010) Do not log-transform count data. Methods Ecol Evol 1:118-122

- Olivier PAS, Luus-Powell WJ, Saayman JE (2009) Report on some monogenean and clinostomid infestations of freshwater fish and waterbird hosts in middle letaba dam, limpopo province, south africa. Onderst J Veter Res 76:187-199
- Pariselle A, Euzet L (2009) Systematic revision of dactylogyridean parasites (monogenea) from cichlid fishes in africa, the levant and madagascar. Zoosystema 31:849-898
- Prenter J, MacNeil C, Dick JTA, Dunn AM (2004) Roles of parasites in animal invasions. Trends Ecol Evol 19:385-390
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, vienna, austria isbn 3-900051-07-0. URL <http://www.R-project.org>
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. Annu Rev Ecol Syst 27:83-109
- Roche DG, Leung B, Franco EFM, Torchin ME (2010) Higher parasite richness, abundance and impact in native versus introduced cichlid fishes. Int J Parasitol 40:1525-1530
- Sasal P (2006) Nest guarding in a damselfish: Evidence of a role for parasites. J Fish Biol 68:1215-1221
- Schneider MF (2003) Ocorrência das esécies commerciais exóticas de peixe no rio limpopo depois das cheias no ano 2000. Boletim de Investigação Florestal December 2003:31-36
- Shirakashi S, Teruya K, Ogawa K (2008) Altered behaviour and reduced survival of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected by an invasive monogenean, *Neoheterobothrium hirame*. Int J Parasit 38:1513-1522
- Smith KF, Carpenter SM (2006) Potential spread of introduced black rat (*Rattus rattus*) parasites to endemic deer mice (*Peromyscus maniculatus*) on the california channel islands. Diversity & Distribution 12:742-748

Torchin ME, Lafferty KD, Kuris AM (2002) Parasites and marine invasions. *Parasitology* 124:S137-S151

van der Bank FH, Deacon A (2007) Increased backcrossing has reduced the usefulness of morphological and allozyme data for identifying *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* (Teleostei: Cichlidae) and their hybrids in the pafuri reach of the luvuvhu river in the kruger national park, south africa. *Afr J Aquat Sc* 32:193-196

van der Waal B, Bills R (2000) *Oreochromis niloticus* (teleostei: Cichlidae) now in the limpopo river system. *S Afr J Sc* 96:47-48

Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997) Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277:494-499

Xu DH, Shoemaker CA, Klesius PH (2007) Evaluation of the link between gyrodactylosis and streptococcosis of nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J Fish Diseases* 30:233-238

## **PARTIE II**

---

### **Zones d'introductions hors d'Afrique**

**Génétique des populations, variation morphologique et  
parasitologie des populations introduites**

## **SECTION II-1.**

# **Origine phylogéographique, diversité, structure génétique et hétérogénéité génomique des populations envahissantes**

### **RAPPEL DU CONTEXTE**

Les données historiques rapportent que les populations d'*O. mossambicus* étudiées dans cette partie proviennent d'une souche de Java, probablement fondée à partir de cinq individus (Voir introduction section i-2). La Figure II-1.A ci-après rappelle l'histoire des populations étudiées d'après le recueil de données de Fishbase (2011). Les données sur le nombre d'individus fondateurs sont disponibles seulement pour la Nouvelle-Calédonie, avec 40 individus provenant des Philippines initialement introduits à Port-Laguerre, puis acclimatés en 1957 et 1958 dans deux marais la Plaine des Lacs (représentée ici par les sites de Grand Lac et Lac en Huit). Aucune donnée aussi détaillée ne semble disponible pour les deux autres îles étudiées.

### **OBJECTIFS ET QUESTIONS**

- (1) Décrire l'histoire récente des populations introduites d'*O. mossambicus* en Nouvelle-Calédonie et aux Caraïbes (Guadeloupe et Jamaïque). Est-ce qu'un seul événement d'introduction est bien à l'origine de la colonisation de ces îles ? De quelle(s) zone(s) géographique(s) de l'aire d'origine les populations introduites dérivent-elles ?

- (2) Comparer la diversité génétique des populations introduites à celle des populations natives. Les populations introduites portent-elles la trace d'un goulot d'étranglement significatif ?
- (3) Décrire les patrons de divergence génétique à l'échelle globale et locale chez les populations introduites. Les patrons de différenciation génétique chez les populations introduites sont-ils liés à leur distribution géographique à large échelle ? Inversement, peut-on détecter des introductions multiples au sein des territoires envahis ?
- (4) Peut-on détecter sur une échelle de temps contemporaine une hétérogénéité de la différenciation au sein du génome (i.e. degrés de différenciation variables entre locus)? Si oui, un lien existe-t-il entre les patrons de différenciations extrêmes (i.e. loci dits '*outliers*') et les conditions du milieu indiquant un évènement de sélection récent ? Est-ce que l'hétérogénéité de la divergence intra-génomique diffère entre populations natives et entre populations introduites (i.e. comparaisons de l'hétérogénéité au sein du génome) ?

## MATERIEL ET METHODES

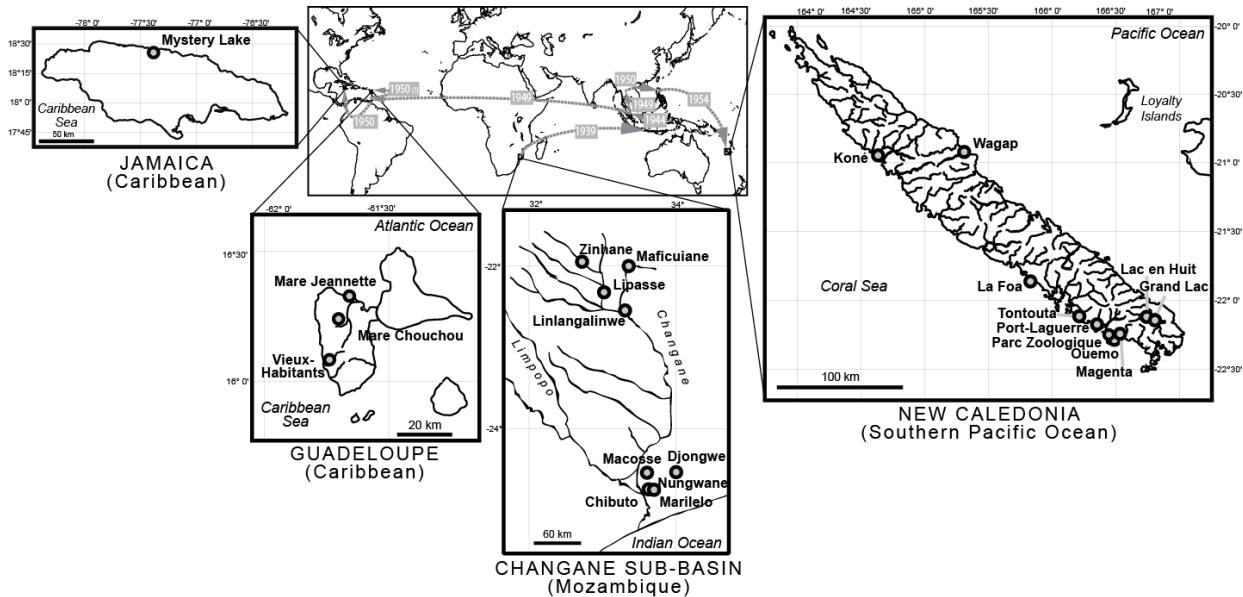
### Obtention des données génétiques

Pour l'obtention des données génétiques (séquence partielle de la région contrôle de l'ADNmt et AFLPs) le protocole utilisé est strictement identique à ceux décrits dans la partie I-1 (les jeux de données traités en partie I-1 et ci-dessous ont été obtenus simultanément). Le lecteur est invité à se référer à la partie I-1 pour plus d'informations.

Le nombre d'individus séquencés et génotypés par localité est indiqué dans le tableau II-1-A. Au total 495 individus ont été génotypés (185 pour l'aire native et 310 pour l'aire d'origine) sur 303 loci AFLP polymorphes et 186 individus ont été séquencés (94 pour l'aire

native et 92 pour l'aire d'origine). Les populations échantillonnées, leurs effectifs respectifs sont présentés dans le tableau II-1.A et leur distribution géographique en figure II-1.A.

**Figure II-1.A.** Geographical location of the sampled populations. Grey arrows on the central panel summarized the routes of introduction for the sampled populations according to [fishbase.org](http://fishbase.org).



## Analyse de données

### *ADNmt*

Les séquences analysées dans cette partie sont indiquées dans l'annexe S1 (numéros d'accès GenBank et les numéros d'individus pour les individus nouvellement séquencés et non encore déposées). La diversité par localité est estimée au travers de la diversité haplotypique et de la diversité nucléotidique (Nei, 1987) calculées respectivement avec une routine personnelle en R et avec le package *pegas* (Paradis, 2010). Le nombre d'haplotypes total et par site est extrait à l'aide de la fonction *haplotype()* de *pegas*.

Les séquences obtenues sont comparées aux séquences issues de GenBank dans un cadre phylogénétique. Les approches en maximum de parcimonie (MP) et maximum de vraisemblance (MV) sont utilisées pour une reconstruction de la phylogénie des haplotypes. La fonction *optim.parsimony()* du package R *phangorn* (Schliep, 2011) –utilisant l'algorithme

de Fitch et la procédure de réarrangement *nearest neighbour interchange*– est utilisée pour sélectionner l’arbre le plus parcimonieux. Pour l’analyse en maximum de vraisemblance, un modèle d’évolution de séquence est préalablement sélectionné à l’aide de programme jModelTest (Posada 2008) en se basant sur les critères d’information d’Akaike (AIC) et Bayésien (BIC). Les valeurs de confiance pour les clades sont estimées sur 1000 *bootstraps* pour les deux analyses (MP et MV).

**Tableau II-1.A.** List of sampled localities, including the corresponding number of individuals included in each analysis and the parameters of genetic diversity.

Geographic area	Locality	Code	Saline waters	Coordinates	AFLP					mtDNA					
					N	H <sub>j</sub>	SD-H <sub>j</sub>	PLP	SD- PLP	N	Nhap	H <sub>d</sub>	SD-H <sub>d</sub>	π	SD-π
Mozambique	Djongwe	DJO	-	S24°31'22.2" E33°56'29.4"	17	0.0498	0.0041	0.1985	0.0184	11	6	0.7273	0.1444	0.0128	0.0035
	Macosse	MAC	-	S24°30'37.3" E33°45'10.2"	27	0.0339	0.0024	0.1255	0.0155	12	3	0.7121	0.0691	0.0092	0.0025
	Nungwane	NUN	-	S24°37'25.9" E33°35'26.6"	25	0.0493	0.0044	0.1684	0.0224	12	6	0.8788	0.0595	0.0107	0.0029
	Marilelo	MAR	-	S24°37'33.4" E33°35'16.6"	27	0.0540	0.0038	0.2047	0.0281	9	5	0.8611	0.0872	0.0104	0.0030
	Zinhane	ZIN	-	S22°20'19.3" E33°04'04.3"	37	0.0535	0.0032	0.2148	0.0217	12	6	0.8485	0.0744	0.0085	0.0023
	Lipasse	LIP	-	S22°28'18.4" E33°02'30.0"	28	0.0424	0.0044	0.1491	0.0227	13	4	0.7179	0.0888	0.0083	0.0022
	Linlangalinwe	LIN	-	S22°39'06.1" E33°17'21.2"	24	0.0437	0.0035	0.1399	0.0176	13	8	0.8590	0.0886	0.0077	0.0020
	Maficuinae	MAF	-	S22°13'02.6" E33°19'33.4"	27	0.0562	0.0050	0.2035	0.0280	12	4	0.7121	0.1053	0.0065	0.0017
	New Caledonia	La Foa	FOA	No	S21°42'21.1" E165°48'12.9"	13	0.0264	0.0053	0.0932	0.0192	4	1	0	0	0
New Caledonia	Grand Lac	GLA	No	S22°16'18.5" E166°53'05.2"	19	0.0229	0.0029	0.0914	0.0124	10	1	0	0	0	0
	Lac en Huit	HUI	-	S22°15'19.1" E166°51'11.6"	6	0.0171	0.0024	0.0385	0.0071	3	1	0	0	0	0
	Koné	KON	Yes	S21°04'55.7" E164°50'46.1"	36	0.0206	0.0027	0.0844	0.0212	9	1	0	0	0	0
	Magenta	MAG	Yes	S22°15'06.5" E166°28'34.5"	20	0.0228	0.0041	0.0636	0.0209	4	1	0	0	0	0
	Ouemo	OUE	Yes	S22°15'23.9" E166°54'24.5"	21	0.0224	0.0021	0.0637	0.0095	9	1	0	0	0	0
	Port-Laguerre	PLA	-	S22°06'09.4" E166°19'12.8"	3	0.0104	0.0047	0.0156	0.0070	3	1	0	0	0	0
	Tontouta	TON	No	S22°02'27.1" E166°13'01.8"	24	0.0215	0.0021	0.0656	0.0090	7	1	0	0	0	0
	Wagap	WAG	Yes	S20°52'15.7" E165°15'43.5"	41	0.0197	0.0017	0.0539	0.0102	6	1	0	0	0	0
	Parc Zoologique	ZOO	No	S22°15'25.0" E166°27'21.4"	38	0.0209	0.0018	0.0788	0.0112	7	1	0	0	0	0
Guadeloupe	Vieux-Habitants	HAB	-	N16°03'24.5" O61°44'52.6"	20	0.0209	0.0016	0.0568	0.0066	6	1	0	0	0	0
	Mare Jeannette	JEA	-	N16°18'15.3" O61°38'29.9"	25	0.0238	0.0025	0.0740	0.0135	7	1	0	0	0	0
	Mare Chouchou	MCH	-	N16°13'15.7" O61°39'40.9"	26	0.0289	0.0030	0.0930	0.0158	8	1	0	0	0	0
Jamaica	Mystery Lake	MYS	-	N18°27'36.9" O77°22'48.6"	18	0.0193	0.0021	0.0778	0.0102	9	1	0	0	0	0

N: number of individuals, SD: standard deviation.

AFLP: H<sub>j</sub>: Nei gene diversity, PLP: proportion of polymorphic loci at 5%.

mtDNA: Nhap: number of different haplotypes, H<sub>d</sub>: haplotype diversity, π: nucleotide diversity

Saline water (Yes/No) is estimated from water conductivity (*saline* water localities present a water conductivity exceeding 30 S/m) for New-Caledonia. Only mentioned for samples used in the pairwise genome scan comparisions.

## *AFLPs*

Estimation de la diversité et du niveau de polymorphisme. Deux estimateurs de la diversité génétique au sein de chaque localité sont utilisés : (i) la diversité génétique de Nei (1978) obtenue avec la méthode bayésienne de Zhivotowsky (1999) (DZ) avec AFLP-SURV (Vekemans et al., 2002) et (ii) la proportion de loci polymorphes à 95% (PLP) au sein d'une population (voir Bonin et al., 2007) calculée à l'aide d'une routine en *R*. Le premier estimateur (DZ) est basé sur les fréquences alléliques estimées tandis que le second (PLP) est un estimateur direct du polymorphisme moyen basé sur la fréquence des phénotypes (ou bandes) pour chaque locus. L'utilisation conjointe de ces deux types d'approches a pour intérêt d'englober les deux « philosophies » (Bonin et al., 2007) généralement utilisées pour estimer la diversité génétique avec des marqueurs dominants : une basée sur les fréquences alléliques estimées au sein des populations (DZ) et l'autre centrée au niveau des génotypes individuel sans estimation des fréquences alléliques (PLP) (voir Bonin et al. 2007).

Structuration de la variation génétique. Une analyse de variance moléculaire hiérarchique (AMOVA, Excoffier et al., 1992) est effectuée dans *pegas* à partir d'une matrice de *simple matching distances* entre individus. Les deux niveaux hiérarchiques pris en compte sont l'aire géographique (Mozambique, Nouvelle-Calédonie, Guadeloupe et Jamaïque) et les localités d'échantillonnage au sein de chacune de ces aires. Les deux niveaux sont par conséquent considérés comme confondus pour la Jamaïque où une seule localité est disponible. L'analyse est alors répétée en retirant la population de Jamaïque afin que les deux niveaux de variation soient pleinement nichés. La significativité des termes pour chaque analyse est basée sur 10000 permutations.

Une phylogénie des populations étudiées est estimée sur la base des distances de Nei (Nei, 1972) calculée à partir des fréquences alléliques estimées selon Zhivotovsky (1999) à l'aide du script *R* de R.G. Reynolds (2011, [http://web.utk.edu/~rreyno16/He\\_AFLP.r](http://web.utk.edu/~rreyno16/He_AFLP.r)). Une

matrice de distances de Nei est obtenue à l'aide d'une routine personnelle en *R*. A partir de la matrice de distance, une phylogénie *neighbour joining* est estimée dans *ape* (Paradis et al., 2004). La robustesse des nœuds est évaluée sur 1000 *bootstraps* et un arbre consensus à 50% est finalement construit.

Le logiciel STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003; 2007) est utilisé pour tester la présence d'un patron de *clustering* dans le jeu de données. Afin de détecter le nombre optimal de cluster ( $K$ ), l'analyse est répétée quatre fois pour chaque valeur de  $K$  entre 1 et 22 (le nombre de localités échantillonnées). Chaque analyse est composée de 200000 répétitions MCMC (Markov Chain Monte Carlo) précédées d'une étape de *burn-in* de 50000 pas. Le nombre optimal de cluster est ensuite estimé suivant le critère  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005). Une analyse supplémentaire plus longue est ensuite effectuée afin d'estimer l'assignation des individus (valeurs de  $Q$ ). Elle est composée de 100000 pas et de 500000 pas MCMC. La procédure précédemment décrite est effectuée à la fois pour le modèle original de STRUCTURE ne prenant pas en compte d'*a priori* sur la localisation des échantillons (Pritchard et al., 2000) et pour le modèle avec *a priori* (option LOCPRIOR) suivant Hubisz et al. (2009). Afin de tester la présence d'une structure génétique à une échelle plus fine entre populations introduites, une approche identique est utilisée sur un sous ensemble du jeu de données comprenant seulement les 14 localités échantillonnées hors de l'aire native. Ce sous-ensemble comprend 310 individus et 153 loci polymorphes.

Scan génomique et estimation de l'hétérogénéité intra-génomique des patrons de divergence. Les populations de Nouvelle-Calédonie ayant été échantillonnées dans des conditions de salinité variables, un scan génomique a été réalisé afin de détecter la présence de marqueurs influencés par la sélection divergente en lien avec les variations de salinité. Les scans génomiques se basent sur le principe du test de Lewontin & Krakauer (1973) qui assume que les loci étudiés partagent une même histoire démographique et que la

différenciation ( $F_{ST}$ ) sur l'ensemble du génome sera par conséquent affectée de façon uniforme par ces évènements démographiques. Au contraire, un effet sélectif affectera quelques loci particuliers qui se caractériseront par des degrés de divergence plus fort que la neutralité (voir Beaumont, 2005; Storz, 2005; Nosil et al., 2009). Dans ce contexte, les marqueurs anonymes utilisés ici (AFLP), ne doivent pas être considérés comme de potentielles cibles directes de la sélection (Stinchcombe & Hoekstra, 2008), mais comme des loci potentiellement liés physiquement à des régions fonctionnelles sous sélection, et divergeant donc sous l'effet du phénomène d'auto-stop génétique lié à l'intensité de la sélection et au taux de recombinaison au sein de régions considérées (Storz, 2005; Nosil et al., 2009).

Le logiciel BAYESCAN (Foll & Gaggiotti, 2008) a été utilisé pour détecter des loci sous divergence non neutre ou loci dits *outliers* entre paires de populations. Brièvement, BAYESCAN se base sur des régressions logistiques où l'effet sur la différenciation ( $F_{ST[ij]}$ ) est séparé en deux composantes : l'effet locus ( $\alpha_i$ ) et l'effet population ( $\beta_j$ ). Les modèles considérant et ne considérant pas l'effet locus sont comparés dans un contexte bayésien qui permet d'estimer la probabilité qu'un locus donné soit sous sélection. Deux autres méthodes sont couramment utilisées : DETSEL (Vitalis et al., 2003) et DFDIST (Beaumont & Nichols, 1996). Une étude récente a comparé ces trois approches sur la base de données simulées (Perez-Figueroa et al., 2010). Ces auteurs montrent que BAYESCAN fournit les meilleurs taux de détection pour des loci sous sélection tout en ayant le plus faible taux de faux positifs (loci neutres détectés comme sous sélection). De plus, la proportion d'*outliers* détectés par BAYESCAN est généralement corrélée à la proportion effective de loci sous sélection. Ces informations conduisent à limiter la présente analyse aux résultats fournis par BAYESCAN. Une approche empirique récente (Tice & Carlon, 2011), justifie le choix de BAYESCAN en montrant que l'approche DFDIST, encore la plus couramment utilisée, tend à générer des faux positifs.

L’analyse BAYESCAN est effectuée sur les échantillons de huit localités (quatre en eaux douces et quatre en eaux salées ou saumâtres), les échantillons de Port-Laguerre et Lac en Huit, n’ont pas été considérées du fait de leurs faibles effectifs. Les loci outliers sont déterminés suivant :  $\log_{10}(\text{Facteur bayésien } \alpha_i) > 2$  (soit :  $(P[\alpha_i] \neq 0) > 0.99$ ) (FollGag, PerezFigeroa).

Afin de déterminer si les patrons d’hétérogénéité intra-génomique de la divergence diffèrent entre l’aire native et les deux territoires envahis (Nouvelle-Calédonie et Guadeloupe), la diversité des degrés de différenciation au sein du génome est visualisée en comparant la distribution des  $F_{ST}$  globaux des 303 loci au sein de chaque aire géographique (exceptée la Jamaïque). Les  $F_{ST}$  par loci sont obtenus avec BAYESCAN. Un test global pour la détection de loci *outlier* au sein de chaque aire géographique est également effectué suivant le critère décrit ci-dessus.

## RESULTATS

### -ADNmt

Un seul haplotype est mis en évidence parmi les échantillons des populations introduites tandis que 3 à 8 haplotypes sont présents par localité sur l’aire d’origine avec des valeurs de diversités haplotypiques et nucléotidiques élevées (Tableau II-1.A).

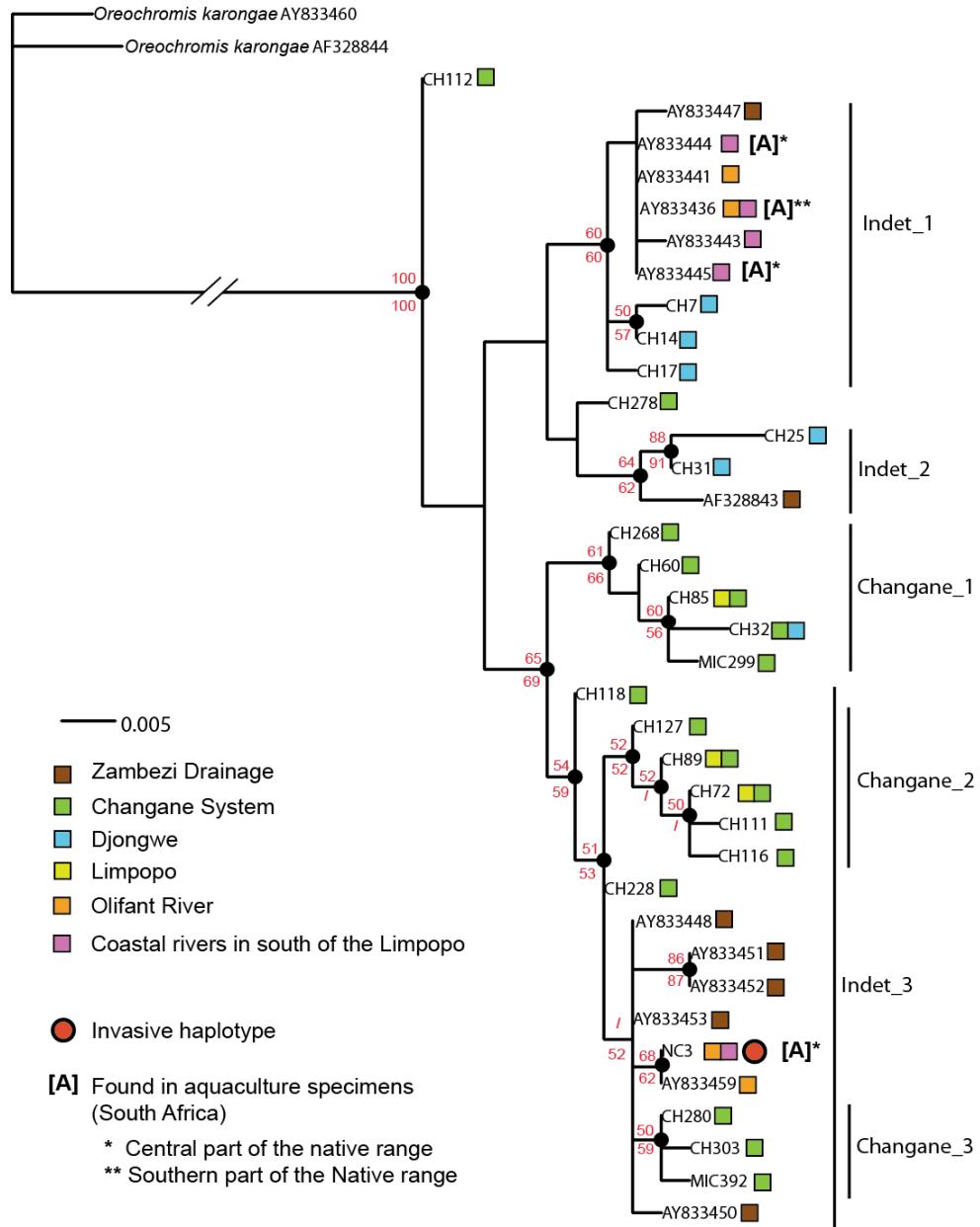
Incluant les séquences de GenBank, un total de 36 haplotypes sont mis en évidence pour *O. mossambicus* parmi lesquels 22 sont ici nouvellement documentés (voir aussi partie I-1.). L’haplotype unique commun aux populations de Guadeloupe, Nouvelle-Calédonie et Jamaïque est également documenté hors de l’aire d’origine chez un spécimen d’*O. mossambicus* d’Australie (Page & Hughes, 2010) (GenBank #HM006940, 1/1 individus séquencés). Sur l’aire d’origine, cet haplotype est documenté dans la rivière Olifant (#AY833454, 1/5 individus séquencés, D’Amato et al., 2007) affluent du Limpopo, sur des

individus d'aquaculture prélevés dans le bassin de l'Inkomati (« Valley Farm », #AY833455 et #AY833456, 2/2 individus séquencés, D'Amato et al., 2007) et dans un second site aquacole situé en Afrique du Sud (« Amakitulu » #AY833457 et #AY833458, 2/2 individus séquencés, D'Amato et al., 2007).

L'analyse phylogénétique des 36 haplotypes d'*O. mossambicus* (Figure II-1.C) peut être décrite au travers de quatre groupes monophylétiques principaux soutenus tant en MP qu'en MV (i.e. valeurs de bootstrap >50%). Le groupe Indet\_1 rassemble un haplotype provenant du système du Zambèze au nord et des haplotypes de l'aire centrale (i.e. Olifant, fleuves côtiers au sud du Limpopo), et des individus du lac de Djongwe (géographiquement proche mais génétiquement différencié du système de la Changane, voir partie I-1.). Le groupe Indet\_2 rassemble trois haplotypes, deux de Djongwe et un du Zambèze. Indet\_3 contient l'haplotype retrouvé chez des populations envahissantes, qui est associé à un autre haplotype de la rivière Olifant (#AY833459). Ce groupe rassemble en plus des haplotypes de la Changane (Groupes Changane\_2 et Changane\_3) et du Zambèze.

Globalement, une faible résolution phylogéographique émerge de l'analyse de ce fragment de la région contrôle. La plupart des haplotypes de la Changane/Limpopo inférieur/Djonwe se rassemblent néanmoins en trois clades homogènes mais différenciés (Changane\_1, 2 et 3), indiquant une possible unité phylogéographique pour cette zone.

**Figure II-1.B.** Maximum likelihood tree (HKY + G model, transition: transversion 14.180; gamma distribution shape parameter 0.061) for *Oreochromis mossambicus* based on 383 bp of the mtDNA control region. Two *Oreochromis karongae* sequences were taken as outgroups. Bootstrap values based on 1000 bootstrap replicates are indicated in red. Bootstrap support values refer to maximum likelihood (bottom) and maximum parsimony (top). Values <50% are marked with “ / ” or are not marked when there was no value above 50% in any of the analyses. Nodes with more than 50% bootstrap support value for the ML tree are highlighted with black circles.



### -AFLP

Les AFLPs (Tableau II-1.A) indiquent une diversité génétique ( $H_j$ ) réduite de plus moitié en moyenne sur l'aire introduite ( $H_j = 0.023$ ) par rapport à la diversité observée sur l'aire d'origine ( $H_j = 0.048$ ), (du fait de leur faible effectif, les sites de Lac en Huit et Port-Laguerre sont exclus du calcul de ces moyennes ainsi que des moyennes et comparaisons suivantes). Un résultat similaire est obtenu avec la proportion de loci polymorphes ( $PLP_{natif} = 0.172$  et  $PLP_{introduit} = 0.074$ ). Ces différences sont significatives (Tests de Wilcoxon,  $P < 0.001$  pour  $H_j$  comme pour  $PLP$ ). En revanche aucune différence de diversité n'est détectée au sein de l'aire d'origine lorsque les populations des Caraïbes (Guadeloupe et Jamaïque) sont comparées aux populations de Nouvelle-Calédonie (Tests de Wilcoxon,  $P > 0.2$  pour  $H_j$  come pour  $PLP$ ).

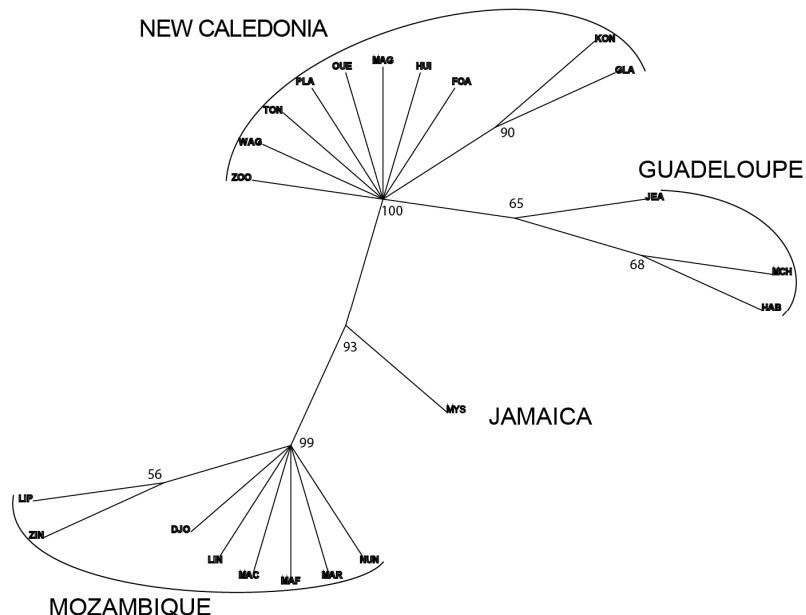
Que la population de Jamaïque soit ou non considérée, les AMOVAs fournissent des résultats similaires (Tableau II-1.B). Aucun patron significatif de divergence entre aires géographiques n'est détecté bien que la plus grande part de variance expliquée par les modèles (entre 13 et 14%) se situe à ce niveau. La divergence entre localités au sein des aires géographiques n'explique qu'une faible part de la variation moléculaire (~2%).

**Tableau II-1.B.** Analyses of molecular variance (AMOVA) of AFLP variation. The among areas factor account for variation between Mozambique, New Caledonia, Guadeloupe and Jamaica (except in the second analysis for which this last area was excluded).

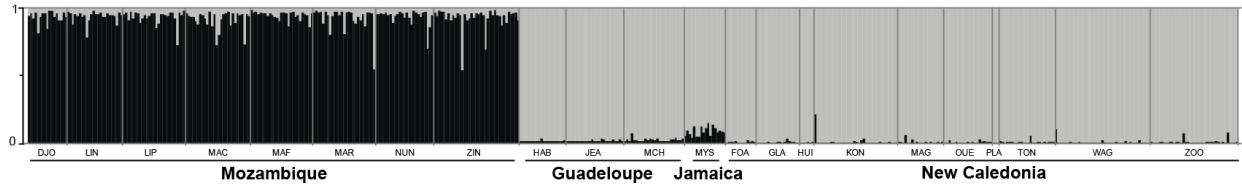
Source of variation	d.f.	Sum of Squares	Variance components	% of variation	Variance coefficients	P-value
<b>With Jamaica</b>						
Among areas	3	0.9531547	0.0026239	13.24854079	23.52912	0.504
Among localities within areas	18	0.4896405	0.0004448	2.245874821	23.71417	1
Within localities	500	8.3682451	0.0167365	84.50558439	110.68582	
Total	521	9.8110403	0.0198052	100		
<b>Without Jamaica</b>						
Among areas	2	0.9200428	0.00280315	13.8743015	23.52912	0.5053
Among localities within areas	18	0.4896405	0.00043506	2.153346631	26.40459	1
Within localities	483	8.1944277	0.01696569	83.97235187	153.95833	
Total	503	9.604111	0.0202039	100		

Un effet de la géographie à large échelle est également mis en évidence à partir de la phylogénie basée sur les distances génétiques entre populations (Figure II-1.C). Les échantillons du Mozambique, Guadeloupe et Nouvelle-Calédonie forment respectivement trois groupes distincts soutenus par de fortes valeurs de bootstrap. Au sein de populations introduites, une proximité apparaît entre les populations de Guadeloupe et de Nouvelle-Calédonie (support du groupe 100%), tandis que la population de Jamaïque est plus distante et semble plus proche des populations natives du Mozambique. D'après cette analyse les patrons de différenciation sont, pour la plupart, peu robustes au sein de chaque aire géographique ou peu en rapport avec la distribution géographique des populations au sein de chaque territoire, excepté pour le groupe Lipasse-Zinhane (deux localités proches dans la partie supérieure de la Changane).

**Figure II-1.C.** Unrooted 50% majority-rule consensus neighbor-joining tree of populations. Values at nodes indicate clade supports based on 1000 bootstrap replicates. Branch lengths are arbitrary.



**Figure II-1.D.** Bayesian clustering of native and invasive *O. mossambicus* individuals ( $Q$ -values) according to STRUCTURE assuming two inferred clusters ( $K=2$ ) and the LOCPRIOR option giving priors to the geographic area of origin. Each vertical bar represents an individual specimen and grey and black colors the probability of membership to each of the clusters.



L’analyse avec STRUCTURE indique un nombre optimal de cluster à  $K = 2$  avec ou sans prise en compte des *a priori* sur les populations échantillonnées (Annexe S2). Seuls les résultats obtenus avec ces *a priori* sont présentés (option LOCPRIOR). La distribution des probabilités d’assignation aux deux clusters indique une distinction claire entre les populations natives et les populations introduites (Figure II-1.D). La plupart des individus est assignée à l’un des deux clusters avec une forte probabilité, même si de plus faibles probabilités d’assignations au cluster des populations introduites semble apparaître pour les individus de Jamaïque. Des résultats similaires, bien que moins nets, sont fournis par la même analyse effectuée sans *a priori* sur les l’origine des échantillons (Annexe S3). Une analyse effectuée uniquement sur les populations introduites (option LOCPRIOR), ne détecte aucun patron de *clustering* au sein de l’aire d’introduction ( $K = 2$ , le plus vraisemblable [Annexe S4] présenté en Annexe S5)

Le tableau II-1.C. résume les résultats du scan génomique AFLP. Entre 48 et 76 loci polymorphes (63 en moyenne) ont pu être considérés par comparaison des populations deux à deux. Aucune des 28 comparaisons n’a révélé de loci potentiellement soumis à sélection.

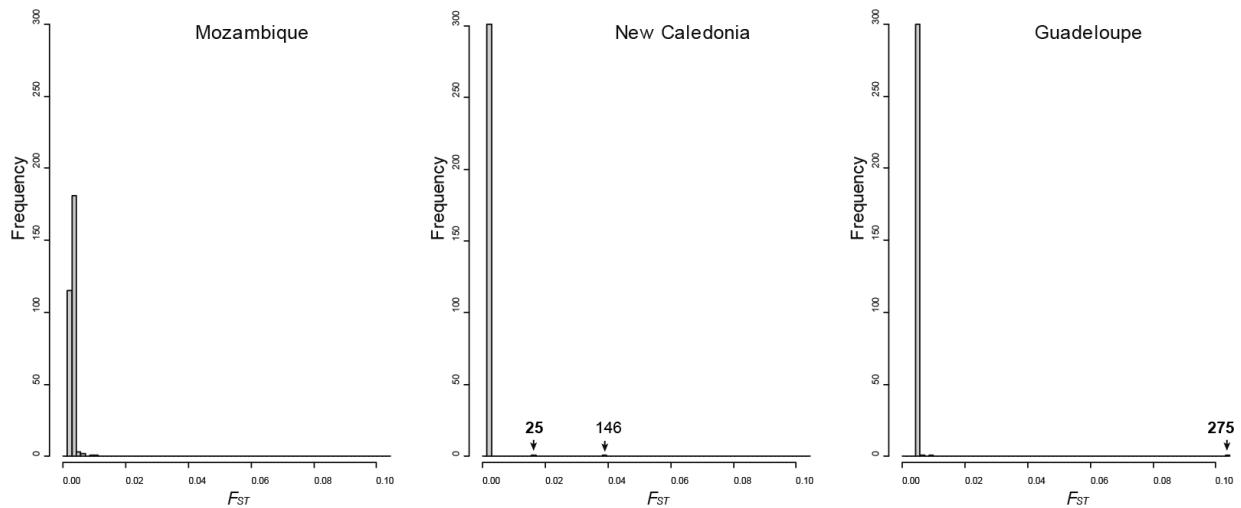
**Tableau II-1.C.** BAYESCAN results for 28 pairwise comparisons between height populations of New Caledonia.

	Number of polymorphic loci	Number of outliers
<b>Saltwater-Freshwater comparisons</b>		
1 ZOO-WAG	65	0
2 ZOO-OUE	57	0
3 ZOO-MAG	67	0
4 ZOO-KON	73	0
5 TON-WAG	61	0
6 TON-OUE	49	0
7 TON-MAG	67	0
8 TON-KON	67	0
9 GLA-WAG	62	0
10 GLA-OUE	48	0
11 GLA-MAG	64	0
12 GLA-KON	66	0
13 FOA-WAG	66	0
14 FOA-OUE	55	0
15 FOA-MAG	66	0
16 FOA-KON	71	0
<b>Freshwater-Freshwater comparisons (4 populations)</b>		
17 ZOO-TON	60	0
18 ZOO-GLA	59	0
19 ZOO-FOA	64	0
20 TON-GLA	54	0
21 TON-FOA	58	0
22 GLA-FOA	57	0
<b>Saltwater-Saltwater comparisons (4 populations)</b>		
23 WAG-OUE	59	0
24 WAG-MAG	71	0
25 WAG-KON	75	0
26 OUE-MAG	62	0
27 OUE-KON	62	0
28 KON-MAG	76	0

La comparaison de distribution des  $F_{ST}$  pour chaque aire géographique (Figure II-1.E) indique une distribution globalement plus étalée pour le Mozambique que pour la Nouvelle-Calédonie et la Guadeloupe. Les distributions des aires envahies se distinguent aussi du Mozambique par la présence de rares loci présentant des  $F_{ST}$  extrêmes (de l'ordre de 10 fois

supérieur aux  $F_{ST}$  moyens). Ces loci ne sont pas identiques entre la Nouvelle-Calédonie et la Guadeloupe (Figure II-1.E). La fréquence des bandes par localité (i.e. phénotype « 1 ») peut potentiellement informer sur le patron obtenu. Pour le loci présentant le plus fort  $F_{ST}$  en Nouvelle-Calédonie (mais cependant pas détecté comme *outlier* selon les critères utilisés), le phénotype est absent sur toute les localités excepté aux sites de La Foa (fréquence = 7.7%, eau douce) et de Wagap (fréquence = 26.8%, eau salée). En Guadeloupe, le phénotype du loci présentant le plus extrême  $F_{ST}$  (détecté comme *outlier*) apparaît dans les trois localités mais à des fréquences variables : 85.0% à Vieux-Habitants, 88.5% à Mare Chouchou et 12.0% à Mare Jeannette.

**Figure II-1.E.** Distribution of the locus-specific  $F_{ST}$  values for the 303 loci for each geographic area with more than one locality. Numbers associated with arrows indicate extreme loci (in bold are the two loci detected as outliers by BAYESCAN). Note that all graphs were drawn at the same scale.



## DISCUSSION

### Une origine phylogéographique des populations envahissantes incertaine

L'analyse phylogénétique des haplotypes d'*O. mossambicus* indique une faible structure phylogéographique sur l'aire d'origine. L'hypothèse phylogéographique localisant

des haplotypes plus basaux dans le bassin du Zambèze et une radiation plus récente vers le sud de l'aire d'origine basée sur 14 haplotypes (D'Amato et al., 2007) n'est pas soutenue par la présente analyse qui inclut 22 haplotypes supplémentaires issus de la région du Limpopo Inférieur. Bien que provenant d'une zone géographique restreinte, les haplotypes nouveaux apparaissent sur toute l'étendue de la phylogénie et sont fortement associés aux haplotypes précédents. Des clusters apparaissant entre haplotypes du Limpopo inférieurs suggèrent néanmoins une unité phylogéographique pour cette zone.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence d'un patron phylogéographique général clair au Mozambique. Premièrement, l'histoire hydrologique récente de la partie sud-est de l'Afrique est marquée par la capture de la partie supérieure ancienne du Limpopo par le Zambèze au cours du Pléistocène inférieur ou moyen (voir Goudie, 2005) ce qui aurait rendu possible un transfert d'haplotypes différenciés au sein du paléo-Limpopo vers le bassin du Zambèze. Les datations approximatives (taux constants) des différents évènements de radiation des haplotypes *d'O. mossambicus* indiquent un âge variant entre 0.4 et 0.1 Ma (D'Amato et al., 2007 ; résultats préliminaires personnels non présentés). Cette hypothèse est envisageable à condition que la capture du paléo-Limpopo supérieur ait eu lieu au cours du Pléistocène moyen (0.78-0.13 Ma) ce qui est possible étant donné l'activité tectonique inférée en Afrique Australe à cette période (Guiraud et al., 2010). Deuxièmement, la tolérance d'*O. mossambicus* à l'eau salée permet probablement la dispersion occasionnelle des individus le long des côtes (D'Amato et al., 2007), ce qui aurait pu induire le brassage des haplotypes entre bassins. Le troisième facteur ayant pu induire le brassage d'haplotypes est l'activité humaine par le biais de transfert d'individus à des fins aquacoles ce qui aurait par exemple pu se produire pour des *Oreochromis* sp. entre le Malawi et la région du Cap (voir D'Amato et al., 2007).

Ces différents points, et en particulier le dernier, rendent incertain l'identification de la zone d'origine de l'haplotype introduit d'*O. mossambicus* dispersé en Nouvelle-Calédonie, aux Caraïbes et en Australie. Sur l'aire d'origine, la présence de cet haplotype seulement (i) dans la rivière Olifant, un tributaire du Limpopo, dont la plus grande partie du bassin se situe en Afrique du Sud et (ii) dans des sites aquacoles situés dans des fleuves côtiers de la partie centrale de l'aire d'origine (Valley Farm et Amakitulu, voir Figure 1 *in* D'Amato et al., 2007) tend à exclure le Zambèze ou la partie la plus austral de l'aire de distribution native comme sources des populations envahissantes. De plus cet haplotype est très proche (une substitution) d'un second haplotype documenté dans le sous bassin de l'Olifant. La partie centrale de l'aire native (incluant des rivières côtières au sud du Limpopo et le sous-bassin de l'Olifant) peut donc être considérée comme la zone d'origine de l'haplotype introduit à condition de considérer que les haplotypes présents dans cette zone n'y ont pas été introduits récemment. La proximité phylogénétique de ces haplotypes avec des haplotypes présents dans le bassin du Zambèze au nord conduit donc à considérer avec prudence cette conclusion.

### **Une différenciation à large échelle géographique en dépit d'une forte homogénéité génétique**

Une structure géographique de la diversité génétique est détectée. Deux points émergent de l'analyse AFLP des populations envahissantes : (i) une relative homogénéité génétique globale associée à une faible diversité intra-population et (ii) la présence d'un patron de divergence inter-population à large échelle géographique. L'analyse de l'ADN nucléaire, en accord avec celle de l'ADNmt, soutient que les populations d'*O. mossambicus* dispersés à l'échelle mondiale partagent une même base génétique globalement peu diversifiée. Ceci est en accord avec une étude récente (McKinna et al., 2010) qui indique un seul haplotype pour une population d'*O. mossambicus* australienne ( $N = 29$ ) (séquence non

incluse dans la présente analyse). Ces résultats sont aussi compatibles avec les données historiques disponibles qui indiquent que les *O. mossambicus* dispersés à l'échelle mondiale seraient issus d'un même stock prélevé sur l'île de Java, Indonésie (Atz 1954). Plus précisément, le stock de Java serait issu de seulement cinq individus récoltés sur la côte sud de l'île, dont deux auraient pû être des femelles (Schuster, 1952; Atz, 1954). Les données historiques et génétiques concordent pour indiquer qu'un effet fondateur incluant un goulot d'étranglement génétique important est donc bien à la base des populations d'*O. mossambicus* introduites à l'échelle mondiale.

Une structure génétique des populations introduites faible, mais bien soutenue par l'analyse des distances génétiques entre populations, a émergé en moins de 70 ans. Cela indique que suffisamment de diversité au niveau du génome nucléaire restait disponible au sein de la population source de Java (et plus précisément de la source de Malaisie dont dériveraient les populations étudiées, Fishbase, 2011) pour permettre la différenciation rapide au niveau génomique entre les souches introduites en Jamaïque, Guadeloupe et Nouvelle-Calédonie. L'histoire récente des populations envahissantes étudiées a été schématisée en Figure II-1.A d'après Fishbase (2011). Elle indique que les populations de Jamaïque, Guadeloupe et Nouvelle-Calédonie ont respectivement subit au moins deux, deux et trois effets fondateurs depuis leur dispersion à partir d'une source commune introduite en Malaisie. Ces effets fondateurs associés à des phases de dérive génétique peuvent être considérés comme à l'origine de la divergence génétique entre aires géographiques, ainsi que des patrons de divergence morphologique à large échelle géographique précédemment documentés chez les populations envahissantes (Firmat et al., sous presse, cf. Section II-2).

Les analyses génétiques indiquent que la colonisation de chacun de ces territoires résulte vraisemblablement d'un seul évènement d'introduction, ce qui est également en accord avec les données historiques (Fishbase, 2011). Ces résultats contrastent avec des études

précédentes qui documentent l’hybridation d’*O. mossambicus* hors d’Afrique avec d’autres espèces introduites du même genre (e.g. De Silva & Ranasinghe, 1989; Costa-Pierce, 2003; McKinna et al., 2010). Par conséquent, le succès de l’invasion par *O. mossambicus* n’est pas nécessairement lié à des introductions multiples suivies d’un brassage génétique entre les sources introduites et formation de nouveaux génotypes comme cela est documenté chez plusieurs cas d’invasions biologiques (e.g. Kolbe et al., 2004; Facon et al., 2005; Facon et al., 2008; Kolbe et al., 2008; Lucek et al., 2010). Cette faible variation génétique ne semble donc pas avoir contraint la persistance d’*O. mossambicus* dans les zones où l’espèce a été introduite et où la pression de propagule ne semble pas être la clef du succès invasif de cette espèce. Il pourrait s’agir, au contraire, de la capacité d’*O. mossambicus* à établir des populations viables dans des conditions environnementales diverses en dépit d’une très faible diversité génétique<sup>7</sup>. Les populations d’*O. mossambicus* introduites ont très probablement été affectées par la dépression de consanguinité à au moins une étape du phénomène d’invasion. Cela a probablement eu pour conséquence un épisode de « purge » d’allèles récessifs délétères pouvant être responsables d’une dépression de consanguinité et exposés à la sélection par un excès d’homozygotes (pour une synthèse récente : Allendorf et al., 2010) Une telle étape aurait pu augmenter la capacité de la souche introduite à persister et à former des populations viables après de forts goulots d’étranglement lors des introductions ultérieures sur de nouveaux territoires.

---

<sup>7</sup> Par exemple, le site du Parc Zoologique de Nouméa (ZOO) est constitué d’un bassin d’eau douce situé en hauteur (pas de migration possible) qui est vidangé totalement de façon régulière. Les gestionnaires du parc notent malgré cela la persistance d’une population d’*O. mossambicus* (possiblement issue d’alevins persistant dans la vase). Cela suggère que la population échantillonnée a probablement subit une succession de goulots d’étranglement et illustre la capacité d’*O. mossambicus* à générer rapidement des densités de populations élevées à partir d’un faible nombre d’individus fondateurs.

## **Effet de l'invasion sur l'hétérogénéité des patrons de divergence au niveau génomique**

Le scan génomique AFLP entre populations deux à deux n'a révélé aucun marqueur potentiellement sous sélection en Nouvelle-Calédonie, bien que les populations étudiées soient établies dans des conditions environnementales très variables, en particulier en ce qui concerne la salinité. Un résultat contraire aurait pu être attendu puisque des bases génétiques de la réponse des tilapias à la salinité et à ses variations sont connues (Streelman & Kocher, 2002; Agnèse et al., 2008). En effet, le polymorphisme de longueur d'un microsatellite di-nucléotide situé dans le promoteur du gène *prolactin 1 (prl 1)* affecte l'expression de ce gène et a été reconnu comme ayant des conséquences positives sur le taux de croissance des tilapias dans des conditions salines (Streelman & Kocher, 2002). La comparaison entre des populations d'une espèce de tilapia d'eau douce (*Oreochromis niloticus*) et d'une espèce tolérante à la salinité (*Sarotherodon melanotheron*) indique la perte totale de polymorphisme à ce locus chez la seconde espèce ce qui suggère un effet sélectif lié aux conditions de salinité extrêmes et/ou variables (Agnèse et al., 2008). Dans ce contexte deux hypothèses (non exclusives, **H1** et **H2** ci-dessous) peuvent être avancées pour expliquer qu'aucun loci *outlier* n'ait été détecté dans les comparaisons de populations deux en deux en Nouvelle-Calédonie :

**(H1)** Les populations de Nouvelle-Calédonie n'auraient pas subi d'effet sélectif significatif depuis leur introduction. Cette hypothèse est envisageable au vu de la faible diversité génétique des populations introduites, limitant l'action de la sélection sur des régions fonctionnelles supposées aussi peu variables. La comparaison de l'hétérogénéité génomique ( $F_{ST}$ ) au sein de chaque aire géographique soutient cette interprétation. La distribution peu étendue des  $F_{ST}$  par locus chez les populations introduites (à l'exception de loci extrêmes, cf. ci-dessous), suggère que les événements démographiques récents ont pu affecter le potentiel à la divergence entre populations introduites sur l'ensemble du génome puisque le patron

d'hétérogénéité des populations natives n'est pas reproduit dans les zones envahies. La contrainte temporelle doit aussi être considérée. En effet le temps écoulé depuis l'introduction (55 ans au maximum)<sup>8</sup> n'aurait pas pu permettre la mise en place de zone de forte divergence génomique, d'autant plus à partir d'une faible variation génétique. Il semblerait que cette étude présente le premier scan AFLP sur des populations introduites récemment (moins de quelques centaines d'années). Un scan génomique récent, basé sur des AFLPs, a mis en évidence des loci sous sélection entre populations de rats noirs (*Rattus rattus*) de Madagascar plus ou moins exposées au bacille de la peste [16 loci *outliers* détectés sur 249 analysés] (Tollenaere et al., 2011). Cependant, la date d'introduction du rat à Madagascar pourrait dater de 3000 ans BP (Tollenaere et al., 2010) ce qui indique un nombre de génération depuis l'introduction clairement supérieur à celui des populations *d'O. mossambicus* de Nouvelle-Calédonie. L'absence d'effet sélectif sur le génome en lien avec la salinité pourrait également être en lié à une possible adaptation antérieure de la souche introduite *d'O. mossambicus* à la résistance à la salinité. Par exemple, le loci impliqué dans la régulation osmotique à des taux de salinité élevés pourrait être déjà fixé chez les populations naturelles sources (ou bien de Java ou de Malaisie) comme cela est le cas pour une autre espèce de tilapia euryhaline *S. melanotheron* (Agnès et al., 2008). Dans ce cas le rôle de la plasticité phénotypique serait à mettre définitivement en avant pour expliquer l'établissement *d'O. mossambicus* dans des conditions de salinités hautement variables et semble possible au vu de résultats expérimentaux obtenus sur une souche (vraisemblablement introduite) *d'O. mossambicus* (Magdeldin et al., 2007).

**(H2) L'approche de genome scan employée ne serait pas assez puissante pour détecter la présence d'*outliers*.** Une cartographie de la liaison génétique de 525 marqueurs microsatellites a estimé à 1311 cM l'étendue du génome chez *Oreochromis* (Lee et al., 2005).

<sup>8</sup> L'âge à la maturité chez *O. mossambicus* varie de 5 à 6 mois à 12 mois environ selon les conditions du milieu (Hodgkiss & Man, 1978). Par conséquent, le nombre de générations écoulées depuis l'introduction devrait être de l'ordre d'une centaine, au maximum.

A partir d'un scan AFLP couplé à une cartographie génétique chez un puceron (*Acyrthosiphon pisum*), Via & West (2008) indiquent que les  $F_{ST}$  de loci physiquement liés à un locus sélectionné peuvent être significativement affectés par autostop génétique dans une région de 10.6 cM autour de ce loci. En considérant, ces données et l'hypothèse que les 303 loci AFLP utilisés sont uniformément répartis dans le génome d'*O. mossambicus*, un calcul grossier suggère que le scan AFLP offre une couverture du génome largement supérieure à sa taille (i.e.  $2 \times 10.6 \text{ cM} \times 303 \text{ loci} = 6423.6 \text{ cM} \gg 1311 \text{ cM}$ ). Cette valeur est probablement surestimée puisque seulement 63 loci polymorphes en moyenne étaient utilisés dans les comparaisons deux à deux. Cependant l'étendue de la couverture génomique reste de taille légèrement supérieure au génome d'*Oreochromis* si seulement 63 marqueurs sont utilisés (i.e.  $2 \times 10.6 \text{ cM} \times 63 \text{ loci} = 1335.6 \text{ cM} \sim 1311 \text{ cM}$ ). Il faut cependant considérer que l'adaptation à partir de la variation génétique préexistante (par opposition à de nouvelles mutations significatives peu probables et donc peu fréquentes à cette échelle de temps) doit affecter par autostop le polymorphisme neutre avoisinant le locus ciblé sur un intervalle relativement étroit du fait de l'histoire adaptative passée de cette région du génome (Barrett & Schluter, 2008). En résumé, le scan AFLP doit fournir un criblage du génome d'*O. mossambicus* relativement fiable, mais il est tout à fait possible qu'une partie du génome ayant récemment divergé sous un régime de sélection directionnelle en Nouvelle-Calédonie, n'est pas été représentée par la couverture génomique utilisée. Bonin et al. (2006) identifient cependant plusieurs loci possiblement impliqués dans l'adaptation à l'altitude chez la grenouille rousse (*Rana temporaria*) dans un contexte similaire: 392 marqueurs AFLP couvrant un génome d'une étendue estimée à environ 1700 cM (Cano et al., 2011). Une étude théorique récente (Feder & Nosil, 2010) indique que les conditions favorisant une hétérogénéité détectable dans la divergence de portions du génome sous un effet d'auto-stop sont des taux de migration et des tailles de populations faibles associées à plusieurs régions fortement soumises à sélection.

Si les deux premières conditions sont probablement remplies pour les populations introduites en Nouvelle-Calédonie, les données disponibles sur les bases génétiques de la résistance à la salinité chez les tilapias ne tendent pas à soutenir la dernière condition (i.e. plusieurs régions soumises à sélection) (Streelman & Kocher, 2002). Même s'il n'est pas à exclure que l'adaptation à la salinité puisse affecter simultanément plusieurs régions du génome, il est envisageable qu'elles ne soient pas couvertes par le scan AFLP.

Les estimations de la couverture génomique relativement à la taille du génome d'*O. mossambicus* tendrait à exclure préférentiellement la seconde hypothèse. Les deux hypothèses ne doivent pas être considérées comme exclusives. Il est par exemple possible que les scans génomiques AFLP s'avèrent peu performants dans des contextes de faibles diversités génétiques comme dans le cas des populations introduites d'*O. mossambicus*. En effet, seulement une partie de l'information sur le polymorphisme est accessible à partir des AFLP (présence/absence de la séquence nucléotidique sur un des allèles de l'individu), alors que des marqueurs co-dominants (microsatellites, SNP) devraient offrir une estimation plus précise de la faible diversité génétique générale et donc des possibles effets sélectifs sur cette diversité.

L'analyse de l'hétérogénéité génomique de la différenciation au sein de chaque aire géographique fournit un patron surprenant en révélant trois loci qui s'écartent fortement du patron général. Cette divergence peut être attribuée à des effets sélectifs encore non identifiés. Cela devra être prochainement testé pour un effet possible de la salinité au travers d'analyses *a posteriori* utilisant par exemple des régressions logistiques afin de quantifier l'association de ces marqueurs aux conditions de salinité (comparaisons de localités deux à deux).

Le fait que ces loci « extrêmes » n'apparaissent qu'au sein des zones d'introduction conduit à évoquer un mécanisme alternatif. Plusieurs travaux récents ont souligné l'importance de l'effet de « surf allélique » (Klopfenstein et al., 2006) dans la composition

génétique de populations impliquées dans un évènement d'expansion géographique. Brièvement, un allèle rare situé sur le front d'expansion verra dans certain cas sa fréquence augmenter par effets fondateurs et dérive dans les (petites) populations à la marge de la distribution de l'espèce, ce qui sera bien moins probable au centre de l'aire de répartition (pas d'effets fondateurs nouveaux et dérive moindre). Un évènement d'expansion géographique donne donc à des allèles rares la possibilité d'atteindre localement de hautes fréquences et de se propager en « surfant » sur la vague d'expansion (e.g. Hallatschek et al., 2007). Ce phénomène est favorisé dans le cas de petites populations, avec un taux de dispersion limitée et un taux de croissance fort (Klopfenstein et al., 2006) ce qui est proche du contexte d'*O. mossambicus* en Nouvelle-Calédonie. Le surf allélique, en n'affectant généralement pas tous les loci, peut générer des patrons similaires à ceux attendus sous un effet de la sélection (Currat et al., 2006; Excoffier et al., 2009). Que le locus #146 fortement différencié en Nouvelle-Calédonie soit seulement présent dans deux localités (La Foa et Wagap) parmi les plus éloignées du site de la première introduction (Port-Laguerre) encourage à analyser plus en détail cette hypothèse à l'avenir. Auparavant, il serait intéressant de comparer ce résultat à des simulions réalisées dans des conditions comparables (i.e. nombre de génération faible, petites populations, taux de migration probablement réduit) prenant pour base des marqueurs dominants, afin de voir si patron de différenciation extrême observé sur très peu de loci peut effectivement être généré par effet de « surf ». De façon plus générale, la détection et l'utilisation d'allèles « surfeurs » pourrait permettre de reconstruire avec plus de précision les voies d'expansion d'espèces invasives en se basant uniquement sur les loci correspondants ou en leur attribuant un poids supérieur lors de l'inférence des routes de dispersions.

## **CONCLUSION pour la partie II-1.**

Les principaux points de dégagement de ces résultats peuvent être résumés comme suit :

- (1) *O. mossambicus* a été dispersé à l'échelle mondiale à partir d'une seule source africaine. L'origine sur cette source est mal déterminée d'après d'ADNmt du fait d'une phylogéographie complexe sur l'aire d'origine, possiblement liée au transfert d'individus entre bassins en Afrique australe ou à des connexions anciennes entre bassins. La zone médiane de l'aire d'origine (Limpopo, Rivières côtières à la frontière Mozambique-Afrique du Sud) apparaît cependant la plus probable.
- (2) Les populations introduites en Nouvelle-Calédonie et aux Caraïbes présentent une diversité génétique fortement réduite par rapport aux populations natives. Elles forment un ensemble génétiquement uniforme bien qu'une structure phylogéographique ait rapidement émergé, probablement en lien avec les effets fondateurs pour chaque territoire envahi.
- (3) Les patrons d'hétérogénéité de la différenciation inter-populations au sein du génome diffèrent sur les zones d'introductions par rapport aux zones natives. Les goulots d'étranglements ont probablement gommé la plus grande partie de la dispersion entre loci tandis qu'un possible effet de surf allélique durant l'expansion géographique, ou bien des facteurs sélectifs encore non identifiés, ont dû accentuer la différenciation pour une minorité de loci.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont souligné l'importance de la pression de propagule et des introductions multiples dans le succès d'invasion d'une espèce introduite (Colautti et al., 2006; Roman & Darling, 2007). En fournissant une première estimation de la composition génétique de plusieurs populations envahissantes d'*O. mossambicus*, cette étude s'ajoute aux données historiques pour indiquer que le tilapia du Mozambique ne s'inscrit pas dans ce contexte et que des introductions répétées de sont pas nécessaires à l'établissement de

l'espèce. En effet, cette espèce est devenue l'un des poissons d'eau douce les plus répandus au monde (Costa-Pierce, 2003) et a connu une diversification morphologique rapide (Firmat et al., sous presse; section II-2.) en dépit de la faible diversité génétique de la source dispersée et de la forte homogénéité en résultant sur les zones envahies. Le fait qu'aucune base génétique à l'établissement d'*O. mossambicus* dans des conditions de salinité extrêmes – un trait favorisant potentiellement la dispersion de l'espèce entre bassins *via* les eaux côtières (D'Amato et al., 2007) – n'est pas pu être détectée peut également être interprété dans ce sens. Un rôle de la plasticité phénotypique (Schnell & Seebacher, 2008) ou d'une perte de variance additive moindre par rapport à la variance génétique neutre (e.g. Lindholm et al., 2005) peuvent être invoqués pour expliquer ce succès.

Un faible nombre d'individus (possiblement fortement consanguins) est vraisemblablement suffisant à l'établissement d'une population viable sur un nouveau territoire. Cette information doit être prise en compte pour le contrôle d'*O. mossambicus* car elle appelle des plans d'éradication aussi rigoureux que possible afin d'éviter la reformation d'une population dense à partir de quelques individus survivants. Cette prédiction est en accord avec les résultats d'un plan d'éradication à la roténone d'*O. mossambicus* sur l'île de Malakal (République de Palau), où des individus ont persisté dans une des quatre mares ciblées malgré un traitement massif (Tilapia Eradication Team, 2004; [www.issg.org](http://www.issg.org)).

La formation de populations viables d'*Oreochromis* sp. hybrides hors de l'aire d'origine a été reportée suite à des introductions multiples de tilapias (De Silva & Ranasinghe, 1989; Agnèse et al., 1998; Costa-Pierce, 2003; McKinna et al., 2010). Les introductions répétées de tilapias, suivies de l'hybridation des lignées génétiques en présence, auraient donc pu contribuer à la spectaculaire expansion et prolifération des tilapias dans de nombreux territoires, soutenant pour les tilapias le rôle important de la pression de propagule dans les invasions biologiques (cf. Colautti et al., 2006). Nos résultats ne soutiennent pas cette

hypothèse mais s'accordent plutôt avec le fait que les introductions multiples ne sont pas un élément indispensable au succès de l'invasion (Dlugosch & Parker, 2008), au moins pour les tilapias. Ces résultats fournissent cependant des éléments de base pour l'analyse comparée (1) des populations envahissantes ‘goulottées’ et hybrides en ce qui concerne leur potentiel adaptatif et leurs réponses plastiques et (2) du rythme et des modes d'émergence de patrons de divergence génomique hétérogène sur des échelles de temps brèves.

# **SECTION II-2. DIFFERENTIATION MORPHOLOGIQUE**

## **DES POPULATIONS ENVAHISANTES**

### **Manuscrit 3 :**

Accepted in the *Biological Journal of the Linnean Society*

**Title:** Body shape differentiation at global and local geographic scales in the invasive cichlid  
*Oreochromis mossambicus*

**Running title:** Body shape differentiation in an invasive cichlid

#### **Authors:**

Cyril FIRMAT<sup>1\*</sup>

Ulrich K. SCHLIEWEN<sup>2</sup>

Michèle LOSSEAU<sup>3</sup>

Paul ALIBERT<sup>1</sup>

#### **Affiliations:**

<sup>1</sup> UMR CNRS 5561 Biogéosciences - Université de Bourgogne, 6 boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

<sup>2</sup> Department of Ichthyology, Bavarian State Collection of Zoology (ZSM), Münchhausenstr. 21, D-81247 München, Germany.

<sup>3</sup> Rua Inhambanzule 58 - Polana Caniço A, Maputo, Mozambique.

\*To whom correspondence should be addressed:

Cyril Firmat, UMR CNRS 5561 Biogéosciences - Université de Bourgogne, 6 boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

Email: [cyril.firmat@u-bourgogne.fr](mailto:cyril.firmat@u-bourgogne.fr),

Tel: (+) 33 (0)3 80 39 63 76

Fax: (+) 33 (0)3 80 39 63 87

**ABSTRACT:**

The Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae) has been transplanted worldwide during the 20<sup>th</sup> century and belong now to the list of the worst invasive species. Using a geometric morphometric approach, we describe body shape differentiation among 15 populations from native (Mozambique) and invaded (New Caledonia and Guadeloupe) ranges. A dominant phylogeographic signal is detected, despite the broad range of environmental conditions at the local scale. This result suggests that phylogeographic background rather than phenotypic plasticity responding to environmental variation constitutes the main factor correlated with shape divergence. This could result from successive founder effects which occurred during the process of colonization of new geographic areas and therefore strongly suggests heritable phenotypic differentiation. In addition, shape changes along a major axis of divergence hypothetically refer to different swimming abilities possibly related to divergent functional requirements between the native and invaded ranges. Overall, patterns of contemporary shape diversification in *O. mossambicus* likely result from both phylogenetic constraints and adaptive divergence processes. We show that critically taking into account recent phylogenetic history of populations as a constraint on rapid phenotypic divergence is necessary for an improved view of contemporary evolution.

**ADDITIONAL KEYWORDS:** biological invasion – constraints – contemporary evolution – islands – predation release – morphological diversity.

## INTRODUCTION

Cases of human-mediated environmental changes or species range expansions have emerged as fruitful opportunities to study rapid evolutionary responses in wild populations (Hendry, Farrugia & Kinnison, 2008). Specifically, biological invasions have been intensively studied because they provide replicated natural experiments where populations of the same species have been recently introduced in different geographic areas often characterized by contrasting environmental conditions. As a consequence, invasive populations offer ideal study systems to study evolutionary changes over no more than tens of generations (reviews in Lee, 2002; Sax *et al.*, 2007; Vellend *et al.*, 2007; Prentis *et al.*, 2008). Investigations of phenotypic differentiation between invasive populations provide a unique opportunity to decipher the pace and drivers of the divergence process, as well as to evaluate adaptive potential of populations to new environments. While until now most studies have focused on phenotypic traits or on patterns of genetic diversity suspected to increase invasion potential (e.g. Hill, Thomas & Blakeley, 1999; Kolbe *et al.*, 2004; Facon *et al.*, 2005) very few have examined morphological evolution of organisms or of their body parts using shape as an integrated multivariate trait (Collyer, Novak & Stockwell, 2005; Collyer *et al.*, 2007; Michaux *et al.*, 2007; Berner *et al.*, 2010).

Invasive populations often experience novel selective environments, requiring a rapid remodelling and adaptation of their phenotypes to a new optimum (Lee, 2002). Further, due to founder events after genetic bottlenecks, genetic diversity of invasive populations is expected to be reduced (e.g. Ficetola, Bonin & Miaud, 2008), likely constraining their evolutionary and thus invasive potentials. This well-known and debated “genetic paradox for invasive species” (Roman & Darling, 2007) also holds by analogy if the invasive potential is replaced by the potential for rapid morphological diversification within a set of bottlenecked populations. In other words, which components predominantly structure the morphological diversity in

invasive species? They can be either (1) phylogenetic constraints, i.e. phylogeographic population history, isolation and founder events or (2) rapid genetic adaptation and phenotypic plasticity directly responding to the varying environmental conditions of invaded areas? To tackle this question, an essential primary step is to obtain a detailed quantification of the morphological diversity arising within a known time frame, i.e. the dates of species introduction within an explicit phylogeographic framework.

Invasive freshwater fish populations isolated on islands provide ideal case studies in this context. First, transoceanic dispersals are extremely unlikely over short time periods, except when human-mediated. Second, their dispersal ability at the local scale is naturally constrained by drainage patterns, lakes or ponds, often rendering geographically close populations partially or totally isolated from each other. Thus, freshwater fishes provide a promising study context at global as well at local scales with totally disconnected or partially connected populations respectively.

Here, we focus on the African cichlid fish *Oreochromis mossambicus* Peter, 1852 (Teleostei: Cichlidae). This species belongs to the so-called ‘tilapias’, a diverse paraphyletic group of mostly African cichlids well known for their widespread use in sub-tropical and tropical aquaculture that was popularized during the second part of the 20<sup>th</sup> century. Tilapias often turned successful invaders, establishing to diverse environmental conditions, e.g. high salinity levels or low levels of dissolved oxygen. The expansion of *Oreochromis* species has frequently been shown to dramatically disturb local ecosystems and to pose a threat for endemic species (e.g. Keith, 2002; Canionico *et al.*, 2005).

On a global scale, *Oreochromis mossambicus* is now one of the most widespread aquatic invasive animals (Costa-Pierce, 2003), having adapted to a remarkably wide range of environmental conditions (Pérez *et al.*, 2006). In most cases, its introduction has led to such profound and sudden repercussions to native biodiversity that it was ranked among the

hundred worst invasive species (Lowe *et al.*, 2000). Historical and population genetic data (multilocus genotyping and mtDNA sequences; Firmat *et al.* unpublished) both indicate that the *O. mossambicus* populations spread worldwide stem from a common genetic stock.

Contemporary morphological change of invasive *O. mossambicus* populations has been reported (on lower pharyngeal jaw morphology, Trewavas, 1983), but never quantitatively studied in detail. Here we examined external body shape, which has been shown to bear a significantly heritable component (Leinonen, Cano & Merilä, 2011) and to be tightly correlated with a sum of environmental variables (e.g. Collyer *et al.*, 2005; Andersson, Johansson & Soderlund, 2006; Gomes & Monteiro, 2008; Langerhans & Reznick, 2010). Hence, the study of body shape provides a good approach to trace the respective effects of geographic (and genetic) isolation and environmental conditions on morphological variation. We used a geometric morphometric approach to explore morphological variation using a methodological framework allowing for preservation of interpretable geometric associations among different body parts. We address the following questions: (1) Are phylogeographic constraints (defined here as the combination of the phylogeographic background of populations and the associated founder events) the main factors shaping patterns of morphological diversity, or alternatively the environmental conditions of invaded *O. mossambicus* habitats? and, (2) do correlations between environmental and morphological variation suggest alternative factors driving differentiation? We showed that a high amount of morphological diversity was generated during the invasion process and that it likely results from an interplay between populations history and patterns of functional divergence.

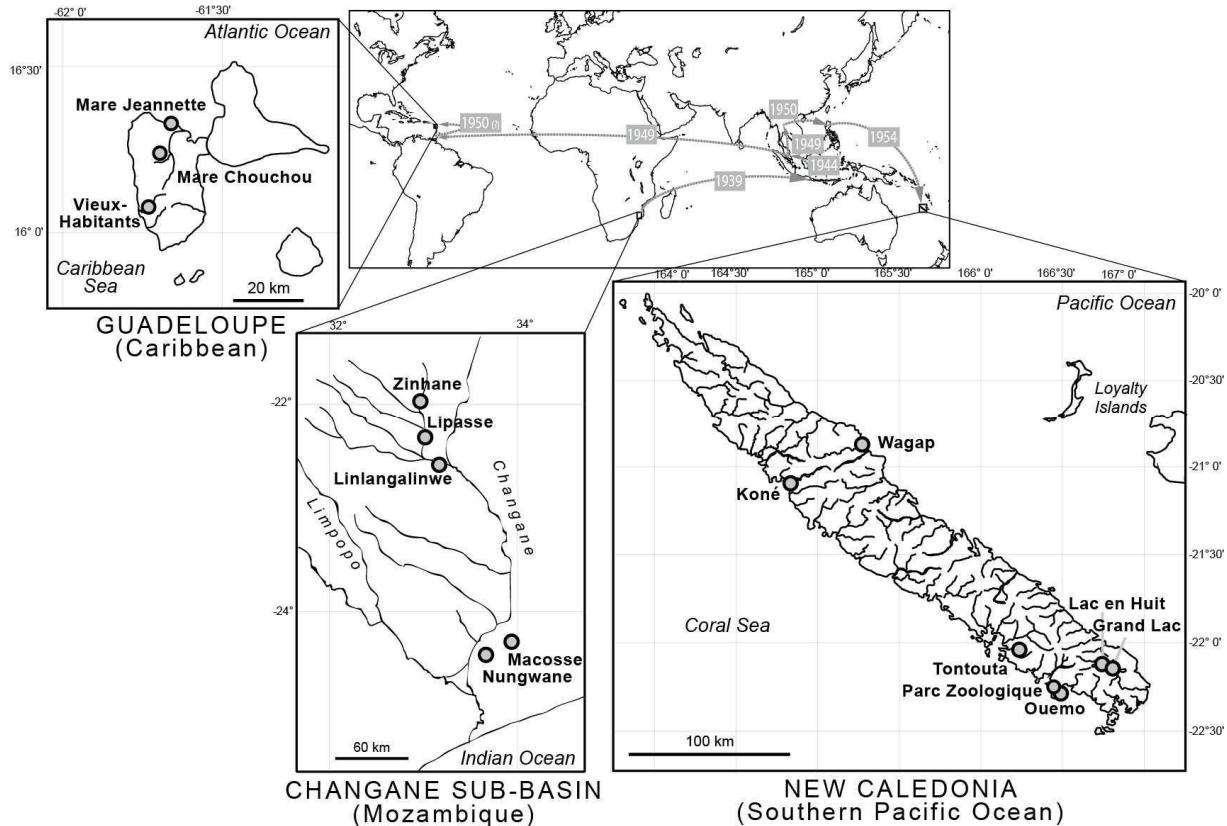
## MATERIAL AND METHODS

### Sampling sites and specimens collection

450 adult specimens were collected in 15 localities representing three geographic areas: Mozambique, New Caledonia and Guadeloupe (Fig. 1; Table 1). The sampling areas were chosen according to three criteria: (1) transoceanic barriers between them, lowering the probability of recent human-induced transfers between areas, (2) the availability data concerning chronology and routes of introductions and (3) the absence of other introduced *Oreochromis* species (e.g. *O. niloticus* Linnaeus, 1758), to avoid any possible effect due to interspecific hybridization. Interspecific hybridization is quite common in tilapias, and global introductions of other *Oreochromis* species often led to the replacement of the *O. mossambicus* stock by hybrid lineages (e.g. Costa-Pierce 2003). To date, no other established *Oreochromis* species is recorded from New Caledonia and Guadeloupe (Fishbase, 2011). However, a large proportion of the Mozambican native populations is threatened due to the release of *Oreochromis niloticus* documented as broadly hybridizing with *O. mossambicus*, over its native range (Cambray & Swartz, 2007; D'Amato *et al.*, 2007). Thus, sampling sites in the native range were located in the Changane River, a subdrainage of the Limpopo drainage, from which it is temporarily isolated due to prolonged episodes of drought, hereby preventing our sampled localities from genetic pollution by locally introduced *O. niloticus*. The purity of our *O. mossambicus* specimens is supported (1) by phenotypic observations indicating that no specimen studied here exhibits features of *O. niloticus* (the presence of vertical stripes in the caudal fin; contrary to fish sampled in the Limpopo, Moralee, van der Bank & van der Waal, 2000; C. Firmat, pers. obs.) but traits characterising *O. mossambicus* (Trewavas 1983) and (2) by preliminary population genetic analyses (AFLP genotyping and mtDNA sequences) revealing the absence of *O. niloticus* and no traces of genetic introgression for the populations used in this study (i.e., prevalence of hybridization = 0,

unpublished data). Studied populations occur over a wide range of environmental conditions (Table 1).

**Figure 1.** Geographic location of the sampling sites. Grey dotted arrows and dates represent the recent history and the roads of introduction for the invasive studied populations (see text for details).



### Geometric morphometrics

We used a landmark-based geometric morphometric approach. The left side of each specimen was photographed under standard conditions. Fourteen landmarks (Fig.2) were recorded from digital photographs using Optimas v6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring MD, USA) in order to describe most of the overall external fish morphology. The  $x$  -  $y$  coordinates were submitted to a partial generalized Procrustes superimposition (Rohlf & Slice, 1990) to remove non-shape variation (i.e. size, position and orientation of the object; Dryden & Mardia, 1998) and the resulting Procrustes coordinates, once orthogonally projected onto the tangent shape space, were used as shape descriptors. The centroid size (the square root of the sum of squared distances of landmarks from their centroid; Bookstein,

1991) was extracted and taken as an estimate of body size. It strongly correlates with fish standard length ( $R^2 = 0.99$ ,  $P < 0.0001$ ). An analysis of measurement error (Yezerinac, Lougheed & Handford, 1992) conducted on a sub-sample of twenty specimens originating from the Nungwane station indicated that the averaged error for this station did not exceed 9% of the total variation for shape variables and 6% for centroid size. We considered these values as a maximum estimates of error since they are computed taking as reference at the intra-locality individual variation (the inter-locality level would have provided lower estimates).

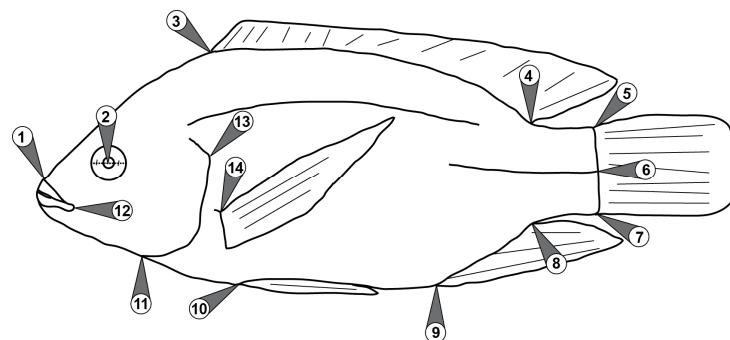
We selected complementary data analysis procedures explicitly considering the hierarchical geographical structure of the sample set (nested range, geographic areas and localities respectively, see Table 1, Fig. 3) through (1) reassignment tests based on linear discriminant analyses (LDA) and (2) nested multivariate analyses of co-variance (MANCOVA). Figure 3 summarize our hypothesis testing design and illustrate the different factors used in these analyses.

**Table 1.** Sampling sites and their habitat characteristics.

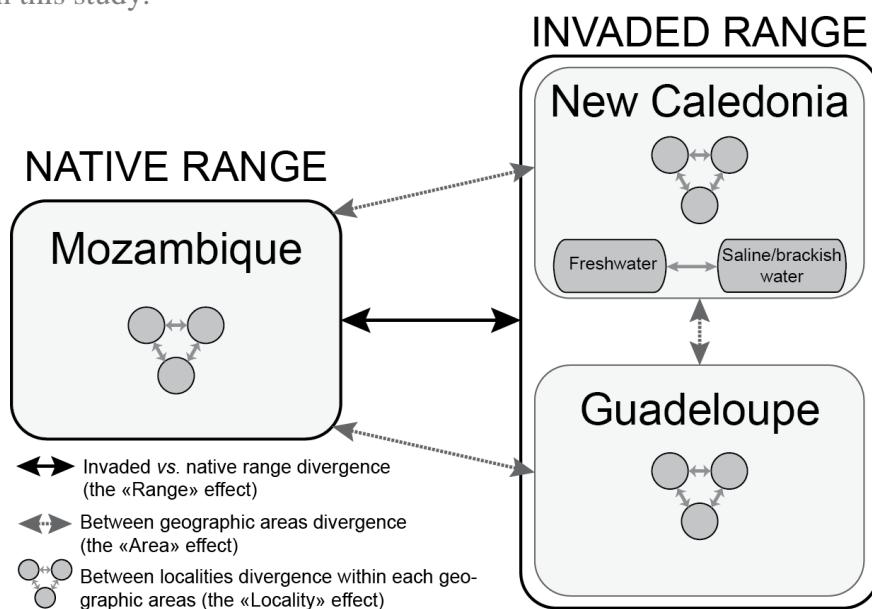
Range	Areas	Locality name	Environment	Salt or brackish water <sup>a</sup>	n
Native	Mozambique	Linlangalinwe	Small pond	No	33
		Lipasse	Small pond	No	30
		Macosse	Lake	No	51
		Nungwane	Lake	No	20
		Zinhane	Small pond	No	17
Invaded	New Caledonia	Grand Lac	Lake	No	22
		Lac en 8	Swamp	No	9
		Ouemo	Mangrove	Yes	28
		Tontouta	Small pond	No	33
		Wagap	Small pond	Yes	34
		Koné	Costal stream	Yes	41
		Parc Zoologique	Lake	No	44
		Mare Chouchou	Small pond	No	33
Guadeloupe		Vieux Habitants	River	No	26
		Mare Jeannette	Small pond near manroves	Probably yes	29

<sup>a</sup>Estimated from water conductivity (salt or brackish water localities present a water conductivity exceeding 30 S/m) except for Guadeloupean samples for which conductivity have not been measured and water salinity evaluated unambiguously from the hydrographic connexion of the site with sea water.

**Figure 2.** The 14 landmarks used for geometric morphometric analyses. Landmark definitions are as follow: (1) junction of the premaxillary and ethmoid, (2) center of the orbit (computed as the mean coordinates of two landmarks at the anterior and posterior margins of the eye), (3) anterior and (4) posterior insertions of the dorsal fin, (5) dorsal insertion of the caudal fin, (6) midpoint of insertion of the caudal fin (at the end of the lateral line), (7) ventral insertion of the caudal fin, (8) posterior and (9) anterior insertions of the anal fin, (10) insertion of the ventral fin, (11) anteroventral tip of the pectoral girdle, (12) posterior-most point of the lips, (13) posterior-most tip of the operculum and (14) upper insertion of the pelvic fin.



**Figure 3.** Schematic diagram illustrating the sampling design, the potential levels of geographic and environmental differentiation and the associated hypotheses (arrows) considered in this study.



### Reassignment tests

Two different LDAs were conducted to explore the structure of the shape space and to compare global *vs.* local geographic effects. Their performance in predicting the factor of

interest was tested using leave-one-out cross-validations (see Stone, 1974): all individuals were sequentially removed and reclassified with a new discriminant model computed independently of the removed individual. The proportion of successfully reassigned individuals was computed for each LDA. Allometry, the part of shape variation directly associated with size variation, is common in fish but size-related variation might mainly result from differences in the age structure between the samples or from different sampling methods as this is the case for our sample set. These parameters are not of concern for the present study. We therefore focus on shape variation in performing the LDAs on the size-free shape variables, i.e. the residuals of a multivariate regression of Procrustes coordinates on centroid size (Monteiro, 1999; Claude, 2008). This procedure assumes that allometric trajectories do not differ between populations. We consider this assumption as reasonable since a preliminary analysis of between-populations divergence in allometric vectors showed that allometric patterns significantly differ in a very low proportion of the pairwise comparisons (7 out 105, i.e. 6.7%, at  $\alpha = 0.05$ ). This suggests that the allometric correction approach we used introduced no or at most a minor bias in the final results.

The first discriminant analysis (LDA1) considered the sampling localities of the individuals. The second discriminant analysis (LDA2) is identical to LDA1 but was computed on the shape data corrected for the effect of the area of origin (Mozambique, New Caledonia and Guadeloupe) by extracting the residuals of a preliminary one way MANOVA model considering this factor. Removing the effects of a factor from raw data and comparing reassignment performances with and without this factor's effects can be used to estimate its contribution to a given pattern of shape differentiation (e.g. Firmat *et al.*, 2010). Here, if the primarily structuring factor is geographic area the reassignment performance of LDA2 would significantly drop relatively to LDA1. Conversely, if shape space is not structured by the

between-area differences, LDA1 and LDA2 would provide similar reassignment performances.

### Nested MANCOVA models and divergence vectors

Nested MANCOVA models were conducted on the principal components (PCs) of shape data to assess degree of association between body shape variation and geographic and environmental factors (see Table 1; Fig. 2). Centroid size (controlling for multivariate allometry), Range, Areas (nested within ‘Range’), and Localities (i.e. the sampling stations, nested within ‘Areas’) were considered as the independent variables in the first MANCOVA model:

$$\begin{aligned} \text{Body shape} = & \text{Constant} + \text{Centroid size} + \text{Range} + \text{Area (Range)} + \text{Localities (Range} \times \text{Area)} \\ & + \text{Error} \end{aligned}$$

To provide more robust statistical tests for the main variables of interest (‘Range’ and ‘Areas’), we chose to consider the sampled localities as a random factor. In addition to reduce the risk of type I error, treating populations instead of individuals as the unit of replication (i.e. the error term) allows us to generalize the results to unsampled populations. However, testing for the terms of interest in nested mixed-effect MANOVA model is not always feasible due to the matrix determinant which becomes negative with an increasing number of dependent variables (Rencher, 2002; Langerhans & Makowicz, 2009 for a practical example). Here, the maximum number of dependent variables providing a positive matrix determinant equalled seven. Thus, we used the first seven principal components (PC1-7) accounting for more than 80% of the total shape variance. The correlations between Procrustes and Euclidian individual distances in the reduced PCs space informs about the accuracy to which the full shape space is summarized by the first selected PCs (Fadda & Corti, 2000). Here, the Euclidian distances for the first seven PCs correlate 0.87 with the Procrustes distances. The

nested MANCOVA model was associated with a test of significance based on the Hotelling-Lawley's  $T^2$ -statistic as recommended by Claude (2008). Working with a reduced shape space requires special attention to the relative contribution of the model terms in explaining the total body shape variance. Variable contribution was assessed using the Hotelling-Lawley's partial  $\eta^2$  following Rencher (2002, p. 175) as a measure of multivariate association. Hotelling-Lawley's partial  $\eta^2$  is a multivariate approximation of the univariate coefficient of determination and was computed using all the shape space dimensions, i.e. the first 24 PCs (the last four dimensions being lost after the Procrustes superimposition due to the scaling, rotating and translating steps of the landmark configurations).

Salinity variation has been suggested as potential abiotic factor affecting fish body shape (Collyer *et al.*, 2005; 2007). Collyer *et al.* (2005) suggest that a reduced body circumference relatively to size could be an advantage due to face a high osmotic potential in saline waters. It is noteworthy that populations from New Caledonia were sampled in variable degree of salinity which is the most variable environmental parameters among the localities of New Caledonia (e.g., brackish mangroves and ponds, freshwater mountain lakes or swamps). Thus, we conducted a second nested MANCOVA model to test for the effect of salinity on morphological variation of New Caledonian specimens:

$$\text{Body shape} = \text{Constant} + \text{Centroid size} + \text{Salinity} + \text{Localities (Salinity)} + \text{Error}$$

The Procrustes superimposition was redone for the dataset limited to the New Caledonian samples. To estimate multivariate association and significance for each term, we used a strictly analogous procedure to the one described previously. To test for significance the shape space was reduced to its first five PCs (PC1-5) accounting for 71% of the total variance and correlating 0.95 with Procrustes distances.

Since a strongly significant range effect was found (first model), the correlation between the native *vs.* invaded range-divergence vector and the global vector of inter-population

divergence was examined. A divergence vector  $\mathbf{d}_{\text{Range}}$  was computed from the sum of squares and cross-product matrix and corresponds to the first eigenvector of the range effect. This vector was preferred over a canonical axis involving the scaling by the inverse of the error sum of square and cross-product matrix (Langerhans, 2009). Scaling vectors is likely to alter the geometry of the multivariate space, which can bias the final interpretations (Klingenberg & Monteiro, 2005). Then,  $\mathbf{d}_{\text{Range}}$  was compared to the major vector of between-populations differentiation  $\mathbf{z}$ , represented by the first eigenvector of the variance-covariance matrix of population means computed on size-corrected data (Langerhans & Makowicz, 2009). As a test of significance, the vector correlation was compared to a distribution of 50000 angles computed between pairs of random vectors (Klingenberg, 1996). The proportion of random angles whose correlation exceeds the observed value provides a probability ( $P$ ) that the correlation between the divergence vectors is compatible with a random pattern. In order to consider the dependency of this result to sampling error, the computation of each vector is bootstrapped 1000 times and the test of significance repeated for each of the 1000 angles providing a bootstrapped distribution of  $P$ . Finally, in order to visualize divergence between the native (Mozambique) and the invaded range (New Caledonia and Guadeloupe), shape changes along the  $\mathbf{d}_{\text{Range}}$  vector were depicted by thin-plate spline transformation grids corresponding to the variation between the extreme individuals projected on  $\mathbf{d}_{\text{Range}}$ .

### **Graphical representation of the data**

To provide a graphical representation of the data we used a between group principal component analysis (bgPCA) (Boulesteix, 2005) performed on the size-free shape variables. The bgPCA approach is recommended by Mitteroecker & Bookstein (2011) for Procrustes data as an alternative to descriptive discriminant analysis. We found a significant shape differentiation between geographic areas (see Results). We therefore performed a PCA on the

group means (Mozambique, New Caledonia, Guadeloupe) and then projected the individual data onto the first two principal components in order to illustrate group separation.

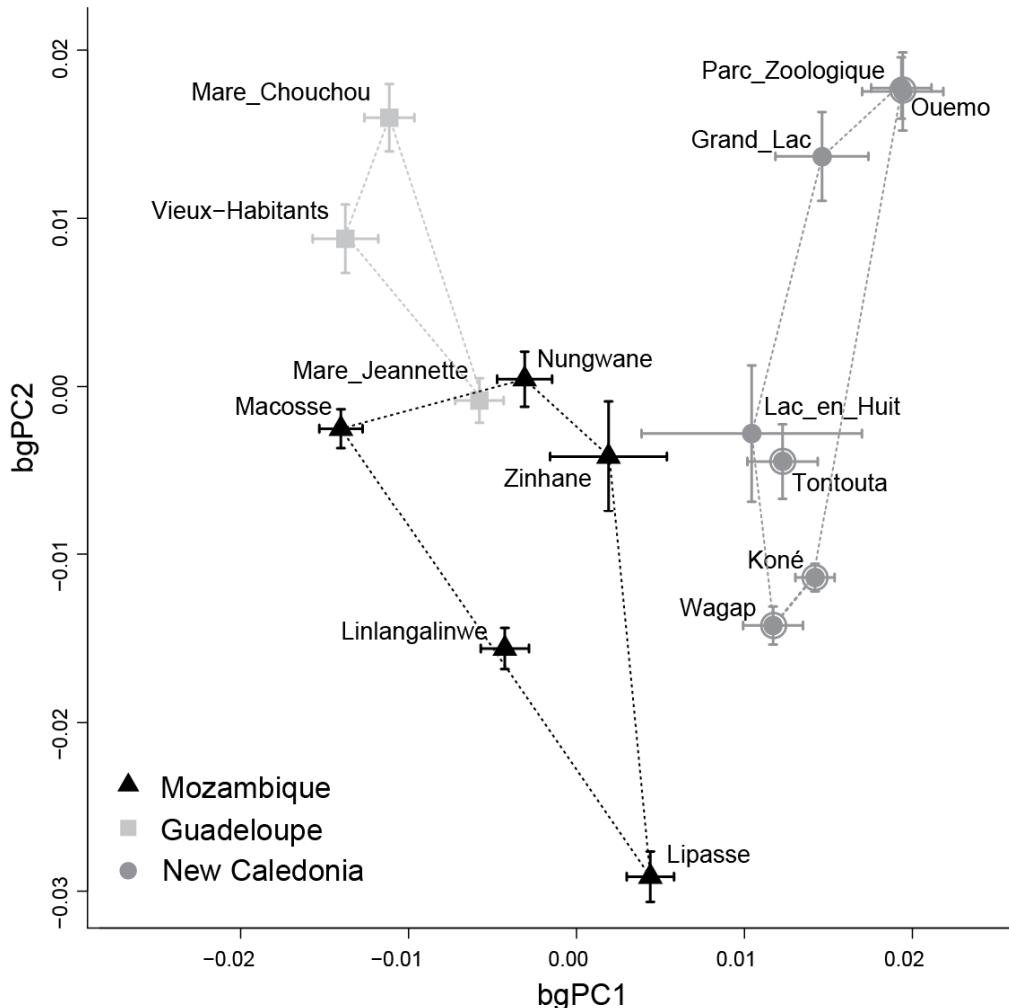
All geometric morphometric computations and statistical analyses were performed in R 2.12.0 (R Development Core Team, 2008), using codes from Claude (2008) and custom routines (available from C.Firmat upon request).

## RESULTS

### **Discriminant analyses and cross-validation scores**

The first discriminant analysis based on sampling locations 1 - 15 (LDA1) correctly reassigned 80% of the individuals. However, this percentage substantially dropped once the variance between geographic areas was removed (LDA2): 64% of the individuals were successfully reassigned to their sampling location, indicating that shape distinctness appears first at the level of the geographic areas (i.e. Mozambique, New Caledonia or Guadeloupe) and second at the locality level. Based on these reassignment scores we roughly estimate that 20% (i.e. [80-64]/80) of the geographically-structured morphological variation occur at the global scale only. The between-groups principal components (Fig. 4) are used to illustrate the reassignment results: the sampling locations are easily ordinated onto the shape space according to their geographic areas, showing the predominating effect of large scale geography over within-areas population divergence. No apparent patterns of clustering according to environmental conditions of sampling sites emerge on this PCA plane neither on PCs computed on individual data (results not shown).

**Figure 4.** Body shape variation depicted by the two axes of a between groups principal component analysis based on geographic areas (Mozambique, New Caledonia, Guadeloupe). Individuals scores are projected on the two principal components (bgPC) that account for 95% of the between group means variation and 33% of the between individuals variation. Circled localities means are populations sampled in salt or brackish water in New Caledonia. Points represent the centroids for each sampling locality  $\pm$  1 S.E.M. See Supplementary material for a visualization of shape deformation along the two between-group PC axes.



## MANCOVA models

The mixed-model nested MANCOVA performed on the total sample (Table 2) indicated significant effects of multivariate allometry (i.e. centroid size), geographic range and areas nested in Range, as well as for localities nested in Area. Hotelling-Lawley's partial  $\eta^2$  revealed that multivariate allometry had a strong effect on shape variation. Range and Area have a stronger effect than populations within Area. The second mixed-model MANCOVA performed on New-Caledonian samples (Table 3) indicated the significant effects of centroid

size and localities. The effect of salinity is not significant although a relatively strong effect seems to be indicated by its partial variance. However, the discriminant analysis based on the salinity factor failed to separate population means according to this parameter (data not shown), indicating that this elevated partial  $\eta^2$  likely results from a bias from a population distinctiveness that is indirectly (and not significantly) correlated with salinity.

**Table 2.** Results of the nested MANCOVA performed on body shape considering the full dataset. The partial variance corresponds to the Hotelling-Lawley's partial  $\eta^2$ . The relative variance is computed as the ratio of each partial variance to the highest partial variance value.

Effect	Partial variance	Relative variance	d.f.	F	P
Size	0.809	1	7, 428	134.948	< 0.0001
Range	0.781	0.965	7, 6	11.006	0.0047
Area (Range)	0.670	0.828	7, 6	8.457	0.0094
Locality (Range×Area)	0.413	0.511	84, 2984	22.410	< 0.0001

**Table 3.** Results of the nested MANCOVA performed on body shape considering the sample set from New Caledonia and the effect of salinity. The partial variance corresponds to the Hotelling-Lawley's partial  $\eta^2$ . The relative variance is computed as the ratio of each partial variance to the highest partial variance value.

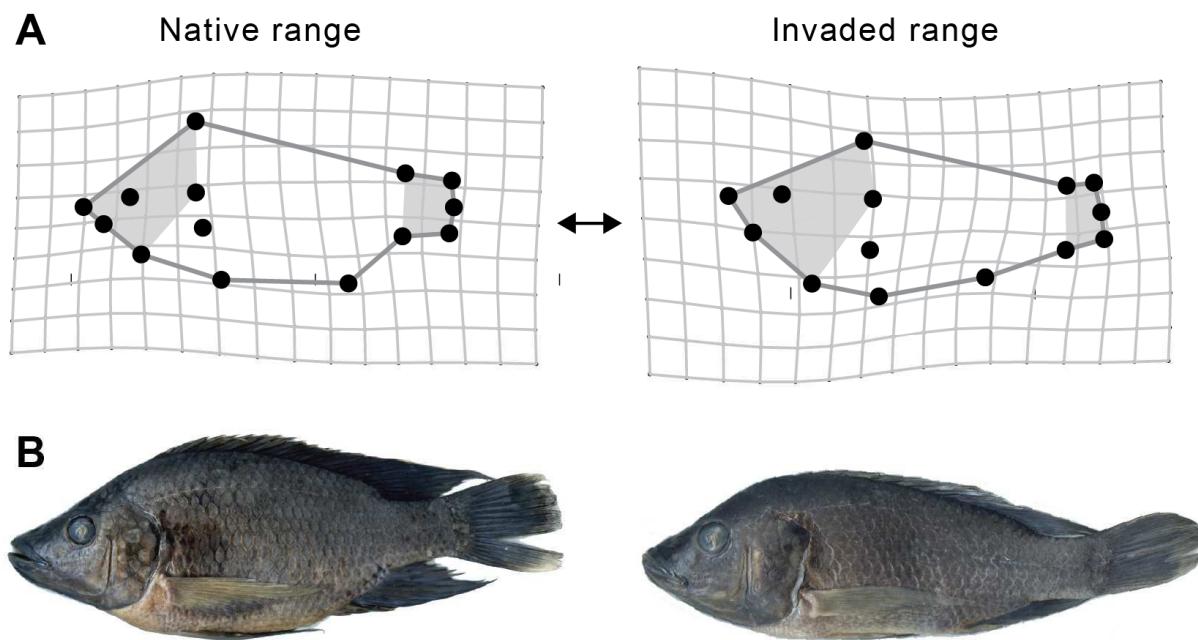
Effect	Partial variance	Relative variance	d.f.	F	P
Size	0.822	1	5, 199	60.511	< 0.0001
Salinity	0.669	0.814	5, 1	1.678	0.5249
Locality (Salinity)	0.588	0.716	25, 987	16.534	< 0.0001

### Major pattern of shape differentiation

The  $\mathbf{d}_{\text{Range}}$  vector derived from the first MANCOVA model considering native vs invasive population significantly correlated with the major between-population divergence vector  $\mathbf{z}$ . The proportion of significant bootstrapped values of  $P$  at the 0.05 threshold was 77.9% and remained elevated at the 0.01 (69.9%) and 0.005 (64.3%) thresholds, indicating a

robust significant correlation between these two vectors. Thin-plate spline transformations illustrate shape changes along  $\mathbf{d}_{\text{Range}}$  (Fig. 5). Invasive populations tend to exhibit a more elongated body shape, a shorter caudal peduncle and a more expanded anterior region relatively to native populations. Conversely, native populations exhibit a larger body depth and a lower position of the eye.

**Figure 5.** A. Transformation grids depicting shape differences (magnified  $\times 1.2$ ) between the native and the invaded ranges (extreme values along the  $\mathbf{d}_{\text{Range}}$  vector, see text for details). Head and caudal peduncle regions are shaded to highlight differences. B. Photographs of a specimen from Grand Lac, New Caledonia (left) and of a specimen from Macosse, Mozambique (right).



## DISCUSSION

### A geography-related shape differentiation

We provided an example of rapid morphological diversification in relation to the geography and the phylogeny of invasive populations. Both of our analytical approaches (reassignment tests and nested MANCOVAs) revealed that the overall body shape variation in *O. mossambicus* strongly correlates with geography, stronger on the global than on the local

scale. This indicates that the longer shared evolutionary history between populations is reflected by the general pattern of body shape differentiation. Surprisingly, this pattern emerges despite contrasting environmental conditions existing within each geographic area. These results suggest that the dominant global divergence pattern (i.e. between areas) predominantly results from the local phylogeographic constraints for population differentiation rather than from between areas environmental differences. For example, salinity, which is undoubtedly a highly variable environmental parameter in New Caledonian, was a potential factor for differentiation toward slender body shape in introduced Cyprinodon fish (*Cyprinodon tularosa*, Collyer *et al.* 2005; 2007). For *O. mossambicus*, salinity does not detectably correlate with morphometric differentiation. This situation suggests that an ancient heritable component more than a plastic response or a rapid genetically based adaptation underlies the observed global shape divergence. Indeed, a significant environmentally-induced plastic divergence would have primarily been detected between populations sampled in markedly varying conditions (e.g. salinity, Collyer *et al.*, 2005; 2007; or water transparency exemplified in cichlids, Witte *et al.*, 2008). In other terms, the contribution of phenotypic plasticity to the divergence between geographic regions cannot be evaluated from our current data, but the phylogeographic signal does not suggest a high level of importance.

The genetic proximity between populations within each area is expected to be elevated due to a single founder event resulting from the introduction of *O. mossambicus* in New Caledonia and Guadeloupe. Historical data allows to trace the route of introduction for the regions under study (Fishbase, 2011; see Fig. 1). New Caledonian and Guadeloupean populations respectively experienced at least two and three successive founder events following their departure from Malaysia in 1949, and at least four and five since the first *O. mossambicus* naturalization in Java from its native range. The difference between invaded

geographic regions (Guadeloupe and New Caledonia) is therefore necessarily the consequence of divergence that occurred since 1949.

A recent study has revealed a strong heritability for body shape traits in sticklebacks populations (Leinonen *et al.*, 2011) but to our knowledge, no such data are published to date for cichlids. Assuming that body shape in *O. mossambicus* is also highly heritable, random loss of genetic diversity due to successive founder events and genetic drift during the invasion processes (> 60 generations) could have displaced the phenotypic means relative to the original source populations, increasing disparity at a global scale.

This dominant large scale disparity despite the highly heterogeneous environmental conditions at the local scale might be due to repeated founder events that reduce the genetically based phenotypic variance constraining the speed of adaptive evolution in invasive populations (Vellend *et al.*, 2007; Prentis *et al.*, 2008). Thus, the absence of significant morphological distinctness between saltwater and freshwater habitats in New Caledonia could result from the lack of genetic variants to promote adaptive morphological evolution, or simply from too short time interval since population splitting to allow detection of a significant ecological divergence. Alternatively, salinity variation might, after all, exert no effect on external morphology in *O. mossambicus*, despite a hypothetic functional relation with capacity for osmotic regulation (Collyer *et al.*, 2005).

### **Functional interpretation of shape divergence**

Despite the strong disparity observed within the invaded range, one axis of the shape space clearly distinguishes the invasive populations from the native ones. The amount of differentiation between native populations from the Changane System and the invasive ones may partly be attributed to geographical variation in the native range (i.e. our native samples could not be the exact source of the invasive lineage from Java). However, this axis

interestingly correlates with the major direction of population differentiation and corresponds to shifts in overall body shape believed to bear biomechanical consequences (e.g. Domenici *et al.*, 2008). The vast theoretical and empirical framework now available to interpret shifts in fish body shape in term of swimming performance (reviewed in Langerhans & Reznick, 2010) allows us to discuss the observed pattern in *O. mossambicus* within a biomechanical context. This framework mainly centers on an evolutionary trade-off between steady and unsteady swimming modes each linked to opposed environmental factors and associated morphologies. Steady swimming morphologies favour swimming efficiency during cruising over long distances and rely on streamlined shapes with a massive anterior part. Contrarily, unsteady swimming morphologies improve controlled changes in swimming direction and velocity and imply deep bodies and large caudal parts (Langerhans & DeWitt, 2004; Domenici *et al.*, 2008). We consider our results within the line of this framework: native *O. mossambicus* populations exhibit a rounded body shape, a small head and an expanded posterior region expected for an unsteady-like swimming morphology while invasive populations display a streamlined body shape, broad head and short caudal regions expected for a steady-like swimming morphology. Numerous factors have been identified as potentially affecting fish morphology such as habitat complexity, water flow, predation and trophic and reproductive constraints (see Langerhans and Reznick, 2010). Predation intensity is often advocated as selecting for unsteady swimming morphologies that improves predator escape as reported among six families including African cichlids (Langerhans, 2010; Langerhans & Reznick, 2010). Predation release is a well-known phenomenon often suggested to explain their competitive abilities and possibly their rapid evolution of invasive species (Lee, 2002). Over its native range, *O. mossambicus* is mainly preyed upon by clariid catfish species (Trewavas, 1983; Skelton, 2001) a phenomenon clearly witnessed in the field (frequent captures of several *Clarias* spp. specimens hunting tilapias caught in the nets; Firmat &

Losseau, pers. obs). The exceptional presence of crocodiles at one sampling locality (Macosse) might represent an additional predation pressure for that site (see Wallace & Leslie, 2008). In the Caribbean, predation by marine and brackish species has been reported (see Trewavas 1983), but among the Guadeloupean sampling localities, only two species (*Gobiomorus dormitor* Lacepède 1800 and *Eleotris perniger* Cope 1871) reported in one site (Vieux-Habitants) would reach a sufficient size to predate on juvenile *O. mossambicus*. No insights for predation on *O. mossambicus* were observed in New Caledonia. This is further supported by a comprehensive ichthyological report (Marquet, Keith & Vigneux, 2003) yielding no indications of potential species intensively preying on *O. mossambicus*. Invasive *O. mossambicus* may therefore face predators out of its native range but at a much weaker density than in Mozambique. We suggest that the release of predation pressures in the invaded areas represents one of the selective factors driving the native vs. invasive differentiation pattern. Alternatively, but not exclusively, this pattern could result from increased requirements to swim over long distance lowering energy expenditure (i.e. the steady swimming mode) to search for food in potentially less suitable habitats in the invaded range. Common garden experiments combined with laboratory estimates of swimming performances will be the next step required to further investigate these hypotheses.

## CONCLUSION

From a new study system, we provided the first geometric morphometric description of the phenotypic diversity arising at a broad spatial scale within a short timeframe. Considering a hierarchical geographic sampling design with a substantial number of populations allows us to propose that phylogenetic constraints (the combination of the phylogeographic background of populations and the associated founder events) is the primary factor shaping morphological divergence in *O. mossambicus*. Conversely, the markedly

varying local environmental conditions have unsignificant or much weaker effects on local divergence. However, a major axis of the shape space characterizing both global scale and overall inter-population divergence is possibly related to a functional trade-off between alternative swimming modes. Accurately estimating the respective implications of plastic or heritable changes in this system will require further investigations, although heritable divergence would be favoured from the observed pattern. Overall, our results suggest a significant role for genetic and functional constraints on contemporary phenotypic diversification. While the positive effects of rapid evolutionary changes on invasion success have been broadly acknowledged during the last decade, this study, along with some others recent contributions (Berner *et al.*, 2010; Colautti, Eckert & Barrett, 2010), emphasises the roles of evolutionary constraints on phenotypic divergence and adaptation in invasive populations. In the future, focusing not only on the potential but also on the limits of contemporary evolution should offer a more integrative and exciting view of phenotypic changes in invasive species.

## Acknowledgements

We thank S. Di Mauro and H. Magnin (Parc Naturel de Guadeloupe) for providing samples and field information. A. Losseau and the Losseau family furnished an invaluable help and assistance for field session organization in Mozambique. F. Pariela (Banhine National Park, Mozambique) provided sampling authorization (n°0002/2009) and its team provided field assistance. Sampling authorizations in New Caledonia were provided by the Province Nord (n°60912-2869-2009/JCC) and Province Sud (n°11262-2009/ARR/DENV) administrations. C. Flouhr (Hytec), J.-L. Justine (MNHN), D. Lecchini (IRD) and C. Poellabauer (Erbio) provided assistance, information or material for the sampling effort in New Caledonia. We also thank C. and L. Hester and A. and A. Guillas for kindly providing hospitality in New

Caledonia. D. Neumann (ZSM) provided technical advices for sampling sessions and J. Thomas (UMR5561) helped managing photographic records. This study is contributed by the team ‘BioME’ of the UMR5561-CNRS and funded by a Rotary International travel grant, a BQR n° 2009 BQRI 01 4 -and Region Bourgogne PARI n° 079.

## REFERENCES

- Andersson J, Johansson F, Soderlund T. 2006.** Interactions between predator- and diet-induced phenotypic changes in body shape of crucian carp. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273:** 431-437.
- Berner D, Roesti M, Hendry AP, Salzburger W. 2010.** Constraints on speciation suggested by comparing lake-stream stickleback divergence across two continents. *Molecular Ecology* **19:** 4963-4978.
- Bookstein FL. 1991.** *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology.* Cambridge University Press, New York.
- Boulesteix AL. 2005.** A note on between-group PCA. *International Journal of Pure and applied mathematics* **19:** 359-366.
- Cambray J, Swartz E. 2007.** *Oreochromis mossambicus* IUCN Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Canonico GC, Arthington A, McCrary JK, Thieme ML. 2005.** The effects of introduced tilapias on native biodiversity. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems* **15:** 463-483.
- Claude J. 2008.** *Morphometrics with R.* Springer: New York.
- Colautti RI, Eckert CG, Barrett SCH. 2010.** Evolutionary constraints on adaptive evolution during range expansion in an invasive plant. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **277:** 1799-1806.

**Collyer ML, Novak JM, Stockwell CA. 2005.** Morphological divergence of native and recently established populations of White Sands Pupfish (*Cyprinodon tularosa*). *Copeia* **2005:** 1-11.

**Collyer ML, Stockwell CA, Adams DC, Reiser MH. 2007.** Phenotypic plasticity and contemporary evolution in introduced populations: Evidence from translocated populations of white sands pupfish (*Cyprinodon tularosa*). *Ecological Research* **22:** 902-910.

**Costa-Pierce B. 2003.** Rapid evolution of an established feral tilapia (*Oreochromis* spp.): the need to incorporate invasion science into regulatory structures. *Biological Invasions* **5:** 71-84.

**D'Amato ME, Esterhuyse MM, van der Waal BCW, Brink D, Volckaert FAM. 2007.** Hybridization and phylogeography of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* in southern Africa evidenced by mitochondrial and microsatellite DNA genotyping. *Conservation Genetics* **8:** 475-488.

**Domenici P, Turesson H, Brodersen J, Bronmark C. 2008.** Predator-induced morphology enhances escape locomotion in crucian carp. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **275:** 195-201.

**Dryden IL, Mardia KV. 1998.** *Statistical analysis of shape.* Wiley: Chichester, U.K.

**Facon B, Jarne P, Pointier JP, David P. 2005.** Hybridization and invasiveness in the freshwater snail *Melanoides tuberculata*: hybrid vigour is more important than increase in genetic variance. *Journal of Evolutionary Biology* **18:** 524-535.

**Fadda C, Corti M. 2000.** Three dimensional geometric morphometric study of the Ethiopian *Myomys–Stenocephalemys* complex (Murinae, Rodentia). *Hystrix* **10:** 131–143.

**Ficetola GF, Bonin A, Miaud C. 2008.** Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. *Molecular Ecology* **17:** 773-782.

- Firmat C, Gomes Rodrigues H, Renaud S, Claude J, Hutterer R, Garcia-Talavera F, Michaux J.** 2010. Mandible morphology, dental microwear, and diet of the extinct giant rats *Canariomys* (Rodentia: Murinae) of the Canary Islands (Spain). *Biological Journal of the Linnean Society* **101**: 28-40.
- Fishbase.** 2011. Fishbase. See <http://www.fishbase.org/home.htm>.
- Gomes JL, Monteiro LR.** 2008. Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): test of an ecomorphological paradigm. *Biological Journal of the Linnean Society* **93**: 799-812.
- Hendry AP, Farrugia TJ, Kinnison MT.** 2008. Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Molecular Ecology* **17**: 20-29.
- Hill JK, Thomas CD, Blakeley DS.** 1999. Evolution of flight morphology in a butterfly that has recently expanded its geographic range. *Oecologia* **121**: 165-170.
- Keith P.** 2002. Threatened fishes of the world: *Galaxias neocaledonicus* Weber & de Beaufort, 1913 (Galaxiidae). *Environmental Biology of Fishes* **63**: 26-26.
- Klingenberg CP.** 1996. Multivariate allometry. In: Marcus LF, Corti M, Loy A, Naylor GJP and Slice DE, eds. *Advances in Morphometrics*. New York: Plenum Press. 23–49.
- Klingenberg CP, Monteiro LR.** 2005. Distances and directions in multidimensional shape spaces: Implications for morphometric applications. *Systematic Biology* **54**: 678-688.
- Kolbe JJ, Glor RE, Schettino LRG, Lara AC, Larson A, Losos JB.** 2004. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* **431**: 177-181.
- Langerhans RB.** 2009. Trade-off between steady and unsteady swimming underlies predator-driven divergence in *Gambusia affinis*. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 1057-1075.
- Langerhans RB.** 2010. Predicting evolution with generalized models of divergent selection: a case study with poeciliid fish. *Integrative and Comparative Biology* **50**: 1167-1184.

**Langerhans RB, DeWitt TJ.** 2004. Shared and unique features of evolutionary diversification. *American Naturalist* **164**: 335-349.

**Langerhans RB, Makowicz AM.** 2009. Shared and unique features of morphological differentiation between predator regimes in *Gambusia caymanensis*. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 2231-2242.

**Langerhans RB, Reznick DN.** 2010. Ecology and evolution of swimming performance in fishes: predicting evolution with biomechanics. In: Domenici P and Kapoor BG, eds. *Fish locomotion: an etho-ecological perspective*: Enfield, Science Publishers. 200-248.

**Lee CE.** 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 386-391.

**Leinonen T, Cano JM, Merilä J.** 2011. Genetics of body shape and armour variation in threespine sticklebacks. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 206-218.

**Lowe S, Browne M, Boudjelas S, de Poorter M.** 2000. 100 of the world's worst invasive alien species database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG). Aliens newsletter, Auckland.

**Marquet G, Keith P, Vigneux E.** 2003. *Atlas des poissons et des crustacés d'eau douce de Nouvelle-Calédonie*. Partimoines Naturels: Paris.

**Michaux J, Cucchi T, Renaud S, Garcia-Talavera F, Hutterer R.** 2007. Evolution of an invasive rodent on an archipelago as revealed by molar shape analysis: the house mouse in the Canary Islands. *Journal of Biogeography* **34**: 1412-1425.

**Mitteroecker P, Bookstein F.** 2011. Linear Discrimination, Ordination, and the Visualization of Selection Gradients in Modern Morphometrics. *Evolutionary Biology* **38**: 100-114.

**Monteiro LR.** 1999. Multivariate regression models and geometric morphometrics: The search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic Biology* **48**: 192-199.

**Moralee RD, van der Bank FH, van der Waal BCW.** 2000. Biochemical genetic markers to identify hybrids between the endemic *Oreochromis mossambicus* and the alien species, *O. niloticus* (Pisces : Cichlidae). *Water Sa* **26:** 263-268.

**Pérez JE, Nirchio M, Alfonsi C, Muñoz C.** 2006. The biology of invasions: The genetic adaptation paradox. *Biological Invasions* **8:** 1115-1121.

**Prentis PJ, Wilson JRU, Dormontt EE, Richardson DM, Lowe AJ.** 2008. Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science* **13:** 288-294.

**R Development Core Team.** 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0: URL <http://www.R-project.org>.

**Rencher AC.** 2002. *Methods of multivariate analysis*: New York.

**Rohlf FJ, Slice D.** 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* **39:** 40-59.

**Roman J, Darling JA.** 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22:** 454-464.

**Sax DF, Stachowicz JJ, Brown JH, Bruno JF, Dawson MN, Gaines SD, Grosberg RK, Hasting S A, Holt RD, Mayfield MM, O'Connor MI, Rice WR.** 2007. Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22:** 465-471.

**Skelton PH.** 2001. *A complete guide to the freshwater fishes of Southern Africa*. Struik Publishers: Cape Town.

**Stone M.** 1974. Cross-validatory choice and assessment of statistical predictions. . *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **36:** 111-147.

**Trewavas E.** 1983. *Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia*. Cornell University Press: Ithaca New York.

**Vellend M, Harmon LJ, Lockwood JL, Mayfield MM, Hughes AR, Wares JP, Sax DF.**

**2007.** Effects of exotic species on evolutionary diversification. *Trends in Ecology & Evolution* **22:** 481-488.

**Wallace KM, Leslie AJ. 2008.** Diet of the Nile Crocodile (*Crocodylus niloticus*) in the Okavango Delta, Botswana. *Journal of Herpetology* **42:** 361-368.

**Witte F, Welten M, Heemskerk M, van der Stap I, Ham L, Rutjes H, Wanink J. 2008.** Major morphological changes in a Lake Victoria cichlid fish within two decades. *Biological Journal of the Linnean Society* **94:** 41-52.

**Yezerinac SM, Lougheed SC, Handford P. 1992.** Measurement error and morphometric studies - statistical power and observer experience. *Systematic Biology* **41:** 471-482.

## **SECTION II-3.**

# **Monogènes branchiaux et tilapias envahissants : épidémiologie comparée entre l'aire native d'*O. mossambicus* et la Nouvelle-Calédonie et revue de la diversité des monogènes branchiaux africains hors d'Afrique.**

### **OBJECTIFS ET QUESTIONS**

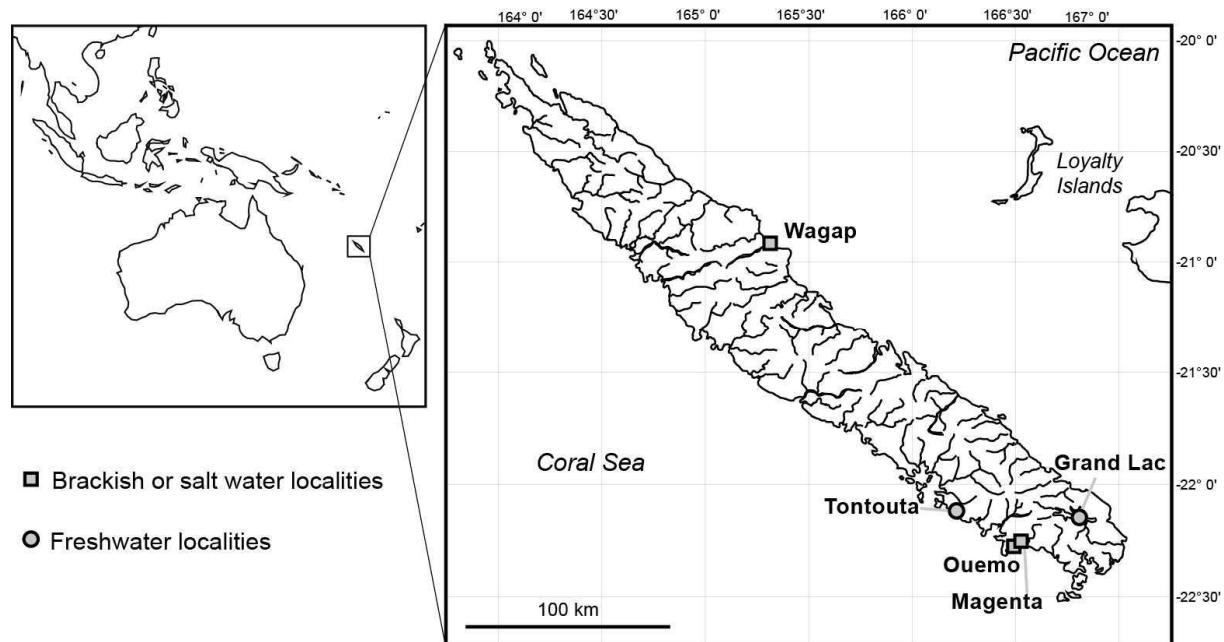
- (1) Quantifier les paramètres épidémiologiques et la diversité du cortège de monogènes branchiaux des populations d'*O. mossambicus* en Nouvelle-Calédonie. Peut-on détecter un effet de l'introduction en dehors de l'aire d'origine ? Le patron obtenu est-il interprétable au regard du potentiel envahissant d'*O. mossambicus* en Nouvelle-Calédonie ?
- (2) Comparer les données obtenues dans un contexte élargi en rassemblant les informations disponibles dans la littérature sur la diversité parasitaire des tilapias introduits hors d'Afrique. Peut-on suggérer des mécanismes susceptibles d'expliquer la diversité des monogènes branchiaux dans les populations de tilapia envahissantes ?

## MATERIEL ET METHODES

### Obtention des données épidémiologiques pour les populations de Nouvelle-Calédonie

Les localités d'échantillonnage et les individus analysés ont été sélectionnés en considérant deux facteurs identifiés comme susceptibles d'affecter l'épidémiologie des monogènes. Premièrement, les fortes salinités sont connues pour affecter négativement l'intensité de l'infection par les monogènes (e.g. Soleng & Bakke, 1997; Schelkle et al., 2011). Les spécimens étudiés sont donc sélectionnés dans des sites présentant une salinité faible (Tontouta, Grand Lac) et élevée (Ouemo, Mare Tontouta, Wagap) (Figure II-3.A).

**Figure II-3.A.** Geographic location of New Caledonia and sampling localities.



Deuxièmement, un effet significatif de la taille de l'hôte sur l'abondance des monogènes est également mis en évidence chez *O. mossambicus* sur l'aire native (Madanire-Moyo et al., 2011; Firmat et al. soumis, Section I-2.). Ainsi les échantillons sélectionnés proviennent de sites où les spécimens tendent à présenter des tailles contrastées : élevées (environ  $\geq 15$  cm SL - Grand Lac, Ouemo, Magenta) et faibles (environ  $\leq 12$  cm SL - Wagap,

Mare Tontouta). Par conséquent les individus de grande taille prélevés en eau douce avaient de plus fortes probabilités d'être infectés par comparaison à des individus de petite taille prélevés en eau saumâtre ou salée. Face à l'absence de parasites observée dès les premiers spécimens analysés, il a été décidé d'augmenter l'effort d'échantillonnage pour le site de Grand Lac, un habitat d'eau douce représenté par des individus de grande taille plus susceptibles de fournir des monogènes dans l'hypothèse où ces derniers seraient extrêmement rares. Les méthodes de dissections sont similaires à celles mises en œuvre en partie I.2 et ont été réalisées par le même opérateur (G. Mutin).

### **Richesse spécifique des monogènes africains hors d'Afrique**

Un second objectif de l'étude est d'inclure les résultats pour la Nouvelle-Calédonie dans un contexte élargi afin de tenter de mettre en relation les patrons d'introduction des tilapias avec la diversité de leur cortège de monogènes branchiaux. Une hypothèse que cette approche permet de tester concerne l'effet des introductions multiples de tilapias sur le nombre sur la diversité spécifique des monogènes branchiaux africains par territoire envahit. En effet, selon l'hypothèse que l'introduction des tilapias avec leur parasites est un événement courant, il est probable que la richesse spécifique des parasites augmente avec le nombre d'introductions (approximé ici par le nombre d'espèces introduites, cf. infra).

Pour ce faire, les résultats obtenus pour la Nouvelle-Calédonie sont combinés à des données collectées dans la littérature sur la diversité des monogènes africains. Les données sont obtenues au travers de recherches dans *Web of Knowledge* et *Google Scholar* en utilisant des combinaisons de mots-clefs (« oreochromis », « tilapia » associé à « parasit\* », « monogenea\* », « Cichlidogyrus », « Scutogyrus »). Seules sont retenues les quelques études traitant de monogènes branchiaux africains identifiés hors d'Afrique, afin d'exclure l'hypothèse que les monogènes mentionnés soient naturellement présents dans le milieu (cf.

partie I.2. pour un contre-exemple). Les références citées par les études retenues sont également incluses dans l'analyse lorsque appropriées. Le nombre d'espèces de monogènes branchiaux et le nombre d'espèces hôtes analysées par étude sont extraits de ces publications. L'analyse se place au niveau des communautés de parasites. Par conséquent, les espèces de monogènes africains sont comptabilisées qu'elles soient identifiées sur des tilapias introduits ou bien sur des espèces hôtes (Jimenez-Garcia et al., 2001; Roche et al., 2010) Le nombre d'espèce de tilapias introduites par territoire est obtenu d'après Fishbase (2011). Le nombre d'espèces introduites ne doit donc pas être considéré ici comme une variable explicative mécanistique (i.e. une espèce hôte introduite =  $n$  espèces de monogènes introduites), mais plutôt comme un estimateur de l'intensité générale des transferts de tilapias sur le territoire et donc de la possible pression de propagule pour le territoire donné. L'effet du nombre d'espèces de tilapia introduites sur la richesse spécifique de monogènes est testé à l'aide d'une régression linéaire simple associée à un test de Fisher. L'emploi d'un test paramétrique peut être discutable étant donné l'effectif limité de l'échantillon analysé (huit territoires). Cependant, l'hypothèse explicative (i.e. le mécanisme reliant hypothétiquement les variables) est clairement identifiée (effet du nombre d'introductions sur le nombre de parasites), ce qui ne peut pas être testé au sens strict par des tests de corrélation non paramétriques. Le nombre d'espèces hôtes analysées par territoire pour chaque étude est susceptible d'affecter le nombre d'espèces parasites documentées. Par conséquent, l'effet du nombre d'espèces hôtes analysées sur le nombre d'espèces de monogènes identifiées est donc également évalué à l'aide d'une régression.

## RESULTATS

Un total de 62 *O. mossambicus* répartis sur cinq localités a été analysé en Nouvelle-Calédonie. Aucun spécimen ne s'est avéré porteur de monogènes (Tableau II-3.A).

Ce résultat est combiné à des données issues de la littérature concernant le nombre d'espèces de monogènes identifiées sur des tilapias hors d'Afrique. Six autres études fournissent le nombre d'espèces de monogènes branchiaux identifiées associées au nombre d'espèces hôtes analysées (Tableau II-3.B). Le nombre d'espèces de tilapia établies par territoire affecte significativement le nombre d'espèces de monogènes associées ( $F_{1,5} = 8.80$ ,  $P = 0.031$ ,  $r^2 = 0.64$ ). Un effet plus significatif du nombre d'espèces hôtes analysées est également détecté ( $F_{1,5} = 38.15$ ,  $P = 0.002$ ,  $r^2 = 0.88$ ). Ces résultats, illustrés en figure II-3.B, indiquent qu'un point en particulier (Madagascar) doit contribuer fortement à la significativité de ces relations. Elles deviennent en effet non-significatives lorsque ce point est retiré ( $P > 0.1$  pour chaque cas). Par ailleurs il n'existe pas de relation significative entre le nombre d'espèces hôtes introduites par territoire et le nombre d'espèces hôtes prises en compte dans chaque cas (corrélation de Spearman, test unilatéral:  $r_s = 0.54$ ,  $P = 0.104$ ).

**Table II-3.A.** Number of host analyzed per sampling station ( $N$ ), parasite prevalence (%) and intensity range (min-max), and number of monogenean species per sampling locality.

Range	Locality	N	Prevalence	Intensity (min-max)	Number of monogenean species
Native Range	Linlangalinwe <sup>1</sup>	23	100	4 - 62	2
	Macosse <sup>1</sup>	8	87.5	1 - 5	3
	Nwanedi-Luphephe dams <sup>2</sup>	157	73.5	1 - 28	5
	Letaba dam <sup>3</sup>	105	-	-	7
New Caledonia	Grand Lac	22	0	0	0
	Wagap	10	0	0	0
	Ouemo	10	0	0	0
	Magenta	10	0	0	0
	Mare Tontouta	10	0	0	0

Sources of data for the native range: <sup>1</sup> Firmat et al. (submitted, see Part I.2) - <sup>2</sup> Madanire-Moyo et al. (2011)  
- <sup>3</sup> Olivier et al. (2009).

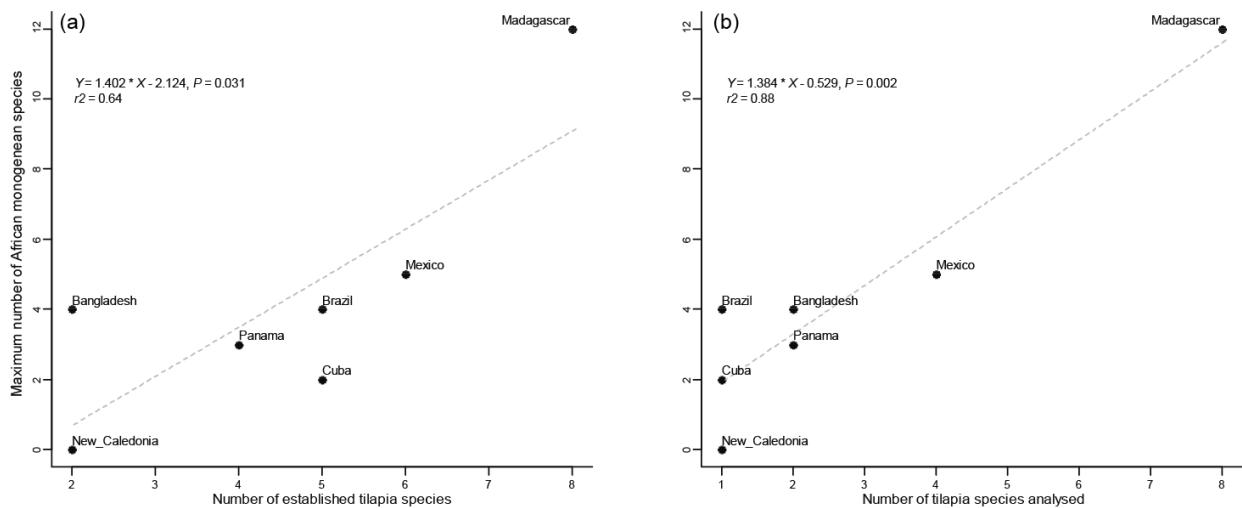
**Table II-3.B.** Summary of bibliographic data concerning monogenean species richness. The number of host. Taxonomic abbreviations for host and parasite genus: *O.*=*Oreochromis*, *T.*=*Tilapia*, *S.*=*Sarotherodon*, *C.*=*Cichlidogyrus*, *S.*=*Scutogyrus*.

Territory	Reference	Host species analysed	Host species names (Fishbase, 2011)	Monogenean species names	Number of host species analysed	Number of host species (Fishbase, 2011)	Number of gill monogenean species
Mexico	Jimenez-Garcia et al. (2001)	<i>O. aureus</i> <i>O. mossambicus</i> <i>O. niloticus</i> <i>Cichlasoma fenestratum</i> <sup>n</sup>	<i>O. aureus</i> <i>O. mossambicus</i> <i>O. niloticus</i> <i>O. urolepsis</i> <i>T. rendalli</i> <i>T. zillii</i>	<i>C. haplochromii</i> <i>C. dossoui</i> <i>C. longicornis</i> <i>C. sclerosus</i> <i>C. tilapiae</i>	4	6	5
Cuba	Mendoza-Franco et al. (2006)	<i>T. rendalli</i>	<i>O. aureus</i> <i>O. mossambicus</i> <i>O. niloticus</i> <i>O. urolepsis</i> <i>T. rendalli</i>	<i>C. sclerosus</i> <i>C. tilapiae</i>	1	5	2
Panama	Roche et al. (2010)	<i>O. niloticus</i> <i>Vieja maculicauda</i> <sup>n</sup>	<i>O. aureus</i> <i>O. mossambicus</i> <i>O. niloticus</i> <i>O. urolepsis</i>	<i>C. dossoui</i> <i>C. sp1</i> <i>C. sp2</i>	2	4	3
Brazil	Jerônimo et al. (2011)	<i>O. niloticus</i>	<i>O. aureus</i> <i>O. mossambicus</i> <i>O. niloticus</i> <i>O. urolepsis</i> <i>T. rendalli</i>	<i>C. sclerosus</i> <i>C. sclerosus</i> <i>C. thurstonaee</i> <i>S. longicornis</i>	1	5	4
Bangladesh	Ferdousi & Chandra (2002) <sup>1</sup>	<i>O. niloticus</i> <i>O. mossambicus</i>	<i>O. niloticus</i> <i>O. mossambicus</i>	<i>C. sclerosus</i> <i>C. thurstonaee</i> <i>C. tilapiae</i> <i>S. longicirrus</i>	2	2	4
Madagascar	Rakotofiringa (1986) <sup>1</sup>	<i>O. niloticus</i> <i>O. mossambicus</i> <i>O. macrochir</i> <i>T. rendalli</i> <i>T. sparrmanii</i> <i>T. zillii</i> <i>T. shiranus</i> <i>T. sp.</i> <i>T. « 3/4 »</i>	<i>O. niloticus</i> <i>O. mossambicus</i> <i>O. macrochir</i> <i>O. aureus</i> <i>O. spirulus</i> <i>T. rendalli</i> <i>T. sparrmanii</i> <i>T. zillii</i>	<i>C. anthracanthus</i> <i>C. tilapiae</i> <i>C. sclerosus</i> <i>C. thurstonaee</i> <i>C. magnus</i> <i>C. ergensi</i> <i>C. longicornis</i> <i>C. longicornis</i> <i>C. longicornis</i> <i>C. gravivaginus</i> <i>C. dossoui</i> <i>C. halinus</i> <i>C. quaestio</i> <i>C. sp.</i>	8	8	12
New Caledonia	This study	<i>O. mossambicus</i>	<i>O. mossambicus</i> <i>S. occidentalis</i>	-	1	2	0

<sup>1</sup> Monogenean species lists were reevaluated by Dr. Antoine Pariselle (personal communication, September 2011).

<sup>n</sup> Native host species

**Figure II-3.B.** Maximum number of African monogenean species recovered per territory and (a) the number of reported introduced tilapia species for each territory (from Fishbase 2011) and (b) the number of tilapia species analyzed per study (see table 2).



## DISCUSSION

Le résultat le plus inattendu de cette étude est l'absence totale de monogènes branchiaux sur les *O. mossambicus* de Nouvelle-Calédonie ce qui contraste avec les prévalences élevées enregistrées pour la même espèce sur son aire d'origine (Olivier et al., 2009; Madanire-Moyo et al., 2011; cf. Tableau II-3.A). Ce résultat est d'autant plus surprenant qu'au moins six études reportent la présence de monogènes africains sur des tilapias introduits hors d'Afrique (cf. Tableau II-3.B). Lorsqu'elles sont reportées, les valeurs de prévalences sont d'un ordre de grandeur similaire à celles constatées sur l'aire native. Par exemple pour *Cichlidogyrus dossoui* des prévalences de 67% et 75% sont reportées pour *Oreochromis niloticus* au Mexique et au Panama respectivement (Jimenez-Garcia et al., 2001; Roche et al., 2010). Aucun parasite monogène natif n'a été relevé sur *O. mossambicus* en Nouvelle-Calédonie, ce qui est peu surprenant étant donné la forte spécificité des monogènes à leurs hôtes, au moins au niveau familial.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence de monogènes en Nouvelle-Calédonie. Premièrement, un goulot d'étranglement démographique fort aurait pu

conduire à la perte de parasites. D'après les données historiques, quarante individus ont été introduits en Nouvelle-Calédonie (Marquet et al., 2003), ce qui est compatible avec la faible diversité génétique des populations de l'île (partie II.1). Ce faible nombre d'individus introduits a dû réduire la probabilité d'introduction de parasites (Torchin et al., 2003). Deuxièmement, *O. mossambicus* est présent en eau salée ou saumâtre en Nouvelle-Calédonie, et il est probable que sa dispersion sur l'île se soit en partie déroulée *via* les eaux côtières comme cela est possible sur l'aire native (D'Amato et al., 2007). La faible tolérance des monogènes à la salinité (voir Pariselle et al., 2011 et références citées) aurait pu conduire à leur élimination en Nouvelle-Calédonie. Cependant, *O. mossambicus* a probablement été acclimaté en eau douce en Nouvelle-Calédonie (Centre agricole de Port-Laguerre) puis introduit en eau douce également dans la région de Yaté et de la Plaine des Lacs seulement deux et trois ans après (Marquet et al., 2003; Hytec & Mary, 2010). Aucun parasite n'a cependant été relevé dans cette région (représentée par le site de Grand Lac). Par conséquent, *O. mossambicus* a pu être introduit sur l'île sans parasites ou bien subir un traitement anti-parasitaire à son arrivée ce qui est une procédure courante en aquaculture (e.g. sulfate de cuivre, cf. Vignon et al., 2009).

L'analyse des données bibliographiques montre que la perte de parasites associée à l'introduction sur un nouveau territoire n'est pas la règle générale chez les tilapias, puisque la plupart des populations introduites sont accompagnées de monogènes branchiaux africains. Deux conclusions peuvent être tirées de la combinaison de ces données : le nombre d'espèces de monogènes branchiaux par territoire augmente avec (i) le nombre d'espèces hôte analysées et (ii) avec le nombre d'espèces hôtes reportées comme introduites sur le territoire. Le nombre d'espèces hôtes analysées est logiquement dépendant (i.e. inférieur ou égal) au nombre d'espèces hôtes introduites. Si ces résultats peuvent être considérés comme peu robustes étant donné le faible nombre de données disponibles prises en compte, ils suggèrent néanmoins que

l'introduction de monogènes associés aux hôtes n'est pas un évènement rare. Par conséquent, la diversité des monogènes pourrait s'avérer un bon indicateur de la diversité des hôtes et de la pression de propagule sur un territoire donné (i.e. *Pression de propagule* =  $N_{\text{événements d'introduction}} \times N_{\text{individus introduits par événement}}$ , voir introduction générale). Cette analyse est évidemment sujette à de nombreux biais ou facteurs non pris en compte qui ne seront mentionnés mais pas discutés ici : différences entre le nombre d'espèces reportées (Fishbase, 2011) et le nombre d'espèces effectivement introduites (mauvaises identifications, introductions non documentées...), hybridation entre hôtes et rôle favorable possible des cichlidés natifs (Nouveau Monde) comme réservoir de parasites africains (Jimenez-Garcia et al., 2001; Roche et al., 2010) avant que la population de tilapia atteigne une densité suffisante. Le principal intérêt de cette analyse a été de suggérer que la pression de propagule pourrait être un élément déterminant de la diversité parasitaire chez les espèces envahissantes. Le développement de cette base de données avec l'inclusion de plus d'informations issues de la littérature grise pourrait offrir prochainement un test plus robuste de cette tendance.

La perte de parasites dans un contexte d'invasion biologique est bien documentée (Torchin et al., 2003), mais ses liens avec le succès populations invasives est encore discutés (Colautti et al., 2004). Les monogènes branchiaux sont connus pour induire un coût indirect chez *Oreochromis* en favorisant des infections bactériennes au niveau des branchies (Xu et al.). Ces résultats expérimentaux doivent être étendus en populations naturelles avec prudence. Ils tendraient cependant à soutenir que l'absence totale de monogènes branchiaux chez les populations de Nouvelle-Calédonie pourrait diminuer les coûts énergétiques résultant des réponses immunologiques associées, et pourrait donc bénéficier à d'autres fonctions importantes dans un contexte d'invasion biologique (p. ex. dispersion, reproduction). Par conséquent, l'absence de monogènes chez les *O. mossambicus* de Nouvelle-Calédonie

pourrait être identifiée comme *l'un des facteurs* ayant probablement contribué sa remarquable expansion sur l'île.

La pression de propagule est généralement considérée comme un facteur clef dans le succès d'un phénomène d'invasion biologique car elle augmente la dynamique démographique des populations introduites et apporte la diversité génétique nécessaire limitant les effets négatifs de la consanguinité et fournissant la variation génétique nécessaire à l'adaptation à un nouveau milieu (Lockwood et al., 2005; Roman & Darling, 2007). Elle est également susceptible d'apporter de nouveaux pathogènes, comme le suggèrent nos résultats. Dans ce cas, les possibles bénéfices du retrait de parasites suivant un goulot d'étranglement de l'hôte peuvent être contrebalancés lors d'introductions multiples. L'apport de parasites supplémentaires peut être vu comme un « effet secondaire indésirable » de la pression de propagules. Cela conduit à suggérer l'hypothèse d'un compromis pour le succès de l'invasion entre l'augmentation de la diversité génétique et de la dynamique démographique (+) et l'apport de nouveaux parasites (-). Le test cette hypothèse est évidemment hors de portée de la présente étude. Ce possible compromis induit par un effet secondaire indésirable de la pression de propagule lié à l'apport de nouveaux pathogènes pourrait à l'avenir fournir un nouveau champ de recherche stimulant.

# CONCLUSION GENERALE

---

## DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE D'*O. MOSSAMBICUS*

Grâce à la collecte de nouveaux échantillons et aux données génétiques obtenues, ce travail a tout d'abord permis d'enrichir les connaissances disponibles sur la distribution géographique d'*O. mossambicus*, tant sur l'air native où l'espèce est menacée, qu'en Nouvelle-Calédonie où l'espèce représente une menace pour les espèces endémiques. Sur l'aire native tout d'abord, la mise en évidence de deux zones de conservation prioritaires avec des populations d'*O. mossambicus* non introgressées remplit une tâche importante que D'Amato et al. (2007) considéraient comme « *challenging* »<sup>9</sup>. Ces résultats seront très prochainement diffusés auprès des autorités locales qui auront la possibilité de prendre les mesures de conservation nécessaires. Le fait qu'une des deux zones de conservation prioritaires (la partie amont du bassin de la Changane) se situe en partie entre les frontières du Parc National de Banhine pourrait faciliter le suivi de populations et des tentatives de contrôle de la possible progression future d'*Oreochromis* sp. envahissants. L'étude des *Oreochromis* de la Changane apporte donc une vision plutôt optimiste pour la conservation d'*O. mossambicus* dans le bassin du Limpopo et contraste avec le bilan plutôt pessimiste dressé par de précédentes études (D'Amato et al., 2007; Tweddle & Wise, 2007). Tweddle & Wise (2007) rappellent que « *there is a strong economic argument to allow the culture of Nile tilapia in the Limpopo catchment as this has already been invaded* ». Nos résultats indiquent que la réalité n'est pas si simple et que la culture d'*Oreochromis* sp. allochtones devrait être sérieusement contrôlée, d'autant plus que la diversité génétique et/ou la pression de propagule pourraient éventuellement jouer un rôle significatif dans leur dispersion au sein du drainage.

---

<sup>9</sup> “The probability of finding pure Mozambique tilapia is challenging.” (D'Amato et al., 2007)

La mission réalisée en Nouvelle-Calédonie<sup>10</sup> a permis de montrer qu'*O. mossambicus* était bien plus répandu sur la Grande Terre que ce qui était reporté dans les synthèses les plus récentes (Marquet et al., 2003). En effet, *O. mossambicus* n'était documenté que dans le Sud de l'île, avec un point à Nouméa et un second dans la Plaine des Lacs. La collecte réalisée a montré qu'*O. mossambicus* était dispersé sur la partie Nord de l'île, tant sur des bassins de la côte Est que de la côte Ouest. Ceci a été confirmé par l'analyse de l'ADNmt qui permet d'exclure avec certitude une confusion éventuelle avec *Sarotherodon occidentalis*, la seconde espèce de tilapia reportée comme établie sur l'île (Marquet et al., 2003; Keith, 2005). Cette réévaluation à la hausse de la distribution de l'espèce devra être prise en compte dans le futur pour d'éventuels plans de gestion et d'éradication de l'espèce. Les données de distribution apportées par cette mission sont déjà intégrées dans un rapport récent sur *O. mossambicus* (Hytec & Mary, 2010) destiné aux directions environnementales de Nouvelle-Calédonie.

## **CONTRIBUTIONS A LA COMPREHENSION DES INVASIONS BIOLOGIQUES**

Ce travail a permis d'aborder plusieurs aspects liés avec la biologie et l'évolution des populations envahissantes. L'étude effectuée au Mozambique représente (à ma connaissance) la première description d'un cas d'introductions multiples et de la diversité des propagules dans un contexte d'invasion biologique avec hybridation interspécifique (Section I-1). Si les résultats obtenus ne permettent pas de tirer des conclusions claires, ils suggèrent cependant que la diversité génétique des propagules tiendrait peut-être un rôle dans l'expansion des génotypes introduits. Ces résultats appellent de futurs travaux sur les invasions avec hybridation qui intégreraient les effets respectifs de la pression de propagule, de la diversité génétique (possiblement associée à la pression de propagule) et de la proximité phylogénétique des propagules introduites avec l'espèce native.

---

<sup>10</sup> La mission en Nouvelle-Calédonie a également permis de mettre en évidence d'identifier une nouvelle espèce allochtone de poisson d'eau douce très probablement établie sur l'île : *Trichogaster trichopterus* (Teleostei, Osphronemidae), cf. article sur le sujet en annexe.

Quels enseignements peut-on tirer de la comparaison de deux systèmes étudiés ?

Premièrement, la richesse spécifique des parasites monogènes est très élevée dans le Limpopo (cinq espèces, Section I-2) et associée à une diversité génétique forte du fait de la présence d'espèces introduites. A l'inverse, la richesse spécifique est nulle en Nouvelle-Calédonie (aucune espèce, Section II-3), pour des populations qui présentent une diversité génétique réduite. Il serait hasardeux de tirer une conclusion définitive à partir de cette seule comparaison. Cependant, elle s'ajoute à une relation probable entre la richesse spécifique des parasites et le nombre d'espèces de tilapia introduites (Section II-3), ce qui suggère que la richesse parasitaire pourrait être un bon estimateur de la diversité génétique et de la pression de propagule chez des populations de tilapia envahissantes.

Deuxièmement, l'hypothèse faisant de la diversité génétique élevée et des introductions multiples des caractéristiques centrales du succès d'une invasion n'est pas soutenue par les deux cas étudiés. Au Mozambique, *O. niloticus* s'est établi en dépit d'une faible diversité génétique détectée (i.e. un seul haplotype mitochondrial documenté), même si son expansion reste relativement limitée dans le Limpopo inférieur. De plus, les génotypes nouveaux (hybrides interspécifiques) résultant de l'apport de diversité, ne semblent pas clairement favorisés au vu de leur fréquence et de leur l'expansion géographique. Mais cela est encore mieux illustré par *O. mossambicus* hors de son aire d'origine, dont les populations se caractérisent par un haplotype également unique et une diversité du génome nucléaire réduite de moitié relativement aux populations natives étudiées (Section II-1). *O. mossambicus* (et probablement d'autres espèces de tilapias introduites) ne s'ajoute donc pas à d'autres cas d'invasions où le potentiel envahissant semble dépendant d'une forte diversité génétique et d'une adaptation rapide (cf. exemples donnés en introduction).

*O. mossambicus* illustre donc bien le « paradoxe génétique des espèces envahissantes » qui introduisait ce travail. La résolution du « paradoxe » pour *O.*

*mossambicus* n'est peut être pas à rechercher dans la variation génétique telle que décrite par des marqueurs supposés neutres. Les deux hypothèses non-exclusives suggérées sont donc (*i*) un effet des goulots d'étranglement affectant de façon moindre la variance génétique additive (notamment dû à des effets épistatiques, Cheverud et al., 1999) comme est déjà documenté pour des populations envahissantes de guppy (Lindholm et al., 2005), et (*ii*) une réponse plastique permettant l'établissement durable de populations dans de nouveaux milieux. Les données disponibles sur la biologie d'*O. mossambicus* tendent à suggérer un effet plastique important (Magdeldin et al., 2007; Schnell & Seebacher, 2008). Cependant, les données obtenues sur la morphologie (Section II-2) pourraient indiquer que suffisamment de variance additive (pour ce trait au moins) a été conservée dans la souche d'origine pour générer la disparité observée, ce en dépit de l'uniformité génétique générale. Il est par conséquent possible de supposer que d'autres traits – possiblement plus fortement impliquées dans l'adaptation (et/ou le potentiel invasif) que la forme du corps – comporteraient possiblement une variance additive moins diminuée relativement à la variation génétique neutre, et sur laquelle la sélection aurait pu agir.

## PERSPECTIVES

L'étude exploratoire présentée dans cette thèse n'a donc évidemment pas répondu à toutes les questions écologiques et évolutives que soulèvent le cas d'*O. mossambicus*. Elle a en revanche fournit une trame descriptive générale qui permettra d'orienter les questionnements et les démarches sur ce modèle peu étudié en biologie évolutive. Par conséquent, plusieurs perspectives sont envisageables. Il est possible de les séparer en deux catégories : les perspectives à court terme qui seront réalisables à partir des données collectées durant cette thèse et les perspectives à moyen ou long terme qui nécessiteront de nouvelles approches ou de nouveaux échantillons.

Les perspectives à court terme concernent dans un premier temps l'analyse de la différenciation morphologique sur une échelle de temps contemporaine, qui sera explorée au travers d'une base de données en cours d'acquisition comprenant sur plus d'un millier de spécimens radiographiés. Quantifier la morphologie du corps à partir d'images Rayon-X met à disposition un grand nombre de points repères de type 1 (au sens de Bookstein, 1991) et permet de réduire considérablement l'erreur de mesure par rapport à l'approche présentée en section II-2 (résultats préliminaires). Les données obtenues permettront une étude plus fine des patrons de variation et de divergence qui n'a pas pu être entreprise avec le jeu de données présenté en section II-2. Premièrement, ce jeu de données sera utilisé pour tester l'hypothèse d'une différenciation morphologique non-neutre (i.e. excédant la divergence attendue sous un modèle de type dérive). En d'autres termes, est-ce que des facteurs externes (e.g. sélection) ont pu déterminer les patrons de divergence contemporains observés ? Une comparaison des données morphologique aux données moléculaires sera effectuée suivant une stratégie de type  $F_{ST}$ - $P_{ST}$  (pour une synthèse critique récente : Brommer, 2011). Il sera possible de tirer parti des données AFLP en suivant les recommandations de Whitlock (2008), qui préconise de comparer les valeurs de  $P_{ST}$  (i.e. la divergence phénotypique d'un trait entre populations) non pas à un  $F_{ST}$  moyen, mais à une distribution de  $F_{ST}$  obtenue pour un grand nombre de loci (e.g. Eroukhmanoff et al., 2009). Afin de fournir un test complémentaire de la même hypothèse, cette analyse sera combinée à une comparaison des vecteurs de divergence entre populations aux principaux vecteurs de variation intra-populations (e.g. Schlüter, 1996; Marroig & Cheverud, 2004). Auparavant, une étude exploratoire de la distribution des patrons d'intégration entre populations et aires géographique sera effectuée, de façon à déterminer si certains facteurs (e.g. environnement, géographie, distance génétique...) pourraient structurer l'espace des matrices de variance-covariance phénotypique (au sens de Mitteroecker & Bookstein, 2009).

A moyen ou long terme, les données morphologiques obtenues durant ce travail et à l'avenir ne pourront réellement être interprétée en profondeur que lorsqu'il sera possible de quantifier la part des bases génétiques et plastiques de la divergence. Un ajout essentiel à la poursuite de ce projet consistera donc en la réalisation d'expériences en jardin communs. Elles permettront d'inscrire pleinement ce travail dans des questionnements actuels concernant la contribution des effets environnementaux et de la plasticité dans le changement phénotypique chez les espèces envahissantes (Westley, 2011) ou de l'évolution contemporaine de la plasticité phénotypique (Crispo et al., 2010).

D'autres perspectives à moyen ou long terme sont envisageables, en partie pour les aspects concernant la génomique des populations. Le scan génomique AFLP n'a pas permis de détecter de loci *outliers* en lien avec la salinité. L'absence de variation adaptative au niveau des loci supposément impliqué dans l'adaptation aux conditions salines (Streelman & Kocher, 2002), a été suggéré pour expliquer ce résultat. Le génotypage de quelques individus au niveau de ces deux microsatellites vraisemblablement fonctionnels et sur de quelques microsatellites neutres (pour comparaison) et permettrait de vérifier si le locus est ou non monomorphe chez les *O. mossambicus* introduits, comme cela est le cas pour l'un des deux loci chez une autre espèce de tilapia tolérante à la salinité (*S. melanotheron* ; Agnès et al., 2008).

*O. mossambicus* peut être considéré comme un cas extrême de succès démographique et d'expansion géographique en dépit d'une faible diversité génétique. L'application de scans génomiques basés sur des méthodes de séquençage *nouvelle génération*, qui permettent d'obtenir plusieurs dizaines de millier de SNPs (*single nucleotide polymorphism*), pourraient s'avérer très utile pour traiter la totalité du polymorphisme de séquences un grand nombre sites (e.g. Hohenlohe et al., 2010). La publication prochaine du génome complet d'*O. niloticus* permettrait de positionner ces marqueurs sur le génome comme cela est possible

avec *Gasterosteus* (épinoches à trois épines) (Hohenlohe et al., 2010). Une telle approche sur *O. mossambicus* permettrait d'aborder plusieurs questions d'importance afin de mieux comprendre l'évolution génomique contemporaine des petites populations. Citons par exemple : le devenir de nouvelles mutations dans un contexte d'expansion géographique (allèles « surfeurs » ? Excoffier et al., 2009), l'architecture génétique de la dépression de consanguinité (synthèse récente : Allendorf et al., 2010) ou l'évolution de l'hétérogénéité de la divergence au sein du génome génomique entre populations issues d'un même évènement fondateur (voir section II-2).

En résumé, la faible diversité des populations envahissantes d'*O. mossambicus*, la large distribution géographique de l'espèce et le fait qu'un génome de référence soit prochainement disponible pourrait encourager l'utilisation d'*O. mossambicus* comme modèle, par exemple en génomique de la conservation (cf. Allendorf et al., 2010). Sans aller jusqu'à prétendre qu'*O. mossambicus* viendra un jour bousculer les épinoches sur le podium des « poissons modèles en évolution », il est possible d'espérer que les patrons de diversité contrastés et les degrés de divergence phénotypiques décrits dans ce travail exploratoire puissent à l'avenir stimuler des études plus approfondies et intégrées sur ce modèle.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aboim, M. A., Mavarez, J., Bernatchez, L. & Coelho, M. M. 2010. Introgressive hybridization between two Iberian endemic cyprinid fish: a comparison between two independent hybrid zones. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 817-828.
- Agnès, J.-F., Adèpo-Gourène, B. & Pouyaud, L. (1998) Natural hybridisation in tilapias. In: *Genetics and Aquaculture in Africa*, (Orstom, ed.).

- Agnèse, J. F., Adepo-Gourene, B. & Nyingi, D. 2008. Functional microsatellite and possible selective sweep in natural populations of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Teleostei, Cichlidae). *Marine Genomics* **1**: 103-107.
- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A. & Luikart, G. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* **11**: 697-709.
- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P. & Wenburg, J. K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 613-622.
- Allendorf, F. W. & Lundquist, L. L. 2003. Introduction: Population Biology, Evolution, and Control of Invasive Species. *Conservation Biology* **17**: 24-30.
- Angienda, P., Lee, H., Elmer, K., Abila, R., Waindi, E. & Meyer, A. 2011. Genetic structure and gene flow in an endangered native tilapia fish (*Oreochromis esculentus*) compared to invasive Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Yala swamp, East Africa. *Conservation Genetics* **12**: 243-255.
- Arnoult, J. 1953. Première note sur les tilapias (poissons) importés à Madagascar. *Le Naturaliste Malgache* **2**: 222-224.
- Atz, J. W. 1954. The perigrinating tilapia. *Animal Kingdom* **57**: 148-155.
- Bacigalupe, L. D. 2009. Biological invasions and phenotypic evolution: a quantitative genetic perspective. *Biological Invasions* **11**: 2243-2250.
- Balirwa, J. S., Chapman, C. A., Chapman, L. J., Cowx, I. G., Geheb, K., Kaufman, L., et al. 2003. Biodiversity and fishery sustainability in the Lake Victoria Basin: An unexpected marriage? *Bioscience* **53**: 703-715.
- Barrett, R. D. H. & Schluter, D. 2008. Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution* **23**: 38-44.
- Beaumont, M. A. 2005. Adaptation and speciation: what can F-st tell us? *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 435-440.

- Beaumont, M. A. & Nichols, R. A. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **263**: 1619-1626.
- Berner, D., Roesti, M., Hendry, A. P. & Salzburger, W. 2010. Constraints on speciation suggested by comparing lake-stream stickleback divergence across two continents. *Molecular Ecology* **19**: 4963-4978.
- Berry, R. J. 1964. Evolution of an island population of the house mouse. *Evolution* **18**: 468-483.
- Blackburn, T. M., Pysek, P., Bacher, S., Carlton, J. T., Duncan, R. P., Jarosík, V., et al. 2011. A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **26**: 333-339.
- Bonin, A., Bellemain, E., Eidesen, P. B., Pompanon, F., Brochmann, C. & Taberlet, P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* **13**: 3261-3273.
- Bonin, A., Ehrich, D. & Manel, S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* **16**: 3737-3758.
- Bonin, A., Taberlet, P., Miaud, C. & Pompanon, F. 2006. Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Biology and Evolution* **23**: 773-783.
- Bookstein, F. L. 1991. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, New York.
- Brock, V. E. 1954. A note on the spawning of Tilapia mossambica in sea water. *Copeia* **1**: 72.
- Brommer, J. E. 2011. Whither  $P_{st}$ ? The approximation of  $Q_{st}$  by  $P_{st}$  in evolutionary and conservation biology. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 1160-1168.

- Brusati, E. D. & Grosholz, E. D. 2006. Native and introduced ecosystem engineers produce contrasting effects on estuarine infaunal communities. *Biological Invasions* **8**: 683-695.
- Cambray, J. & Swartz, E. 2007. *Oreochromis mossambicus*. IUCN Red List of Threatened Species. .
- Campbell, D., Duchesne, P. & Bernatchez, L. 2003. AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites. *Molecular Ecology* **12**: 1979-1991.
- Cano, J. M., Li, M. H., Laurila, A., Vilkki, J. & Merila, J. 2011. First-generation linkage map for the common frog *Rana temporaria* reveals sex-linkage group. *Heredity*.
- Canonico, G. C., Arthington, A., McCrary, J. K. & Thieme, M. L. 2005. The effects of introduced tilapias on native biodiversity. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems* **15**: 463-483.
- Carroll, S. P., Hendry, A. P., Reznick, D. N. & Fox, C. W. 2007. Evolution on ecological time-scales. *Functional Ecology* **21**: 387-393.
- Cheverud, J. M., Vaughn, T. T., Pletscher, L. S., King-Ellison, K., Bailiff, J., Adams, E., et al. 1999. Epistasis and the evolution of additive genetic variance in populations that pass through a bottleneck. *Evolution* **53**: 1009-1018.
- Choudhury, A. & Dick, T. A. 2001. Sturgeons (Chondrostei : Acipenseridae) and their metazoan parasites: patterns and processes in historical biogeography. *Journal of Biogeography* **28**: 1411-1439.
- Claude, J. 2008. *Morphometrics with R*. Springer, New York.
- Clavero, M. & García-Berthou, E. 2005. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 110-110.

- Colautti, R. I., Eckert, C. G. & Barrett, S. C. H. 2010. Evolutionary constraints on adaptive evolution during range expansion in an invasive plant. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **277**: 1799-1806.
- Colautti, R. I., Grigorovich, I. A. & MacIsaac, H. J. 2006. Propagule pressure: A null model for biological invasions. *Biological Invasions* **8**: 1023-1037.
- Colautti, R. I., Maron, J. L. & Barrett, S. C. H. 2009. Common garden comparisons of native and introduced plant populations: latitudinal clines can obscure evolutionary inferences. *Evolutionary Applications* **2**: 187-199.
- Colautti, R. I., Ricciardi, A., Grigorovich, I. A. & MacIsaac, H. J. 2004. Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecology Letters* **7**: 721-733.
- Cornuet, J. M. & Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**: 2001-2014.
- Costa-Pierce, B. 2003. Rapid evolution of an established feral tilapia (*Oreochromis* spp.): the need to incorporate invasion science into regulatory structures. *Biological Invasions* **5**: 71-84.
- Coward, K. & Little, D. 2001. Culture of the 'aquatic chicken': present concerns and future prospects. *Biologist* **48**: 12-16.
- Crispo, E., DiBattista, J. D., Correa, C., Thibert-Plante, X., McKellar, A. E., Schwartz, A. K., *et al.* 2010. The evolution of phenotypic plasticity in response to anthropogenic disturbance. *Evolutionary Ecology Research* **12**: 47-66.
- Crispo, E., Moore, J., Lee-Yaw, J., Gray, S. & Haller, B. 2011. Broken barriers: Human-induced changes to gene flow and introgression in animals: An examination of the ways in which humans increase genetic exchange among populations and species and the consequences for biodiversity. *Bioessays* **33**: 508-518.

- Currat, M., Excoffier, L., Maddison, W., Otto, S. P., Ray, N., Whitlock, M. C., *et al.* 2006. Comment on "Ongoing adaptive evolution of ASPM, a brain size determinant in homo sapiens" and "microcephalin, a gene regulating brain size, continues to evolve adaptively in humans". *Science* **313**: 172.
- D'Amato, M. E., Esterhuyse, M. M., van der Waal, B. C. W., Brink, D. & Volckaert, F. A. M. 2007. Hybridization and phylogeography of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* in southern Africa evidenced by mitochondrial and microsatellite DNA genotyping. *Conservation Genetics* **8**: 475-488.
- Daguet, J. & Moreau, J. 1981. Hybridation introgressive entre deux espèces de *Sarotherodon* (Pisces, Ciclidae) dans un lac de Madagascar. *Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle* **4**: 689-703.
- de Moor, I. J. & Bruton, M. N. 1988. *Atlas of alien and translocated indigenous aquatic animals in southern Africa. A report of the Committee for Nature Conservation Research National Programme for Ecosystem Research*. Port Elizabeth, South Africa.
- De Silva, C. D. & Ranasinghe, J. 1989. Biochemical evidence of hybrid gene introgression in some reservoir populations of tilapia in southern Sri Lanka. *Aquaculture and Fisheries management* **20**: 269-277.
- Devambez, L. C. 1964. Tilapia in the South Pacific. *South Pacific Bulletin* **14**: 27-53.
- Dlugosch, K. M. & Parker, I. M. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17**: 431-449.
- Dunn, A. M. (2009) Parasites and biological invasions. In: *Advances in Parasitology*, Vol. 68. pp. 161-184. Elsevier Academic Press Inc, San Diego.

Eroukhmanoff, F., Hargeby, A. & Svensson, E. I. 2009. Rapid adaptive divergence between ecotypes of an aquatic isopod inferred from  $F_{ST}$ - $Q_{ST}$  analysis. *Molecular Ecology* **18**: 4912-4923.

Estoup, A. & Guillemaud, T. 2010. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology* **19**: 4113-4130.

Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620.

Excoffier, L., Foll, M. & Petit, R. J. (2009) Genetic Consequences of Range Expansions. In: *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, Vol. 40. pp. 481-501 Annual Review of Ecology Evolution and Systematics.

Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. A. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.

Facon, B., Jarne, P., Pointier, J. P. & David, P. 2005. Hybridization and invasiveness in the freshwater snail *Melanoides tuberculata*: hybrid vigour is more important than increase in genetic variance. *Journal of Evolutionary Biology* **18**: 524-535.

Facon, B., Pointier, J. P., Jarne, P., Sarda, V. & David, P. 2008. High genetic variance in life-history strategies within invasive populations by way of multiple introductions. *Current Biology* **18**: 363-367.

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567-1587.

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* **7**: 574-578.

FAO (2011) *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758 ) Cultured Aquatic Species Information Programme.

Feder, J. L. & Nosil, P. 2010. The efficacy of divergence hitchhiking in generating genomic islands during ecological speciation. *Evolution* **64**: 1729-1747.

Ferdousi, U. K. & Chandra, K. J. 2002. Monogenean gill parasites of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *Oreochromis mossambicus* (Peters) (Osteichthyes, Cichlidae) from Mymensingh, Bangladesh. *Rivista di Parassitologia* **64**: 49-60.

Ficetola, G. F., Bonin, A. & Miaud, C. 2008. Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. *Molecular Ecology* **17**: 773-782.

Firmat, C., Schliewen, U. K., Losseau, M. & Alibert, P. sous presse. Body shape differentiation at global and local geographic scales in the invasive cichlid *Oreochromis mossambicus* *Biological Journal of the Linnean Society* **In press**.

Fishbase 2011. Fishbase. See <http://www.fishbase.org/home.htm>. (Accessed: 15 January 2011).

Fitzpatrick, B. M., Johnson, J. R., Kump, D. K., Smith, J. J., Voss, S. R. & Shaffer, H. B. 2010. Rapid spread of invasive genes into a threatened native species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 3606-3610.

Foll, M. & Gaggiotti, O. 2008. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics* **180**: 977-993.

Franssen, N. R. 2011. Anthropogenic habitat alteration induces rapid morphological divergence in a native stream fish. *Evolutionary Applications* **In press**

- Gagnaire, P. A., Albert, V., Jonsson, B. & Bernatchez, L. 2009. Natural selection influences AFLP intraspecific genetic variability and introgression patterns in Atlantic eels. *Molecular Ecology* **18**: 1678-1691.
- Garcia-Berthou, E. 2007. The characteristics of invasive fishes: what has been learned so far? *Journal of Fish Biology* **71**: 33-55.
- Garoia, F., Guarniero, I., Grifoni, D., Marzola, S. & Tinti, F. 2007. Comparative analysis of AFLPs and SSRs efficiency in resolving population genetic structure of Mediterranean Solea vulgaris. *Molecular Ecology* **16**: 1377-1387.
- Goudie, A. S. 2005. The drainage of Africa since the cretaceous. *Geomorphology* **67**: 437-456.
- Grapputo, A., Boman, S., Lindstrom, L., Lyytinen, A. & Mappes, J. 2005. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology* **14**: 4207-4219.
- Guillot, G. & Carpentier-Skandalis, A. 2011. On the informativeness of dominant and co-dominant genetic markers for Bayesian supervised clustering. *The Open Statistics and Probability Journal* **In press**.
- Guiraud, M., Buta-Neto, A. & Quesne, D. 2010. Segmentation and differential post-rift uplift at the Angola margin as recorded by the transform-rifted Benguela and oblique-to-orthogonal-rifted Kwanza basins. *Marine and Petroleum Geology* **27**: 1040-1068.
- Hallatschek, O., Hersen, P., Ramanathan, S. & Nelson, D. R. 2007. Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 19926-19930.
- Hänfling, B. 2007. Understanding the establishment success of non-indigenous fishes: lessons from population genetics. *Journal of Fish Biology* **71**: 115-135.

- Hawley, D. M., Hanley, D., Dhondt, A. A. & Lovette, I. J. 2006. Molecular evidence for a founder effect in invasive house finch (*Carpodacus mexicanus*) populations experiencing an emergent disease epidemic. *Molecular Ecology* **15**: 263-275.
- Hendry, A. P., Farrugia, T. J. & Kinnison, M. T. 2008. Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Molecular Ecology* **17**: 20-29.
- Hendry, A. P., Wenburg, J. K., Bentzen, P., Volk, E. C. & Quinn, T. P. 2000. Rapid evolution of reproductive isolation in the wild: Evidence from introduced salmon. *Science* **290**: 516-518.
- Herder, F., Pfaender, J. & Schliewen, U. K. 2008. Adaptive sympatric speciation of polychromatic "roundfin" sailfin silverside fish in Lake Matano (Sulawesi). *Evolution* **62**: 2178-2195.
- Hodgkiss, I. & Man, H. 1978. Reproductive biology of *Sarotherodon mossambicus* (Cichlidae) in Plover Cove Reservoir, Hong Kong. *Environmental Biology of Fishes* **3**: 287-292.
- Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Etter, P. D., Stiffler, N., Johnson, E. A. & Cresko, W. A. 2010. Population Genomics of Parallel Adaptation in Threespine Stickleback using Sequenced RAD Tags. *PLoS Genet* **6**: e1000862.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**: 1322-1332.
- Hugues, R. H. & Hugues, J. S. 1992. *A directory of African wetlands*. IUCN, UNEP, WCMC, Cambridge.
- Hytec & Mary, N. (2010) Partie 5. *Oreochromis mossambicus* (tilapia du Mozambique). In: *Etude du caractère invasif de quelques espèces animales et végétales introduites dans les milieux dulçaquicoles en Nouvelle-Calédonie*. pp. Province Nord Direction du

développement économique et de l'environnement Service environnement - Province Sud Direction de l'environnement Service des milieux terrestres.

James, N. P. E. & Bruton, M. N. 1992. Alternative life-history traits associated with reproduction in *Oreochromis mossambicus* (Pisces, Cichlidae) in small water bodies of the easter Cape, South Africa. *Environmental Biology of Fishes* **34**: 379-392.

Jerônimo, G. T., Speck, G. M., Cechinel, M. M., Goncalves, E. L. T. & Martins, M. L. 2011. Seasonal variation on the ectoparasitic communities of Nile tilapia cultured in three regions in southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **71**: 365-373.

Jimenez-Garcia, M. I., Vidal-Martinez, V. M. & Lopez-Jimenez, S. 2001. Monogeneans in introduced and native cichlids in Mexico: Evidence for transfer. *Journal of Parasitology* **87**: 907-909.

Johnston, R. F. & Selander, R. K. 1964. House sparrows - Rapid evolution of races in North America. *Science* **144**: 548-550.

Keane, R. M. & Crawley, M. J. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 164-170.

Keith, P. 2002. Threatened fishes of the world: *Galaxias neocaledonicus* Weber & de Beaufort, 1913 (Galaxiidae). *Environmental Biology of Fishes* **63**: 26-26.

Keith, P. 2005. Introduction of freshwater fishes and decapod crustaceans in New Caledonia, a review. *Revue D Ecologie-La Terre Et La Vie* **60**: 45-55.

Keller, S. R. & Taylor, D. R. 2008. History, chance and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecology Letters* **11**: 852-866.

Klett, V. & Meyer, A. 2002. What, if anything, is a Tilapia? - Mitochondrial ND2 phylogeny of tilapiines and the evolution of parental care systems in the African cichlid fishes. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 865-883.

- Klopfenstein, S., Currat, M. & Excoffier, L. 2006. The fate of mutations surfing on the wave of a range expansion. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 482-490.
- Kolbe, J. J., Glor, R. E., Schettino, L. R. G., Lara, A. C., Larson, A. & Losos, J. B. 2004. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* **431**: 177-181.
- Kolbe, J. J., Larson, A. & Losos, J. B. 2007. Differential admixture shapes morphological variation among invasive populations of the lizard *Anolis sagrei*. *Molecular Ecology* **16**: 1579-1591.
- Kolbe, J. J., Larson, A., Losos, J. B. & de Queiroz, K. 2008. Admixture determines genetic diversity and population differentiation in the biological invasion of a lizard species. *Biology Letters* **4**: 434-437.
- Konishi, M. & Takata, K. 2004. Impact of asymmetrical hybridization followed by sterile F<sub>1</sub> hybrids on species replacement in *Pseudorasbora*. *Conservation Genetics* **5**: 463-474.
- Kvach, Y. & Skora, K. E. 2007. Metazoa parasites of the invasive round goby *Apollonia melanostoma* (*Neogobius melanostomus*) (Pallas) (Gobiidae : Osteichthyes) in the Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland: a comparison with the Black Sea. *Parasitology Research* **100**: 767-774.
- Lavergne, S. & Molofsky, J. 2007. Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3883-3888.
- le Roux, L. E. & Avenant-Oldewage, A. 2010. Checklist of the fish parasitic genus *Cichlidogyrus* (Monogenea), including its cosmopolitan distribution and host species. *African Journal of Aquatic Science* **35**: 21-36.
- Lee, B., Lee, W., Streelman, J., Carleton, K., Howe, A., Hulata, G., et al. 2005. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics* **170**: 237 - 44.

- Lee, C. E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 386-391.
- Lewontin, R. C. & Krakauer, J. 1973. Distribution of gene frequency as a test of theory of selective neutrality of polymorphisms. *Genetics* **74**: 175-195.
- Lindholm, A. K., Breden, F., Alexander, H. J., Chan, W. K., Thakurta, S. G. & Brooks, R. 2005. Invasion success and genetic diversity of introduced populations of guppies *Poecilia reticulata* in Australia. *Molecular Ecology* **14**: 3671-3682.
- Lockwood, J. L., Cassey, P. & Blackburn, T. 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 223-228.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S. & de Poorter, M. (2000) 100 of the world's worst invasive alien species database. In: *The Invasive Species Specialist Group (ISSG)*, Aliens newsletter, Auckland.
- Lucek, K., Roy, D., Bezault, E., Sivasundar, A. & Seehausen, O. 2010. Hybridization between distant lineages increases adaptive variation during a biological invasion: stickleback in Switzerland. *Molecular Ecology* **19**: 3995-4011.
- Madanire-Moyo, G. N., Matla, M. M., Olivier, P. A. S. & Luus-Powell, W. J. 2011. Population dynamics and spatial distribution of monogeneans on the gills of *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) from two lakes of the Limpopo River System, South Africa. *Journal of Helminthology* **85**: 146-152.
- Magdeldin, S., Uchida, K., Hirano, T., Grau, G., Abdelfattah, A. & Nozaki, M. 2007. Effects of environmental salinity on somatic growth and growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fisheries Science* **73**: 1025-1034.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 229-237.

- Marquet, G., Keith, P. & Vigneux, E. 2003. *Atlas des poissons et des crustacés d'eau douce de Nouvelle-Calédonie*. Partimoines Naturels, Paris.
- Marroig, G. & Cheverud, J. M. 2004. Did natural selection or genetic drift produce the cranial diversification of neotropical monkeys? *American Naturalist* **163**: 417-428.
- Mathys, B. A. & Lockwood, J. L. 2009. Rapid evolution of great kiskadees on Bermuda: an assessment of the ability of the island rule to predict the direction of contemporary evolution in exotic vertebrates. *Journal of Biogeography* **36**: 2204-2211.
- McKinna, E. M., Nandlal, S., Mather, P. B. & Hurwood, D. A. 2010. An investigation of the possible causes for the loss of productivity in genetically improved farmed tilapia strain in Fiji: inbreeding versus wild stock introgression. *Aquaculture Research* **41**: e730-e742.
- Mendoza-Franco, E., Vidal-Martínez, V., Cruz-Quintana, Y. & León, F. 2006. Monogeneans on native and introduced freshwater fishes from Cuba with the description of a new species of *Salsuginus* Beverley-Burton, 1984 from *Limia vittata* (Poeciliidae). *Systematic Parasitology* **64**: 181-190.
- Merella, P., Casu, M., Garippa, G. & Pais, A. 2010. Lessepsian fish migration: genetic bottlenecks and parasitological evidence. *Journal of Biogeography* **37**: 978-980.
- Meudt, H. M. & Clarke, A. C. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* **12**: 106-117.
- Mitchell, C. E. & Power, A. G. 2003. Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature* **421**: 625-627.
- Mitteroecker, P. & Bookstein, F. 2009. The ontogenetic trajectory of the phenotypic covariance matrix, with examples from cranofacial shape in rats and humans. *Evolution* **63**: 727-737.

- Moralee, R. D., van der Bank, F. H. & van der Waal, B. C. W. 2000. Biochemical genetic markers to identify hybrids between the endemic *Oreochromis mossambicus* and the alien species, *O. niloticus* (Pisces : Cichlidae). *Water SA* **26**: 263-268.
- Mueller, U. G. & Wolfenbarger, L. L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 389-394.
- Nagl, S., Tichy, H., Mayer, W. E., Samonte, I. E., McAndrew, B. J. & Klein, J. 2001. Classification and phylogenetic relationships of African tilapiine fishes inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**: 361-374.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283-&.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nelson, S. G. & Eldredge, L. 1991. Distribution and status of introduced cichlid fishes of the genera *Oreochromis* and *Tilapia* in the Islands of the South Pacific and Micronesia. *Asian Fisheries Science* **4**: 11-22.
- Nolte, A. W. & Tautz, D. 2010. Understanding the onset of hybrid speciation. *Trends in Genetics* **26**: 54-58.
- Nosil, P., Funk, D. J. & Ortiz-Barrientos, D. 2009. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology* **18**: 375-402.
- Olivier, P. A. S., Luus-Powell, W. J. & Saayman, J. E. 2009. Report on some monogenean and clinostomid infestations of freshwater fish and waterbird hosts in Middle Letaba Dam, Limpopo Province, South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **76**: 187-199.
- Orr, H. A. & Unckless, R. L. 2008. Population extinction and the genetics of adaptation. *American Naturalist* **172**: 160-169.

- Page, T. J. & Hughes, J. M. 2010. Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes. *Journal of Fish Biology* **77**: 2093-2122.
- Paradis, E. 2010. pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics* **26**: 419-420.
- Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* **20**: 289-290.
- Pariselle, A., Boeger, W. A., Snoeks, J., Bilong Bilong, C. F., Morand, S. & Vanhove, M. P. M. 2011. The monogenean parasite fauna of cichlids: a potential tool for host biogeography. *International Journal of Evolutionary Biology* **2011**.
- Pariselle, A. & Euzet, L. 2009. Systematic revision of dactylogyridean parasites (Monogenea) from cichlid fishes in Africa, the Levant and Madagascar. *Zoosystema* **31**: 849-898.
- Perez-Figueroa, A., Garcia-Pereira, M. J., Saura, M., Rolan-Alvarez, E. & Caballero, A. 2010. Comparing three different methods to detect selective loci using dominant markers. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 2267-2276.
- Pérez, J. E., Nirchio, M., Alfonsi, C. & Muñoz, C. 2006. The biology of invasions: The genetic adaptation paradox. *Biological Invasions* **8**: 1115-1121.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E. & Taberlet, P. 2005. Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* **6**: 847-859.
- Prenter, J., MacNeil, C., Dick, J. T. A. & Dunn, A. M. 2004. Roles of parasites in animal invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 385-390.
- Prentis, P. J., Wilson, J. R. U., Dormontt, E. E., Richardson, D. M. & Lowe, A. J. 2008. Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science* **13**: 288-294.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.

Pullin, R. 1988. *Tilapia Genetic Resources for Aquaculture*. Manila, Philippines.

R Development Core Team 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0. URL <http://www.R-project.org>.

Raghavan, R., Prasad, G., Anvar-Ali, P. H. & Pereira, B. 2008. Exotic fish species in a global biodiversity hotspot: observations from River Chalakudy, part of Western Ghats, Kerala, India. *Biological Invasions* **10**: 37-40.

Rakotofiringa, S. L. (1986) Les Monogènes parasites de Poissons continentaux et marins de Madagascar (Taxonomie - Spécificité - Affinités). In: *Thèse d'Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedo*. pp. 309 p. Montpellier.

Reznick, D. N., Shaw, F. H., Rodd, F. H. & Shaw, R. G. 1997. Evaluation of the rate of evolution in natural populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Science* **275**: 1934-1937.

Rhymer, J. M. & Simberloff, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**: 83-109.

Rhymer, J. M., Williams, M. J. & Braun, M. J. 1994. Mitochondrial analysis of gene flow between New-Zealand mallards (*Anas platyrhynchos*) and grey-ducks (*A. superciliosa*). *Auk* **111**: 970-978.

Richardson, D. M., Pysek, P., Rejmanek, M., Barbour, M., Pannetta, F. & West, C. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions* **6**: 93-107.

Roche, D. G., Leung, B., Franco, E. F. M. & Torchin, M. E. 2010. Higher parasite richness, abundance and impact in native versus introduced cichlid fishes. *Int J Parasitol* **40**: 1525-1530.

- Rohlf, F. J. & Slice, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* **39**: 40-59.
- Roman, J. & Darling, J. A. 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 454-464.
- Ross, K. G. & Shoemaker, D. D. 2008. Estimation of the number of founders of an invasive pest insect population: the fire ant *Solenopsis invicta* in the USA. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **275**: 2231-2240.
- Ryan, M. E., Johnson, J. R. & Fitzpatrick, B. M. 2009. Invasive hybrid tiger salamander genotypes impact native amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 11166-11171.
- Sasal, P. 2006. Nest guarding in a damselfish: evidence of a role for parasites. *Journal of Fish Biology* **68**: 1215-1221.
- Schelkle, B., Doetjes, R. & Cable, J. 2011. The salt myth revealed: Treatment of gyrodactylid infections on ornamental guppies, *Poecilia reticulata*. *Aquaculture* **311**: 74-79.
- Schliep, K. P. 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* **27**: 592-593.
- Schluter, D. 1996. Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution* **50**: 1766-1774.
- Schneider, M. F. 2003. Ocorrência das espécies comerciais exóticas de peixe no Rio Limpopo depois das cheias no ano 2000. *Boletim de Investigação Florestal December 2003*: 31-36.
- Schnell, A. K. & Seebacher, F. 2008. Can Phenotypic Plasticity Facilitate the Geographic Expansion of the Tilapia *Oreochromis mossambicus*? *Physiological and Biochemical Zoology* **81**: 733-742.
- Schoener, T. W. 2011. The Newest Synthesis: Understanding the Interplay of Evolutionary and Ecological Dynamics. *Science* **331**: 426-429.

- Schuster, W. 1952. *Fish culture in brackishwater ponds of Java*. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- Schwarzer, J., Misof, B., Tautz, D. & Schliewen, U. K. 2009. The root of the East African cichlid radiations. *BMC Evolutionary Biology* **9**.
- Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 198-207.
- Seehausen, O., Takimoto, G., Roy, D. & Jokela, J. 2008. Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Molecular Ecology* **17**: 30-44.
- Shine, R., Brown, G. P. & Phillips, B. L. 2011. An evolutionary process that assembles phenotypes through space rather than through time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 5708-5711.
- Skelton, P. H. 2001. *A complete guide to the freshwater fishes of Southern Africa*. Struik Publishers, Cape Town.
- Soleng, A. & Bakke, T. A. 1997. Salinity tolerance of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea): laboratory studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**: 1837-1845.
- Stinchcombe, J. R. & Hoekstra, H. E. 2008. Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity* **100**: 158-170.
- Stockwell, C. A., Hendry, A. P. & Kinnison, M. T. 2003. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 94-101.
- Storz, J. F. 2005. Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology* **14**: 671-688.
- Streelman, J. T. & Kocher, T. D. 2002. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia. *Physiological Genomics* **9**: 1-4.

- Tice, K. A. & Carlon, D. B. 2011. Can AFLP genome scans detect small islands of differentiation? The case of shell sculpture variation in the periwinkle *Echinolittorina hawaiiensis*. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 1814-1825.
- Tilapia Eradication Team (2004) Tilapia Eradication Effort – Phase I Final Report. pp. Environmental Quality Protection Board (EQPB) Republic of Palau.
- Tollenaere, C., Brouat, C., Duplantier, J.-M., Rahalison, L., Rahelinirina, S., Pascal, M., et al. 2010. Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar. *Journal of Biogeography* **37**: 398-410.
- Tollenaere, C., Duplantier, J. M., Rahalison, L., Ranjalahy, M. & Brouat, C. 2011. AFLP genome scan in the black rat (*Rattus rattus*) from Madagascar: detecting genetic markers undergoing plague-mediated selection. *Molecular Ecology* **20**: 1026-1038.
- Torchin, M. E., Lafferty, K. D., Dobson, A. P., McKenzie, V. J. & Kuris, A. M. 2003. Introduced species and their missing parasites. *Nature* **421**: 628-630.
- Trewavas, E. 1983. *Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia*. Cornell University Press, Ithaca New York.
- Tweddle, D. & Wise, R. (2007) Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). The economic impact and appropriate management of selected invasive alien species on the African continent, Appendix 3. In: *Final Report prepared for the Global Invasive Species Programme*, Vol. CSIR Report Number CSIR/NRE/RBSD/ER/2007/0044/C (Wise, R., van Wilgen, B., Hill, M., Schulthess, F., Tweddle, D., Chabi-Olay, A. & Zimmerman, H., eds.). pp.
- Uphyrkina, O., Miquelle, D., Quigley, H., Driscoll, C. & O'Brien, S. J. 2002. Conservation Genetics of the Far Eastern Leopard (*Panthera pardus orientalis*). *Journal of Heredity* **93**: 303-311.

- van der Bank, F. H. & Deacon, A. 2007. Increased backcrossing has reduced the usefulness of morphological and allozyme data for identifying *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* (Teleostei: Cichlidae) and their hybrids in the Pafuri reach of the Luvuvhu River in the Kruger National Park, South Africa. *Afr J Aquat Sc* **32**: 193-196.
- van der Waal, B. & Bills, R. 2000. *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) now in the Limpopo River System. *S Afr J Sc* **96**: 47-48.
- Vass, K. & Hofstede, A. 1952. Studies on *Tilapia mossambica* Peters (ikan mudjair) in Indonesia. *Contribution of the inland fisheries research stations Djakarta Bogor Indonesia* **1**: 1-68.
- Vekemans, X., Beauwens, T., Lemaire, M. & Roldan-Ruiz, I. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* **11**: 139-151.
- Vellend, M., Harmon, L. J., Lockwood, J. L., Mayfield, M. M., Hughes, A. R., Wares, J. P., et al. 2007. Effects of exotic species on evolutionary diversification. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 481-488.
- Verhoeven, K. J. F., Macel, M., Wolfe, L. M. & Biere, A. 2011. Population admixture, biological invasions and the balance between local adaptation and inbreeding depression. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **278**: 2-8.
- Via, S. & West, J. 2008. The genetic mosaic suggests a new role for hitchhiking in ecological speciation. *Molecular Ecology* **17**: 4334-4345.
- Vidal, O., García-Berthou, E., Tedesco, P. A. & García-Marín, J. L. 2010. Origin and genetic diversity of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) introduced to Europe. *Biological Invasions* **12**: 841-851.

- Vignon, M., Sasal, P. & Galzin, R. 2009. Host introduction and parasites: a case study on the parasite community of the peacock grouper *Cephalopholis argus* (Serranidae) in the Hawaiian Islands. *Parasitology Research* **104**: 775-782.
- Vitalis, R., Dawson, K., Boursot, P. & Belkhir, K. 2003. DetSel 1.0: A computer program to detect markers responding to selection. *Journal of Heredity* **94**: 429-431.
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J. & Melillo, J. M. 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science* **277**: 494-499.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vandeleer, T., Hornes, M., et al. 1995. AFLP - a new technique for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- Walsh, M. R., Munch, S. B., Chiba, S. & Conover, D. O. 2006. Maladaptive changes in multiple traits caused by fishing: impediments to population recovery. *Ecology Letters* **9**: 142-148.
- Wang, Z. S., Baker, A. J., Hill, G. E. & Edwards, S. V. 2003. Reconciling actual and inferred population histories in the house finch (*Carpodacus mexicanus*) by AFLP analysis. *Evolution* **57**: 2852-2864.
- Westley, P. A. H. W. P. A. H. 2011. What invasive species reveal about the rate and form of contemporary phenotypic change in nature. *American Naturalist* **177**: 496-509.
- Whitlock, M. C. 2008. Evolutionary inference from Qst. *Molecular Ecology* **17**: 1885-1896.
- Xu, D. H., Shoemaker, C. A. & Klesius, P. H. 2007. Evaluation of the link between gyrodactylosis and streptococcosis of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J Fish Diseases* **30**: 233-238.
- Zalewski, A., Michalska-Parda, A., Bartoszewicz, M., Kozakiewicz, M. & Brzezinski, M. 2010. Multiple introductions determine the genetic structure of an invasive species population: American mink *Neovison vison* in Poland. *Biological Conservation* **143**: 1355-1363.

Zhang, Y. Y., Zhang, D. Y. & Barrett, S. C. H. 2010. Genetic uniformity characterizes the invasive spread of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), a clonal aquatic plant. *Molecular Ecology* **19**: 1774-1786.

Zhivotovsky, L. A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* **8**: 907-913.

# ANNEXES

---

## ANNEXES DE LA SECTION I-1.

### **Section I-1 Supplementary material S1.** Number of loci per primer combination.

EcoRI-ACA/MseI-CAA	EcoRI-ACA/MseI-CTT	EcoRI-ACT/MseI-CTC	EcoRI-ACC/MseI-CTG	EcoRI-ACT/MseI-CTG	EcoRI-ACT/MseI-CAC
89	83	56	62	67	66

### **Section I-1 Supplementary material S2.** Control region sequences used in this study.

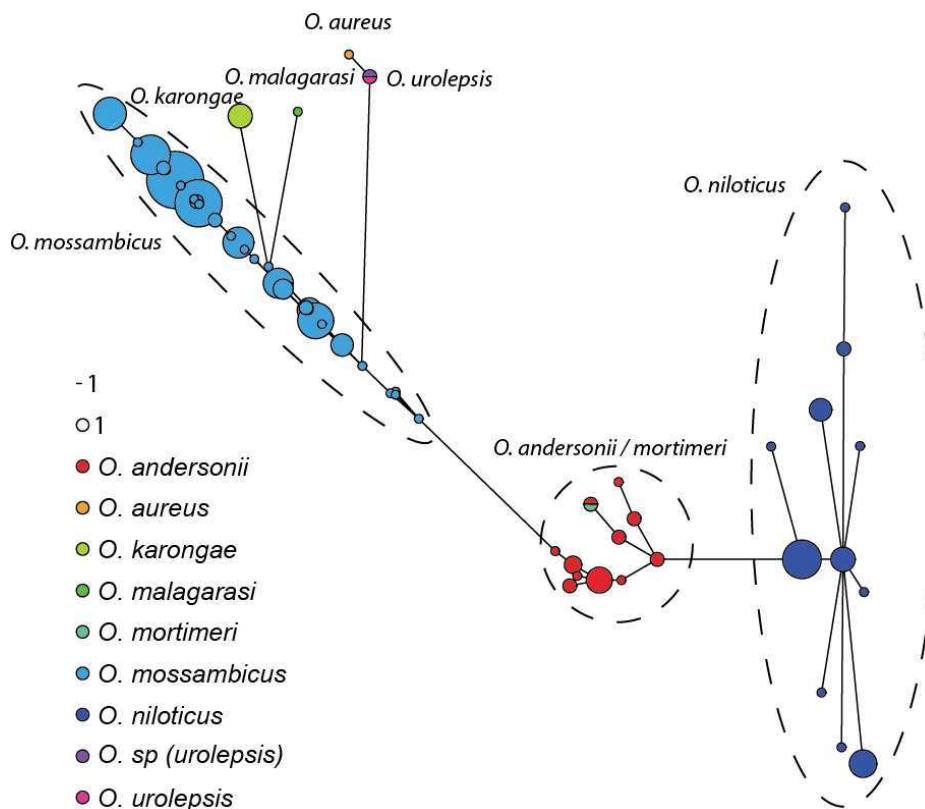
Seq_name/Genbank accession Number	Species	Loc	Zone Changane
CH7-P2-A12-L19	Omos	DJO	Lakes
CH14-P-1-D11-L19	Omos	DJO	Lakes
CH15-P-1-E11-L19	Omos	DJO	Lakes
CH17-P-1-F11-L19	Omos	DJO	Lakes
CH25-P2-B12-L19	Omos	DJO	Lakes
CH26-P2-C12-L19	Omos	DJO	Lakes
CH22-P3_Fir-C3-L19	Omos	DJO	Lakes
CH24-P3_Fir-D3-L19	Omos	DJO	Lakes
CH31-P3_Fir-E3-L19	Omos	DJO	Lakes
CH32-P3_Fir-F3-L19	Omos	DJO	Lakes
CH33-P3_Fir-G3-L19	Omos	DJO	Lakes
CH60-P2-H10-L19	Omos	MAR	Lakes
CH73-P2-A7-L19	Onil	CHK	Limp
CH74-P2-B7-L19	Oand	CHK	Limp
CH75-P2-C7-L19	Onil	CHK	Limp
CH76-P2-D7-L19	Onil	CHK	Limp
CH77-P2-E7-L19	Onil	CHK	Limp
CH102-P-1-H6-L19	Onil	CHK	Limp
CH103-P-1-A7-L19	Oand	CHK	Limp
CH104-P-1-B7-L19	Onil	CHK	Limp
CH72-P3_Fir-E9-L19	Omos	CHK	Limp
CH81-P3_Fir-F9-L19	Onil	CHK	Limp
CH82-P3_Fir-G9-L19	Onil	CHK	Limp
CH84-P3_Fir-H9-L19	Onil	CHK	Limp
CH85-P3_Fir-A10-L19	Omos	CHK	Limp
CH86-P3_Fir-B10-L19	Oand	CHK	Limp
CH87-P3_Fir-C10-L19	Onil	CHK	Limp
CH89-P3_Fir-D10-L19	Omos	CHK	Limp
CH90-P3_Fir-E10-L19	Onil	CHK	Limp
CH91-P3_Fir-F10-L19	Onil	CHK	Limp
CH92-P3_Fir-G10-L19	Onil	CHK	Limp
CH94-P3_Fir-H10-L19	Oand	CHK	Limp
CH95-P3_Fir-A11-L19	Oand	CHK	Limp
CH96-P3_Fir-B11-L19	Onil	CHK	Limp
CH97-P3_Fir-C11-L19	Onil	CHK	Limp
CH98-P3_Fir-D11-L19	Oand	CHK	Limp
CH99-P3_Fir-E11-L19	Oand	CHK	Limp
CH100-P3_Fir-D9-L19	Onil	CHK	Limp
CH105-P3_Fir-D12-L19	Oand	CHK	Limp
CH107-P3_Fir-E12-L19	Onil	CHK	Limp
CH110-P-1-C7-L19	Omos	LIN	Banh
CH111-P-1-D7-L19	Omos	LIN	Banh
CH112-P-1-E7-L19	Omos	LIN	Banh
CH116-P2-F7-L19	Omos	LIN	Banh
CH118-P2-G7-L19	Omos	LIN	Banh
CH119-P2-H7-L19	Omos	LIN	Banh
CH120-P2-A8-L19	Omos	LIN	Banh
CH121-P2-B8-L19	Omos	LIN	Banh

CH122-P3_Fir-A1-L19	Omos	LIN	Banh
CH123-P3_Fir-B1-L19	Omos	LIN	Banh
CH124-P3_Fir-C1-L19	Omos	LIN	Banh
CH126-P3_Fir-E1-L19	Omos	LIN	Banh
CH127-P3_Fir-F1-L19	Omos	LIN	Banh
CH149-P-1-A8-L19	Omos	LIP	Banh
CH150-P2-G8-L19	Omos	LIP	Banh
CH151-P2-H8-L19	Omos	LIP	Banh
CH152-P2-A9-L19	Omos	LIP	Banh
CH156-P-1-B8-L19	Omos	LIP	Banh
CH159-P-1-C8-L19	Omos	LIP	Banh
CH164-P3_Fir-G1-L19	Omos	LIP	Banh
CH165-P3_Fir-H1-L19	Omos	LIP	Banh
CH166-P3_Fir-A2-L19	Omos	LIP	Banh
CH167-P3_Fir-B2-L19	Omos	LIP	Banh
CH168-P3_Fir-C2-L19	Omos	LIP	Banh
CH169-P3_Fir-D2-L19	Omos	LIP	Banh
CH170-P3_Fir-E2-L19	Omos	LIP	Banh
CH188-P-1-F7-L19	Omos	CHG	Chan
CH189-P-1-G7-L19	Omos	CHG	Chan
CH190-P-1-H7-L19	Omos	CHG	Chan
CH193-P2-C8-L19	Omos	CHG	Chan
CH194-P2-D8-L19	Oand	CHG	Chan
CH195-P2-E8-L19	Omos	CHG	Chan
CH196-P2-F8-L19	Omos	CHG	Chan
CH228-P-1-A11-L19	Omos	CHG	Chan
CH192-P3_Fir-F12-L19	Omos	CHG	Chan
CH208-P3_Fir-G12-L19	Omos	CHG	Chan
CH209-P3_Fir-H12-L19	Omos	CHG	Chan
CH224-P3_Fir-H8-L19	Omos	CHG	Chan
CH226-P3_Fir-A9-L19	Omos	CHG	Chan
CH227-P3_Fir-F2-L19	Omos	CHG	Chan
CH232-P-1-G9-L19	Omos	MAC	Lakes
CH233-P-1-H9-L19	Omos	MAC	Lakes
CH236-P-1-A10-L19	Omos	MAC	Lakes
CH237-P-1-B10-L19	Omos	MAC	Lakes
CH240-P2-A11-L19	Omos	MAC	Lakes
CH241-P2-B11-L19	Omos	MAC	Lakes
CH242-P2-C11-L19	Omos	MAC	Lakes
CH243-P2-D11-L19	Omos	MAC	Lakes
CH244-P3_Fir-G2-L19	Omos	MAC	Lakes
CH245-P3_Fir-H2-L19	Omos	MAC	Lakes
CH246-P3_Fir-A3-L19	Omos	MAC	Lakes
CH248-P3_Fir-B3-L19	Omos	MAC	Lakes
CH263-P2-G10-L19	Omos	MAR	Lakes
CH264-P-1-H8-L19	Omos	NUN	Lakes
CH265-P-1-A9-L19	Omos	NUN	Lakes
CH266-P-1-B9-L19	Omos	NUN	Lakes
CH267-P2-F9-L19	Omos	NUN	Lakes
CH268-P2-G9-L19	Omos	NUN	Lakes
CH269-P2-H9-L19	Omos	NUN	Lakes
CH270-P2-A10-L19	Omos	NUN	Lakes
CH271-P2-D10-L19	Omos	MAR	Lakes
CH272-P2-E10-L19	Omos	MAR	Lakes
CH273-P2-F10-L19	Omos	MAR	Lakes
CH51-P3_Fir-H3-L19	Omos	MAR	Lakes
CH53-P3_Fir-B4-L19	Omos	MAR	Lakes
CH54-P3_Fir-C4-L19	Omos	MAR	Lakes
CH55-P3_Fir-D4-L19	Omos	MAR	Lakes
CH274-P2-B10-L19	Omos	NUN	Lakes
CH275-P2-C10-L19	Omos	NUN	Lakes
CH37-P3_Fir-E4-L19	Omos	NUN	Lakes
CH39-P3_Fir-F4-L19	Omos	NUN	Lakes
CH40-P3_Fir-G4-L19	Omos	NUN	Lakes
CH276-P-1-C10-L19	Onil	CHB	Chan
CH277-P-1-D10-L19	Onil	CHB	Chan
CH278-P2-E11-L19	Omos	CHB	Chan
CH279-P-1-E10-L19	Onil	CHB	Chan
CH280-P2-F11-L19	Omos	CHB	Chan
CH282-P2-G11-L19	Omos	CHB	Chan
CH283-P2-H11-L19	Omos	CHB	Chan
CH284-P-1-F10-L19	Oand	CHB	Chan
CH285-P-1-G10-L19	Omos	CHB	Chan
CH286-P-1-H10-L19	Omos	CHB	Chan
CH281-P3_Fir-A7-L19	Omos	CHB	Chan
CH287-P3_Fir-B7-L19	Omos	CHB	Chan
CH288-P3_Fir-C7-L19	Omos	CHB	Chan
CH289-P3_Fir-D7-L19	Omos	CHB	Chan
CH291-P3_Fir-E7-L19	Omos	CHB	Chan
CH292-P3_Fir-F7-L19	Omos	CHB	Chan
CH293-P3_Fir-G7-L19	Omos	CHB	Chan
CH294-P3_Fir-H7-L19	Omos	CHB	Chan

CH295-P3_Fir-A8-L19	Omos	CHB	Chan
CH297-P3_Fir-B8-L19	Omos	CHB	Chan
CH298-P3_Fir-C8-L19	Omos	CHB	Chan
CH299-P3_Fir-D8-L19	Omos	CHB	Chan
CH300-P3_Fir-E8-L19	Omos	CHB	Chan
CH302-P3_Fir-F8-L19	Omos	CHB	Chan
CH303-P3_Fir-G8-L19	Omos	CHB	Chan
MIC453-P3_Fir-G6-L19	Omos	CHB	Chan
MIC454-P3_Fir-H6-L19	Onil	CHB	Chan
MIC286-P-1-D8-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC287-P2-C9-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC388-P-1-D12-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC389-P-1-E12-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC296-P-1-F8-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC297-P-1-G8-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC299-P3_Fir-H5-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC300-P3_Fir-A6-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC302-P3_Fir-B6-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC303-P3_Fir-C6-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC304-P3_Fir-D6-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC305-P3_Fir-E6-L19	Omos	ZIN	Banh
MIC308-P-1-G11-L19	Omos	MAF	Chan
MIC310-P-1-H11-L19	Omos	MAF	Chan
MIC311-P-1-A12-L19	Omos	MAF	Chan
MIC320-P-1-B12-L19	Omos	MAF	Chan
MIC321-P-1-C12-L19	Omos	MAF	Chan
MIC322-P3_Fir-H4-L19	Omos	MAF	Chan
MIC323-P3_Fir-A5-L19	Omos	MAF	Chan
MIC324-P3_Fir-B5-L19	Omos	MAF	Chan
MIC325-P3_Fir-C5-L19	Omos	MAF	Chan
MIC326-P3_Fir-D5-L19	Omos	MAF	Chan
MIC327-P3_Fir-E5-L19	Omos	MAF	Chan
MIC328-P3_Fir-F5-L19	Omos	MAF	Chan
MIC391-P-1-F12-L19	Omos	TIW	Chan
MIC393-P-1-G12-L19	Omos	TIW	Chan
MIC396-P-1-H12-L19	Oand	TIW	Chan
MIC403-P2-D12-L19	Omos	TIW	Chan
MIC404-P2-E12-L19	Omos	TIW	Chan
MIC405-P2-F12-L19	Omos	TIW	Chan
MIC407-P2-G12-L19	Omos	TIW	Chan
MIC390-P3_Fir-G11-L19	Omos	TIW	Chan
MIC392-P3_Fir-H11-L19	Omos	TIW	Chan
MIC394-P3_Fir-A12-L19	Omos	TIW	Chan
MIC395-P3_Fir-B12-L19	Omos	TIW	Chan
MIC399-P3_Fir-C12-L19	Omos	TIW	Chan
MIC412-P3_Fir-G5-L19	Omos	TIW	Chan
AY833435	Ouro	POM	N
AY833436	Omos	MWBO	N
AY833437	Omos	MFNJ	N
AY833438	Omos	MFNJ	N
AY833439	Omos	MFNA	N
AY833440	Omos	MWOL	N
AY833441	Omos	MWOL	N
AY833442	Omos	MWOL	N
AY833443	Omos	MWBO	N
AY833444	Omos	MFNA	N
AY833445	Omos	MFMA	N
AY833446	Omos	MFMA	N
AY833447	Omos	MWKA	N
AF28843	Omos	UKN	N
AY833448	Omos	MWSU	N
AY833449	Omos	MWKA	N
AY833450	Omos	MWKA	N
AY833451	Omos	MWKA	N
AY833452	Omos	MWKA	N
AY833453	Omos	MWKA	N
AY833454	Omos	MFAM	N
AY833455	Omos	MFAM	N
AY833456	Omos	MFVA	N
AY833457	Omos	MFVA	N
AY833458	Omos	MWOL	N
AY833459	Omos	MWOL	N
AY833460	Okar	MWSU	N
AY833461	Okar	MWSU	N
AY833462	Okar	MWSU	N
AY833463	Okar	MWSU	N
AY833464	Okar	MWSU	N
AY833465	Okar	MWSU	N
AY833466	Onil	MWLI	N
AY833467	Onil	MWLI	N
AY833468	Onil	MWLI	N
AY833469	Onil	MWLI	N

AY833470	Onil	NWE	N
AY833471	Onil	NWE	N
AY833472	Onil	NWE	N
AY833473	Onil	NWE	N
AF328849	Onil	UKN	N
AY833474	Onil	MWLI	N
AY833475	Onil	MWLI	N
AY833476	Onil	MWLI	N
AY833477	Onil	MWLI	N
AY833478	Onil	MWLI	N
AY833479	Onil	MWLI	N
AY833480	Onil	MWLI	N
AY833481	Onil	MWLI	N
AY833482	Onil	NWE	N
AY833483	Onil	NWE	N
AY833484	Onil	NWE	N
AY833485	Onil	NWE	N
AY833486	Onil	NWE	N
AY833487	Onil	NFPH	N
AY833488	Onil	NFPH	N
AY833489	Onil	NFPH	N
AY833490	Onil	NFPH	N
AY833491	Onil	NFPH	N
AF296488	Oand	UKN	N
AY833492	Oand	MWOL	N
AY833493	Oand	MWLI	N
AY833494	Oand	MWLI	N
AY833495	Oand	MWLI	N
AY833496	Oand	MWLI	N
AY833497	Oand	MWLI	N
AY833498	Oand	MWLI	N
AY833499	Oand	MWLI	N
AY833500	Oand	MWLI	N
AY833501	Oand	MWLI	N
AY833502	Oand	MWLI	N
AF328845	Omor	KARIB	N
AF328851	Oaur	UKN	N

**Section I-1 Supplementary material S3.** Haplotype genealogy of the genus *Oreochromis* based on a 385 bp fragment of the mitochondrial control region. The circles are proportional to log(nb individuals) /haplotype.



**Section I-1 Supplementary material S4.** Abundance and repartition of haplotypes in the Changane-Lower Limpopo System per locality.

Haplotype	Chibuto	Chigubo	Chokwe	Djongwe	Linlanganinwe	Lipasse	Macosse	Maficuiane	Marilelo	Nungwane	Tiwarina	Zinhane
H1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H2	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
H3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H6	2	1	0	1	0	0	3	0	1	2	0	1
H7	6	0	0	0	1	1	0	2	3	3	1	0
H8	5	5	1	0	5	4	5	3	1	3	8	4
H9	0	2	1	0	0	6	0	0	0	0	0	1
H10	4	2	1	0	1	2	0	6	2	1	2	2
H11	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
H12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
H13	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
H14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
H15	1	2	0	0	1	0	4	1	0	1	0	3
H16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H18	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
H19	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H22	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
H23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

**Section I-1 Supplementary material S5.** Results of the STRUCTURE analysis for the full AFLP dataset. The table provide the average log probability of the data  $\ln P(X/K)$ , and the value of the  $\Delta K$  criteria computed according to Evanno *et al.* (2005) for each number of cluster  $K$ .

$K$	$\ln P(X/K)$	$\Delta K$
1	-25828.5667	-
2	-22867.7667	210.4837
3	-21995.6667	0.8057
4	-21729.7000	0.0026
5	-20799.3333	2.0280
6	-20645.2000	0.0198
7	-20380.1333	0.0198
8	-20145.1333	0.0112
9	-19919.1333	5.7898
10	-19910.5000	3.5043
11	-20862.67	0.0008
12	-20303.9000	0.0014
13	-20710.1667	-

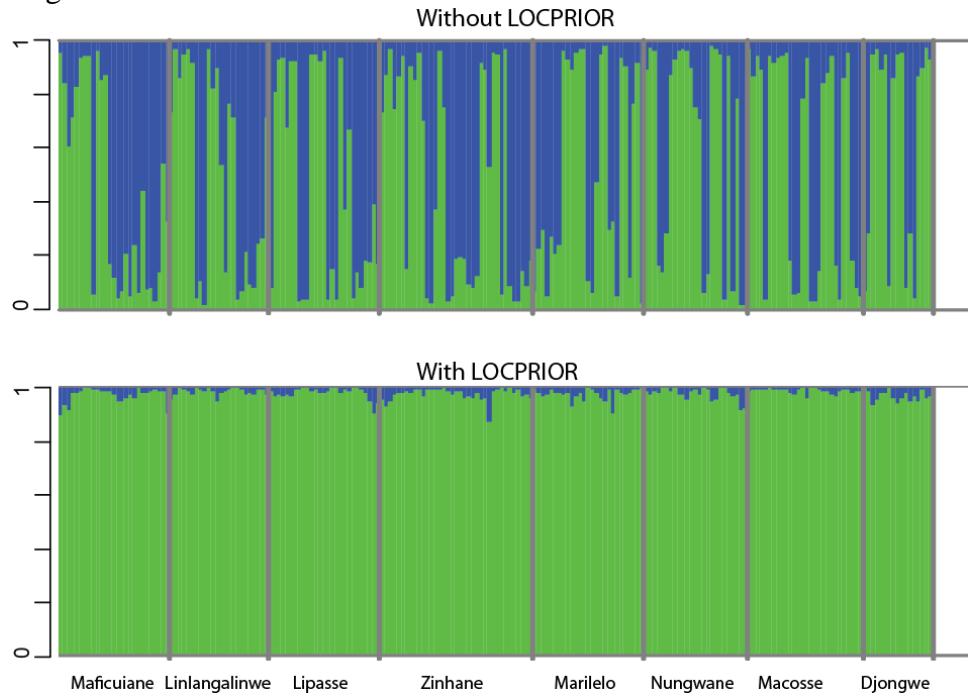
**Section I-1 Supplementary material S6.** Results of the STRUCTURE analysis (without the LOCPRIOR option) for the AFLP dataset comprising the height preserved *O. mossambicus* localities. The table provide the average log probability of the data  $\ln P(X/K)$ , and the value of the  $\Delta K$  criteria computed according to Evanno *et al.* (2005) for each number of cluster  $K$ .

$K$	$\ln P(X/K)$	$\Delta K$
1	-11840.3667	-
2	-11314.5000	163.151927
3	-11028.4667	0.00982578
4	-10794.2667	3.93543151
5	-10652.0667	0.0305049
6	-10508.2333	1.04219593
7	-10595.5	0.61706959
8	-11545.3333	0.00066368
9	-10383.3333	0.43568883
10	-10569.6	-

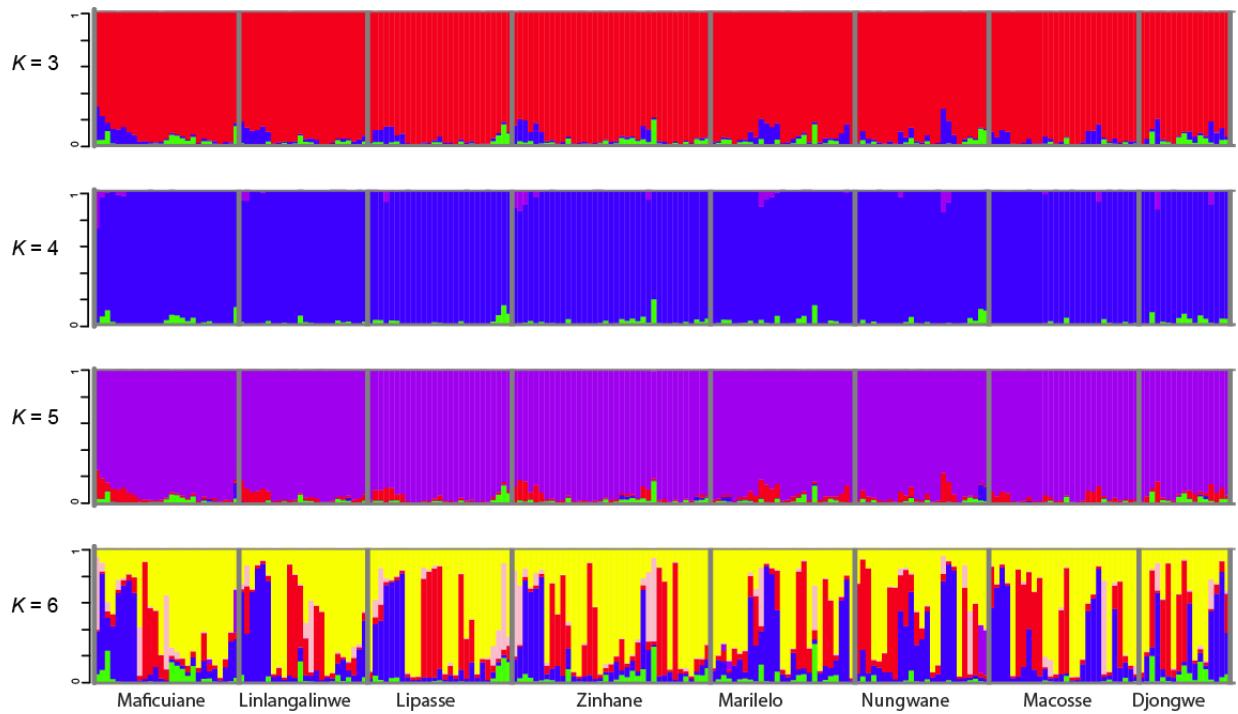
**Section I-1 Supplementary material S7.** Results of the STRUCTURE analysis (with the LOCPRIOR option) for the AFLP dataset comprising the height preserved *O. mossambicus* localities. The table provide the average log probability of the data  $\text{Ln } P(X/K)$ , and the value of the  $\Delta K$  criteria computed according to Evanno *et al.* (2005) for each number of cluster  $K$ .

$K$	$\text{Ln } P(X/K)$	$\Delta K$
1	-11838.9333	-
2	-11677.1667	0.89923463
3	-11372.0333	0.00614109
4	-12171.7	0.00333631
5	-14159.9	0.00222751
6	-45255.0333	2.05E-05
7	-12297.1667	0.0111701
8	-11934.5667	0.01163448
9	-37579.1667	3.01E-05
10	-21532.4667	-

**Section I-1 Supplementary material S8.** STRUCTURE Barplot for  $K = 2$  showing the assignment values of *O. mossambicus* individuals from the height localities preserved from genetic introgressions.



**Section I-1 Supplementary material S9.** STRUCTURE Barplot for  $K = 3$  to  $6$  showing the assignment values of *O. mossambicus* individuals from the height localities preserved from genetic introgressions. Analyses shown are all performed with the LOCPRIOR option.



## ANNEXES DE LA SECTION II-1.

### **Section II-1 Supplementary material S1.** List of DNA sequences used in this study.

Seq_name	Species	Area	Loc
NC3	Omos	NC	OUE
NC4-P-1-F1-L19	Omos	NC	OUE
NC5-P-1-G1-L19	Omos	NC	OUE
NC13-P-1-H1-L19	Omos	NC	OUE
NC15-P-1-A2-L19	Omos	NC	OUE
NC16-P2-F1-L19	Omos	NC	OUE
NC17-P2-G1-L19	Omos	NC	OUE
NC18-P2-H1-L19	Omos	NC	OUE
NC19-P2-A2-L19	Omos	NC	OUE
NC30-P-1-B2-L19	Omos	NC	GLA
NC34-P2-B2-L19	Omos	NC	GLA
NC35-P-1-H2-L19	Omos	NC	MAG
NC39-P-1-F2-L19	Omos	NC	MAG
NC43-P2-H2-L19	Omos	NC	MAG
NC51-P-1-G2-L19	Omos	NC	MAG
NC61-P-1-C2-L19	Omos	NC	GLA
NC62-P2-C2-L19	Omos	NC	GLA
NC63-P-1-D2-L19	Omos	NC	GLA
NC64-P-1-E2-L19	Omos	NC	GLA
NC66-P2-D2-L19	Omos	NC	GLA
NC67-P2-E2-L19	Omos	NC	GLA
NC68-P2-F2-L19	Omos	NC	GLA
NC76-P-1-B3-L19	Omos	NC	KON
NC77-P-1-C3-L19	Omos	NC	KON
NC78-P-1-D3-L19	Omos	NC	KON
NC79-P-1-E3-L19	Omos	NC	KON
NC80-P2-A3-L19	Omos	NC	KON
NC81-P2-B3-L19	Omos	NC	KON
NC82-P2-C3-L19	Omos	NC	KON
NC83-P2-D3-L19	Omos	NC	KON
NC84-P2-E3-L19	Omos	NC	KON
NC126-P-1-F3-L19	Omos	NC	WAG
NC127-P-1-G3-L19	Omos	NC	WAG
NC129-P-1-H3-L19	Omos	NC	WAG
NC134-P2-F3-L19	Omos	NC	WAG
NC135-P2-G3-L19	Omos	NC	WAG
NC136-P2-H3-L19	Omos	NC	WAG
NC170-P-1-A4-L19	Omos	NC	PLA
NC171-P-1-B4-L19	Omos	NC	PLA
NC172-P-1-C4-L19	Omos	NC	PLA
NC175-P2-G2-L19	Omos	NC	GLA
NC184-P-1-D4-L19	Omos	NC	HUI
NC185-P-1-G4-L19	Omos	NC	HUI
NC186-P-1-H4-L19	Omos	NC	HUI
NC193-P-1-E4-L19	Omos	NC	ZOO
NC194-P-1-F4-L19	Omos	NC	ZOO
NC195-P-1-A5-L19	Omos	NC	ZOO
NC196-P-1-B5-L19	Omos	NC	ZOO
NC197-P2-A4-L19	Omos	NC	ZOO
NC198-P2-B4-L19	Omos	NC	ZOO
NC199-P2-C4-L19	Omos	NC	ZOO
NC243-P-1-C5-L19	Omos	NC	TON
NC244-P-1-D5-L19	Omos	NC	TON
NC245-P2-D4-L19	Omos	NC	TON
NC246-P2-E4-L19	Omos	NC	TON
NC247-P2-F4-L19	Omos	NC	TON
NC248-P2-G4-L19	Omos	NC	TON
NC250-P2-A5-L19	Omos	NC	TON
NC276-P-1-E5-L19	Omos	NC	FOA
NC278-P-1-F5-L19	Omos	NC	FOA
NC279-P-1-G5-L19	Omos	NC	FOA
NC280-P2-B5-L19	Omos	NC	FOA
GU10-P-1-H5-L19	Omos	GU	MJE
GU11-P-1-A6-L19	Omos	GU	MJE
GU12-P-1-B6-L19	Omos	GU	MJE
GU20-P2-C5-L19	Omos	GU	MJE
GU21-P2-D5-L19	Omos	GU	MJE
GU22-P2-E5-L19	Omos	GU	MJE

GU23-P2-F5-L19	Omos	GU	MJE
GU46-P1-C6-L19	Omos	GU	MCH
GU47-P1-D6-L19	Omos	GU	MCH
GU48-P2-G5-L19	Omos	GU	MCH
GU49-P2-H5-L19	Omos	GU	MCH
GU50-P2-A6-L19	Omos	GU	MCH
GU51-P2-B6-L19	Omos	GU	MCH
GU52-P2-C6-L19	Omos	GU	MCH
GU53-P2-D6-L19	Omos	GU	MCH
GU65-P1-E6-L19	Omos	GU	HAB
GU66-P1-F6-L19	Omos	GU	HAB
GU84-P2-E6-L19	Omos	GU	HAB
GU85-P2-F6-L19	Omos	GU	HAB
GU86-P2-G6-L19	Omos	GU	HAB
GU87-P2-H6-L19	Omos	GU	HAB
MY4-P1-A1-L19	Omos	JA	MYS
MY9-P1-B1-L19	Omos	JA	MYS
MY10-P1-C1-L19	Omos	JA	MYS
MY12-P1-D1-L19	Omos	JA	MYS
MY15-P2-A1-L19	Omos	JA	MYS
MY16-P2-B1-L19	Omos	JA	MYS
MY17-P2-C1-L19	Omos	JA	MYS
MY18-P2-D1-L19	Omos	JA	MYS
MY19-P2-E1-L19	Omos	JA	MYS
CH7-P2-A12-L19	Omos	MZ	DJO
CH14-P1-D11-L19	Omos	MZ	DJO
CH15-P1-E11-L19	Omos	MZ	DJO
CH17-P1-F11-L19	Omos	MZ	DJO
CH25-P2-B12-L19	Omos	MZ	DJO
CH26-P2-C12-L19	Omos	MZ	DJO
CH22-P3_Fir-C3-L19	Omos	MZ	DJO
CH24-P3_Fir-D3-L19	Omos	MZ	DJO
CH31-P3_Fir-E3-L19	Omos	MZ	DJO
CH32-P3_Fir-F3-L19	Omos	MZ	DJO
CH33-P3_Fir-G3-L19	Omos	MZ	DJO
CH60-P2-H10-L19	Omos	MZ	MAR
CH72-P3_Fir-E9-L19	Omos	MZ	CHK
CH85-P3_Fir-A10-L19	Omos	MZ	CHK
CH89-P3_Fir-D10-L19	Omos	MZ	CHK
CH110-P1-C7-L19	Omos	MZ	LIN
CH111-P1-D7-L19	Omos	MZ	LIN
CH112-P1-E7-L19	Omos	MZ	LIN
CH116-P2-F7-L19	Omos	MZ	LIN
CH118-P2-G7-L19	Omos	MZ	LIN
CH119-P2-H7-L19	Omos	MZ	LIN
CH120-P2-A8-L19	Omos	MZ	LIN
CH121-P2-B8-L19	Omos	MZ	LIN
CH122-P3_Fir-A1-L19	Omos	MZ	LIN
CH123-P3_Fir-B1-L19	Omos	MZ	LIN
CH124-P3_Fir-C1-L19	Omos	MZ	LIN
CH126-P3_Fir-E1-L19	Omos	MZ	LIN
CH127-P3_Fir-F1-L19	Omos	MZ	LIN
CH149-P1-A8-L19	Omos	MZ	LIP
CH150-P2-G8-L19	Omos	MZ	LIP
CH151-P2-H8-L19	Omos	MZ	LIP
CH152-P2-A9-L19	Omos	MZ	LIP
CH156-P1-B8-L19	Omos	MZ	LIP
CH159-P1-C8-L19	Omos	MZ	LIP
CH164-P3_Fir-G1-L19	Omos	MZ	LIP
CH165-P3_Fir-H1-L19	Omos	MZ	LIP
CH166-P3_Fir-A2-L19	Omos	MZ	LIP
CH167-P3_Fir-B2-L19	Omos	MZ	LIP
CH168-P3_Fir-C2-L19	Omos	MZ	LIP
CH169-P3_Fir-D2-L19	Omos	MZ	LIP
CH170-P3_Fir-E2-L19	Omos	MZ	LIP
CH188-P1-F7-L19	Omos	MZ	CHG
CH189-P1-G7-L19	Omos	MZ	CHG
CH190-P1-H7-L19	Omos	MZ	CHG
CH193-P2-C8-L19	Omos	MZ	CHG
CH195-P2-E8-L19	Omos	MZ	CHG
CH196-P2-F8-L19	Omos	MZ	CHG
CH228-P1-A11-L19	Omos	MZ	CHG
CH192-P3_Fir-F12-L19	Omos	MZ	CHG
CH208-P3_Fir-G12-L19	Omos	MZ	CHG
CH209-P3_Fir-H12-L19	Omos	MZ	CHG
CH224-P3_Fir-H8-L19	Omos	MZ	CHG

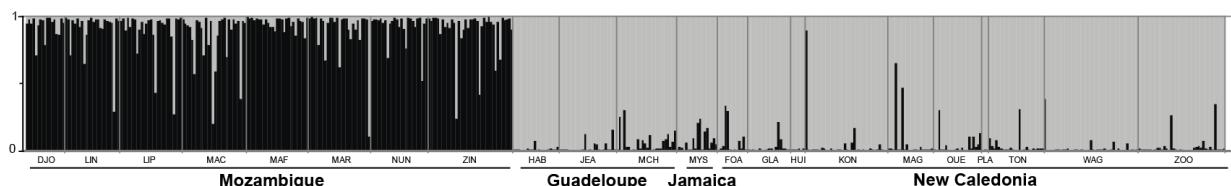
CH226-P3_Fir-A9-L19	Omos	MZ	CHG
CH227-P3_Fir-F2-L19	Omos	MZ	CHG
CH232-P-1-G9-L19	Omos	MZ	MAC
CH233-P-1-H9-L19	Omos	MZ	MAC
CH236-P-1-A10-L19	Omos	MZ	MAC
CH237-P-1-B10-L19	Omos	MZ	MAC
CH240-P2-A11-L19	Omos	MZ	MAC
CH241-P2-B11-L19	Omos	MZ	MAC
CH242-P2-C11-L19	Omos	MZ	MAC
CH243-P2-D11-L19	Omos	MZ	MAC
CH244-P3_Fir-G2-L19	Omos	MZ	MAC
CH245-P3_Fir-H2-L19	Omos	MZ	MAC
CH246-P3_Fir-A3-L19	Omos	MZ	MAC
CH248-P3_Fir-B3-L19	Omos	MZ	MAC
CH263-P2-G10-L19	Omos	MZ	MAR
CH264-P-1-H8-L19	Omos	MZ	NUN
CH265-P-1-A9-L19	Omos	MZ	NUN
CH266-P-1-B9-L19	Omos	MZ	NUN
CH267-P2-F9-L19	Omos	MZ	NUN
CH268-P2-G9-L19	Omos	MZ	NUN
CH269-P2-H9-L19	Omos	MZ	NUN
CH270-P2-A10-L19	Omos	MZ	NUN
CH271-P2-D10-L19	Omos	MZ	MAR
CH272-P2-E10-L19	Omos	MZ	MAR
CH273-P2-F10-L19	Omos	MZ	MAR
CH51-P3_Fir-H3-L19	Omos	MZ	MAR
CH53-P3_Fir-B4-L19	Omos	MZ	MAR
CH54-P3_Fir-C4-L19	Omos	MZ	MAR
CH55-P3_Fir-D4-L19	Omos	MZ	MAR
CH274-P2-B10-L19	Omos	MZ	NUN
CH275-P2-C10-L19	Omos	MZ	NUN
CH37-P3_Fir-E4-L19	Omos	MZ	NUN
CH39-P3_Fir-F4-L19	Omos	MZ	NUN
CH40-P3_Fir-G4-L19	Omos	MZ	NUN
CH278-P2-E11-L19	Omos	MZ	CHB
CH280-P2-F11-L19	Omos	MZ	CHB
CH282-P2-G11-L19	Omos	MZ	CHB
CH283-P2-H11-L19	Omos	MZ	CHB
CH285-P-1-G10-L19	Omos	MZ	CHB
CH286-P-1-H10-L19	Omos	MZ	CHB
CH281-P3_Fir-A7-L19	Omos	MZ	CHB
CH287-P3_Fir-B7-L19	Omos	MZ	CHB
CH288-P3_Fir-C7-L19	Omos	MZ	CHB
CH289-P3_Fir-D7-L19	Omos	MZ	CHB
CH291-P3_Fir-E7-L19	Omos	MZ	CHB
CH292-P3_Fir-F7-L19	Omos	MZ	CHB
CH293-P3_Fir-G7-L19	Omos	MZ	CHB
CH294-P3_Fir-H7-L19	Omos	MZ	CHB
CH295-P3_Fir-A8-L19	Omos	MZ	CHB
CH297-P3_Fir-B8-L19	Omos	MZ	CHB
CH298-P3_Fir-C8-L19	Omos	MZ	CHB
CH299-P3_Fir-D8-L19	Omos	MZ	CHB
CH300-P3_Fir-E8-L19	Omos	MZ	CHB
CH302-P3_Fir-F8-L19	Omos	MZ	CHB
CH303-P3_Fir-G8-L19	Omos	MZ	CHB
MIC453-P3_Fir-G6-L19	Omos	MZ	CHB
MIC286-P-1-D8-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC287-P2-C9-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC388-P-1-D12-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC389-P-1-E12-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC296-P-1-F8-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC297-P-1-G8-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC299-P3_Fir-H5-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC300-P3_Fir-A6-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC302-P3_Fir-B6-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC303-P3_Fir-C6-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC304-P3_Fir-D6-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC305-P3_Fir-E6-L19	Omos	MZ	ZIN
MIC308-P-1-G11-L19	Omos	MZ	MAF
MIC310-P-1-H11-L19	Omos	MZ	MAF
MIC311-P-1-A12-L19	Omos	MZ	MAF
MIC320-P-1-B12-L19	Omos	MZ	MAF
MIC321-P-1-C12-L19	Omos	MZ	MAF
MIC322-P3_Fir-H4-L19	Omos	MZ	MAF
MIC323-P3_Fir-A5-L19	Omos	MZ	MAF
MIC324-P3_Fir-B5-L19	Omos	MZ	MAF

MIC325-P3_Fir-C5-L19	Omos	MZ	MAF
MIC326-P3_Fir-D5-L19	Omos	MZ	MAF
MIC327-P3_Fir-E5-L19	Omos	MZ	MAF
MIC328-P3_Fir-F5-L19	Omos	MZ	MAF
MIC391-P-1-F12-L19	Omos	MZ	TIW
MIC393-P-1-G12-L19	Omos	MZ	TIW
MIC396-P-1-H12-L19	Oand	MZ	TIW
MIC403-P2-D12-L19	Omos	MZ	TIW
MIC404-P2-E12-L19	Omos	MZ	TIW
MIC405-P2-F12-L19	Omos	MZ	TIW
MIC407-P2-G12-L19	Omos	MZ	TIW
MIC390-P3_Fir-G11-L19	Omos	MZ	TIW
MIC392-P3_Fir-H11-L19	Omos	MZ	TIW
MIC394-P3_Fir-A12-L19	Omos	MZ	TIW
MIC395-P3_Fir-B12-L19	Omos	MZ	TIW
MIC399-P3_Fir-C12-L19	Omos	MZ	TIW
MIC412-P3_Fir-G5-L19	Omos	MZ	TIW
OmC2a-1_AY833436	Omos	MZ	MWBO
AY833437	Omos	MZ	MFNJ
AY833438	Omos	MZ	MFNJ
AY833439	Omos	MZ	MFNA
AY833440	Omos	MZ	MWOL
AY833441	Omos	MZ	MWOL
AY833442	Omos	MZ	MWOL
AY833443	Omos	MZ	MWBO
AY833444	Omos	MZ	MFNA
AY833445	Omos	MZ	MFMA
AY833446	Omos	MZ	MFMA
AY833447	Omos	MZ	MWKA
OmC2b_AF328843	Omos	UKN	UKN
OmC2c-2_AY833448	Omos	MZ	MWSU
AY833449	Omos	MZ	MWKA
AY833450	Omos	MZ	MWKA
AY833451	Omos	MZ	MWKA
AY833452	Omos	MZ	MWKA
AY833453	Omos	MZ	MWKA
AY833454	Omos	MZ	MFAM
AY833455	Omos	MZ	MFAM
AY833456	Omos	MZ	MFVA
AY833457	Omos	MZ	MFVA
AY833458	Omos	MZ	MWOL
AY833459	Omos	MZ	MWOL
AY833460	Okar	MZ	MWSU
AY833461	Okar	MZ	MWSU
AY833462	Okar	MZ	MWSU
AY833463	Okar	MZ	MWSU
AY833464	Okar	MZ	MWSU
AY833465	Okar	MZ	MWSU
AF328844	Okar	MZ	MWSU

**Section II-1 Supplementary material S2.** Results of the STRUCTURE analysis (without and with the LOCPRIOR option) for the AFLP dataset comprising the 22 localities. The table provides the average log probability of the data  $\text{Ln } P(X/K)$ , and the value of the  $\Delta K$  criteria computed according to Evanno *et al.* (2005) for each number of cluster  $K$ .

$K$	No LOCPRIOR		With LOCPRIOR	
	$\text{Ln } P(X/K)$	$\Delta K$	$\text{Ln } P(X/K)$	$\Delta K$
1	-16011.05	-	-16012.1	-
2	-14392.525	26.2082758	-14397.3	6.64126313
3	-14150	0.33349074	-14148.475	0.84677218
4	-13902.625	0.01889187	-14111.3	0.00377343
5	-13639.175	0.09077456	-14147.275	0.00159045
6	-13457.625	0.13335509	-14117.675	0.0054158
7	-13374.15	0.42240523	-14505.2	0.00134267
8	-13871.675	0.00086	-14563.8	0.00707143
9	-13170.125	0.52519775	-14365.35	0.02054499
10	-14280.375	0.00075283	-14799.15	0.00285361
11	-13683.725	0.00396009	-15169.225	0.00292774
12	-13659.125	0.00294791	-14560.05	0.007518
13	-14841.525	0.00092179	-14400.125	0.00326349
14	-14569.025	0.26097336	-15298.4	0.00175425
15	-16581.75	0.00030762	-15209.2	0.00153853
16	-15183.075	0.00067826	-14471.475	0.01270157
17	-14135.375	0.00421744	-14891	0.00559308
18	-15967.1	0.00034425	-15878.05	0.00117153
19	-14164.525	0.00264427	-14621.25	0.00593451
20	-15381.65	0.00095366	-15195.65	0.00143778
21	-14515.375	0.00362147	-14854.25	0.01487537
22	-14731.425	-	-14261.95	-

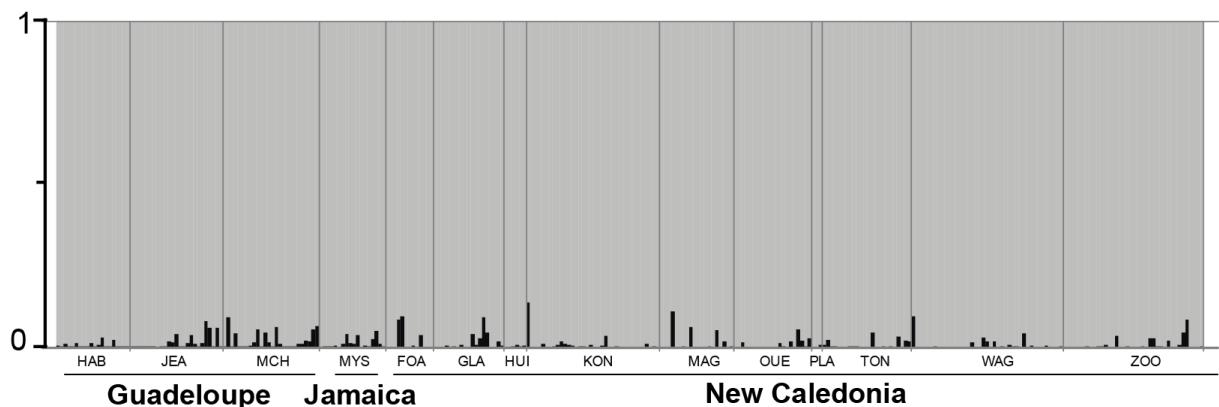
**Section II-1 Supplementary material S3.** Bayesian clustering of native and invasive *O. mossambicus* individuals ( $Q$ -values) according to STRUCTURE assuming two inferred clusters ( $K=2$ ) without the LOCPRIOR option. Each vertical bar represents an individual specimen and grey and black colors the probability of membership to each of the clusters.



**Section II-1 Supplementary material S4.** Results of the STRUCTURE analysis for the AFLP dataset only comprising the 14 invasive localities. The LOCPRIOR option is used including information for each island. The table provides the average log probability of the data  $\text{Ln } P(X/K)$ , and the value of the  $\Delta K$  criteria computed according to Evanno *et al.* (2005) for each number of cluster  $K$ .

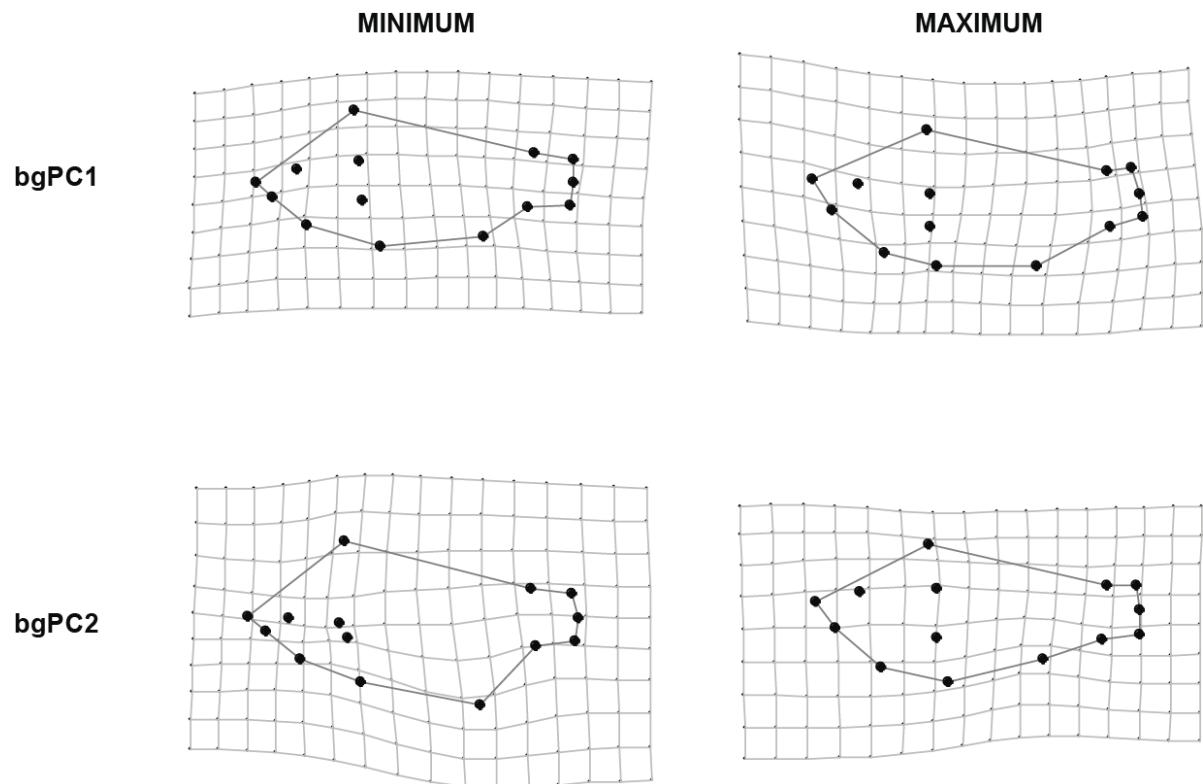
With LOCPRIOR		
$K$	$\text{Ln } P(X/K)$	$\Delta K$
1	-6126.725	-
2	-5887.575	84.9011858
3	-5773.725	0.02834509
4	-5749.85	0.24077911
5	-6065.675	0.00992158
6	-5909.025	0.01155867
7	-6271.325	0.0027366
8	-6394.375	0.0055039
9	-6243.2	0.00638447
10	-6079.3	0.01182626
11	-6460.675	0.00338671
12	-6609.875	0.00173667
13	-6584.55	0.00834613
14	-6417.125	-

**Section II-1 Supplementary material S5.** Bayesian clustering of native and invasive *O. mossambicus* individuals ( $Q$ -values) according to STRUCTURE assuming two inferred clusters ( $K=2$ ) with the LOCPRIOR option. Each vertical bar represents an individual specimen and grey and black colors the probability of membership to each of the clusters.



## ANNEXES DE LA SECTION II-2.

**Supplementary material.** Shape deformation (magnified  $\times 3$ ) along the two between-group principal components of figure 4.



## SUPPLEMENTARY MANUSCRIPT

---

Accepted in the *Belgian Journal of Zoology*

### **One more alien freshwater fish species in New Caledonia: the threespot gourami *Trichogaster trichopterus* (Teleostei: Osphronemidae)**

Cyril FIRMAT, Paul ALIBERT

Affiliation:

UMR CNRS 5561 Biogéosciences - Université de Bourgogne, 6 boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

Corresponding author: Cyril Firmat. Mail: [cyril.firmat@u-bourgogne.fr](mailto:cyril.firmat@u-bourgogne.fr)

Short running title:

The alien threespot gourami in New Caledonia

Reporting the occurrences of non-native species established on a new territory is an important first step to thereafter evaluate both the spread of potential invaders and their consequences for native biodiversity. This is of peculiar relevance when the newly colonized areas are hotspots of biodiversity. Located in the southern Pacific, the hydrological drainages of the Grande-Terre of New Caledonia (i.e. the main and largest island of the New Caledonia Archipelago, Figure 1) are recognized as hosting a vast diversity of freshwater fish and crustacean species. Among the 104 recovered species (reviewed by Marquet *et al.* (1)),

around one quarter are endemic, with some of them having been very recently described (e.g., *Stiphodon mele* Keith *et al.* 2009 (2)). These species sometimes co-exist with introduced taxa which pose a threat for their survival (3,4). Here, we report for the first time in New Caledonia the presence of an alien Osphronemid fish species identified as *Trichogaster trichopterus* (Pallas, 1770).

In two hours fishing effort by one of us (C.F.), 22 individuals were caught using a small-mesh cast-net in a freshwater pond located within the lower reach of the Tamoa drainage (Province Sud, coordinates: 166° 13' 1.77" E, 22° 2' 27.15" S; Figure 1). These specimens were captured along with a second alien species, the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peter, 1852) ( $n = 35$ ).

➔ Preferred location of Figure 1 here.

One representative specimen is depicted on Figure 2. The taxonomic identification is based on descriptions of Rainboth (5). The captured specimens exhibit a dorsal fin anteriorly starting far behind the anal fin and a long filamentous pelvic fin. Together, these are characteristic features of the genus *Trichogaster*. The presence of two large dark spots on the side (one at the center of the body and the other at the basis of the caudal peduncle) and of vertical bars on the anterior part allow to unambiguously identify this species as the threespot gourami *Trichogaster trichopterus*. This is further supported by comparisons with *T. trichopterus* museum specimens hosted in the Bavarian State Collections of Zoology, Munich (ZSM) from Malaysia ( $n = 3$ ) and Borneo ( $n = 5$ ) which exhibit clearly similar gross morphologies.

➔ Preferred location of Figure 2 here.

Two others Osphronemidae species have already been introduced in New Caledonia (1). While the giant gourami *Osphronemus gouramy* (Lacépède, 1801) is probably not

established, populations of the snakeskin gourami *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1910) was recently recovered in one drainage in the northern part of the island (1). To date, there was no report for the occurrence of *T. trichopterus* in New Caledonia (1,4). *T. trichopterus* originates from the Mekong basin where it is found in sluggish or standing-water habitats. It is reported as ‘established’ (here synonym of ‘naturalized’, i.e. a species sustaining self-reproducing populations, see e.g. ref. (6)) out of its native range in Asia (Taiwan, Sri Lanka, Philippines), Oceania (Papua New Guinea), Africa (Namibia) and the New World (Columbia, Dominican Republic) (7). To our knowledge, the presence of *T. trichopterus* in New Caledonia is the second occurrence of this species in Oceania (after New Guinea), and the first clue for its spread southeastward in the Pacific.

*T. trichopterus* is widespread in aquarium fish trade and was probably transported to New Caledonia as an ornamental species and then, released in the wild. The pond that provided specimens is connected with a tributary of the Tamoia River during the period of floods, suggesting that this species already locally spread in the drainage. The relatively high number of captured specimens and the already reported presence of naturalized populations out of the native range (7) suggest that *T. trichopterus* is also probably established in New Caledonia. If other specimens are found in neighbor drainages, the species could thereafter be considered as established. At least two features of this species would favor its dispersal: (i) Its aesthetic qualities that could stimulate its capture and human-induced transfers as ornamental fish across New Caledonia (or at a larger scale) and (ii) its air-breathing capacities (8) that could favor its survival in eutrophic ponds or swamp before its natural dispersal during flood periods.

*T. trichopterus* specimens mainly feed on crustaceans, zooplankton and insect larvae (5). At the present time, potential impacts on aquatic invertebrate communities are difficult to evaluate but a potential negative effect can be hypothesized and could be investigated (e.g.

through analyses of stomach contents). According to the recent survey of Keith (4), *T. trichopterus* is the 14<sup>th</sup> freshwater fish species introduced in New Caledonia and could be the 7<sup>th</sup> one to be established. Estimating its actual repartition, alerting the public on its presence and its potential negative impacts and encouraging people to remove and kill encountered specimens could represent first steps to manage this new alien species.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Fieldwork was supported by a BQR grant (n° 2009 BQR1 014) from the University of Burgundy. Sampling authorization n°11262-2009/ARR/DENV was provided by the Province Sud administration. This work benefited from exchanges with P. Keith (MNHN), C. Poellabauer (Erbio) and two anonymous referees. D. Neumann and U. K. Schliewen kindly provided access to the ZSM collections.

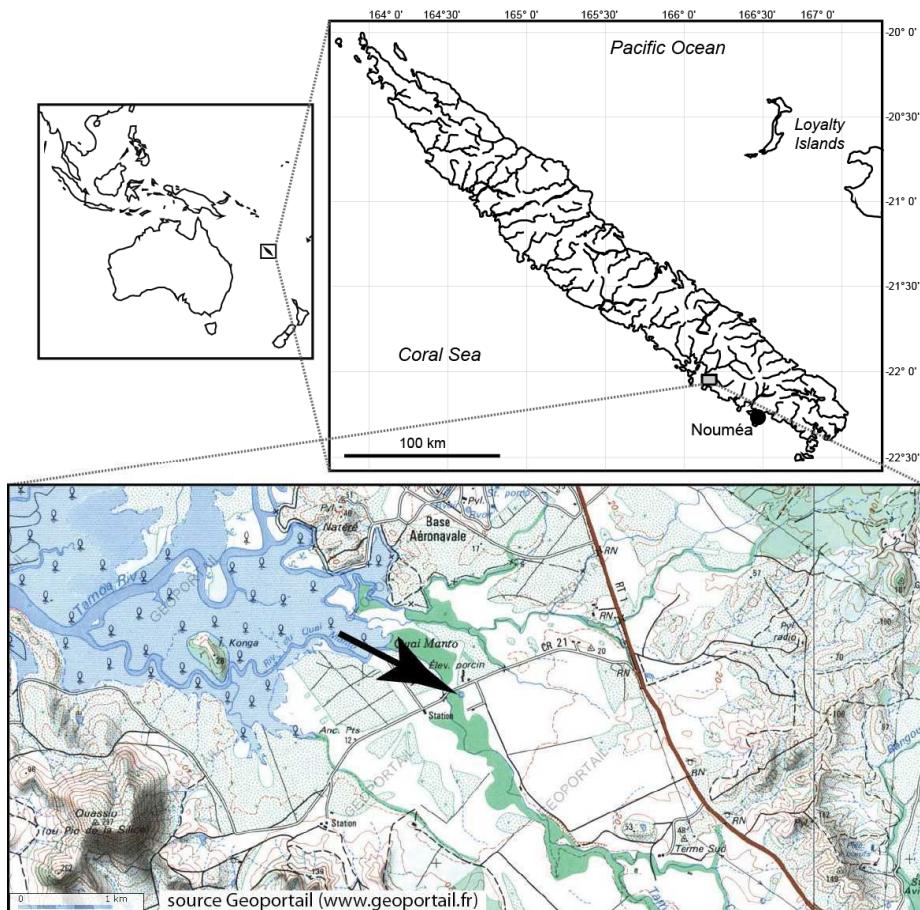
## REFERENCES

1. MARQUET G, KEITH P & VIGNEUX E (2003). Atlas des poissons et des crustacés d'eau douce de Nouvelle-Calédonie Partimoines Naturels, Paris: 282 pp.
2. KEITH P, MARQUET G & POUILLY M (2009). *Stiphodon mele* n. sp., a new species of freshwater goby from Vanuatu and New Caledonia (Teleostei, Gobiidae, Sicydiinae), and comments about amphidromy and regional dispersion. Zoosystema 31, 471-483.
3. KEITH P (2002). Threatened fishes of the world: *Galaxias neocaledonicus* Weber & de Beaufort, 1913 (Galaxiidae). Environmental Biology of Fishes 63, 26-26.
4. KEITH P (2005). Introduction of freshwater fishes and decapod crustaceans in New Caledonia, a review. Revue d'Ecologie - la Terre et la Vie 60, 45-55.
5. RAINBOTH WJ (1996). Fishes of the Cambodian Mekong, Rome, Italy: 265 pp.

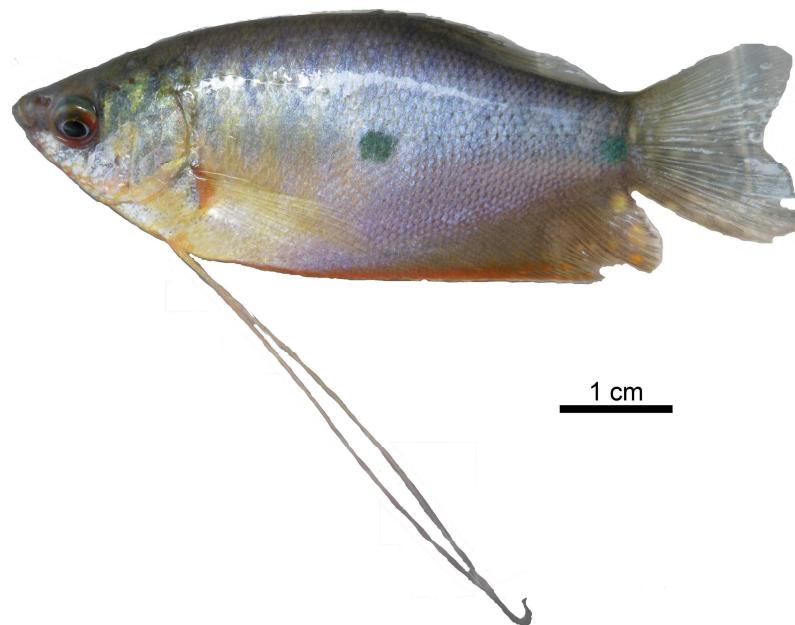
6. RICHARDSON DM, PYSEK P, REJMANEK M, BARBOUR M, PANNETA F & WEST C (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions* 6, 93-107.
7. FISHBASE (2011). Fishbase. See <http://www.fishbase.org/home.htm>. Accessed: 01 April 2011.
8. HERBERT NA & WELLS RMG (2001). The aerobic physiology of the air-breathing blue gourami, *Trichogaster trichopterus*, necessitates behavioural regulation of breath-hold limits during hypoxic stress and predatory challenge. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 171, 603-612.

## FIGURES

**Figure 1.** Geographic localization of New Caledonia and the pond hosting a population of *Trichogaster trichopterus*. The arrow points the exact location of the pond.



**Figure 2.** An adult specimen of *Trichogaster trichopterus* collected in New Caledonia.





## LISTE DES TRAVAUX

---

- Firmat C**, Alibert P, Losseau M, Schliewen UK. Successive human-mediated hybridization and population structure in the endangered cichlid *Oreochromis mossambicus*. In preparation.
- Firmat C**, Mutin G, Alibert P, Losseau M, Pariselle A., Sasal P. Monogenean parasites epidemiology and diversity of the native and alien *Oreochromis* cichlids from the Lower Limpopo drainage (Mozambique). Submitted.
- Losseau M, Laurenson L, **Firmat C**. Water quality, fish biodiversity and abundance within a dry land river: the Changane River (Lower Limpopo Basin, Mozambique). Submitted.
- Firmat C**, Schliewen UK, Losseau M, Alibert P. Body shape differentiation at global and local geographic scales in the invasive cichlid *Oreochromis mossambicus*. *Biological Journal of the Linnean Society* In press
- Firmat C**, Alibert P. (2011) One more alien freshwater fish species in New Caledonia: the threespot gourami *Trichogaster trichopterus* (Teleostei: Osphronemidae). *Belgian Journal of Zoology* 142: 90-92.
- Laffont R, **Firmat C**, Alibert P, David B, Montuire S, Saucède T. (2011) Biodiversity and evolution in the light of morphometrics: from patterns to processes. *Comptes Rendus Palevol* 2-3: 133-142.
- Firmat C**, Gomes Rodrigues H, Hutterer R, Rando JC, Alcover JA, Michaux J. (2011) Diet of the extinct Lava mouse *Malpaisomys insularis* from the Canary Islands (Spain): insights from dental microwear. *Naturwissenschaften* 98: 33-37.
- Firmat C**, Gomes Rodrigues H, Renaud S, Claude J, Hutterer R, Garcia-Talavera F & Michaux J. (2010) Mandible morphology, dental microwear and diet of the extinct giant rats (*Canariomys*, Rodentia: Murinae) of the Canary Islands (Spain). *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 28-40.
- Crochet J-Y, Welcomme J-L, Ivorra J, Ruffet G, Boulbes N, Capdevila R, Claude J, **Firmat C**, Métais G, Michaux J, Pickford M (2009). A new vertebrate fauna associated with lithic artefacts from the early Pleistocene of the Hérault Valley (southern France) dated around 1.57 Ma. *Comptes Rendus Palevol* 8: 725-736.
- Firmat C**, Crochet J-Y (2007). La faune de mammifères du Pleistocène supérieur de la grotte Noguier (près Sauve, Gard). *Bulletin de la Société d'Étude des Sciences Naturelles de Nîmes et du Gard* 66: 16-29.



## Abstract

Biological invasions are recognized as a significant evolutionary factor over short time scales. In particular, their effect is well recorded on the genetic structure of populations, the patterns of phenotypic evolution and the richness of parasite fauna associated to invasive populations. This study aims at quantifying the consequences of a biological invasion according to these three levels (genetical, phenotypical and parasitological) taking as example the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. This African cichlid is characterized by an unusual conservation status since it is both (*i*) ranked among the world's worst invasive species due to its global dispersion during the 20<sup>th</sup> century and (*ii*) sorted as "near-threatened" (IUCN) over its native range (a part of south-east Africa) because of massive hybridization with alien introduced *Oreochromis* species. The approach used in this study imply to describe the recent history of populations using nuclear (AFLP) and mitochondrial DNA (mtDNA) markers, and then to compare this genetic background to results describing the morphological and parasitological diversity of populations. Two different biological systems were studied:

1) Within the native range, the study focuses on the Lower Limpopo and the Changane sub-drainage (Mozambique). Introgression patterns involving the three co-occurring species were detected, but the frequency of hybrid is low and their geographic expansion is limited. These results provided rather good auspices for the conservation of *O. mossambicus*, and they allowed to identify two zones of high conservation priorities. The parasitological survey reveals high parasite richness and low prevalences among sites of low conservation values. This last pattern could favour the success of alien introduced species and their hybrids.

2) Among the invasive range of *O. mossambicus*, both AFLP and mtDNA support a strong genetic homogeneity and a low genetic diversity, a pattern interpreted as resulting from a strong population bottleneck preceding the events of global dispersion. A pattern of population structure related to large scale geography (New Caledonia, Guadeloupe, Jamaica) is nevertheless detected. Body shape variation is also primarily structured at large geographical scale, suggesting a role for genetic constraints on contemporary morphological diversification. The total absence of monogenean parasites in the populations of New Caledonia could result from a founding effect and is suggested as a potential factor that could have favoured the *O. mossambicus*' success.

In conclusion, a low genetic diversity does not likely constraint a strong invasive potential and a rapid phenotypic diversification in tilapias.

**Keywords:** biological invasions, contemporary evolution, Cichlidae, hybridization, introgression, monogenean parasites, founding effect, geometric morphometrics, propagule pressure, tilapia.

## Résumé

Les invasions biologiques sont reconnues comme un facteur évolutif important sur une échelle de temps courte. Elles affectent notamment la structure génétique des populations, les patrons d'évolution phénotypique et la richesse des faunes de parasites associées aux populations envahissantes. Cette étude se propose de quantifier les conséquences d'une invasion biologique suivant ces trois niveaux (génétique, phénotypique et parasitologique) en prenant pour exemple le cas du tilapia du Mozambique *Oreochromis mossambicus*. Ce cichlidé africain présente un statut remarquable en biologie de la conservation puisqu'il est à la fois (i) l'une des espèces les plus envahissantes au monde car dispersée à l'échelle globale au cours du XXème siècle et (ii) une espèce « quasi-menacée » (UICN) sur son aire native (partie du sud-est de l'Afrique) du fait de son hybridation massive avec d'autres *Oreochromis* sp. introduits. La démarche générale employée ici est de décrire l'histoire récente des populations à l'aide de marqueurs nucléaires (AFLP) et des séquences de l'ADN mitochondrial (ADNmt), puis de mettre en relation ces résultats génétiques avec la diversité morphologique et la parasitologie des populations. Deux systèmes différents ont été étudiés :

1) Au sein de l'aire native, l'étude se focalise sur le Limpopo inférieur et le sous-bassin de la Changane (Mozambique). Des patrons d'introgression incluant trois espèces en présence sont détectés, mais les hybrides sont peu fréquents et leur expansion limitée. Ces résultats sont de plutôt bonne augure pour la conservation d'*O. mossambicus* et ils permettent d'identifier deux zones de conservation prioritaires. L'étude des parasites indique une plus grande diversité parasitaire mais de faibles prévalences dans les sites de moindre valeur en conservation, ce qui pourrait favoriser le succès des espèces introduites et de leurs hybrides.

2) Parmi les territoires envahis, les AFLP et l'ADNmt soutiennent une homogénéité générale et une diversité génétique faible, qui sont interprétées comme le résultat d'un fort goulot d'étranglement précédant l'expansion à l'échelle mondiale. Une structure des populations en lien avec la géographie à large échelle (Nouvelle-Calédonie, Guadeloupe, Jamaïque) est cependant détectée. La variation de la forme du corps est également structurée à large échelle géographique, ce en dépit des fortes variations environnementales enregistrées à l'échelle locale. Cela suggère un effet des contraintes génétiques sur la diversification morphologique contemporaine. L'absence de parasites monogènes sur les populations introduites en Nouvelle-Calédonie peut être mise en relation avec un événement fondateur, et est proposé comme l'un des facteurs ayant pu favoriser le succès de l'espèce.

En conclusion, une faible diversité génétique ne constraint vraisemblablement pas un potentiel envahissant élevé et une diversification rapide chez les tilapias.

**Mots-clés :** invasion biologique, évolution contemporaine, Cichlidae, hybridation, introgression, parasites monogènes, événement fondateur, morphométrie géométrique, pression de propagule, tilapia.