



**Spéciation sympatrique chez les cichlidés en Amazonie ? :
spéciation et sélection sexuelle dans le modèle
Apistogramma agassizii (Steindachner, 1875)**

Guillain Estivals

► **To cite this version:**

Guillain Estivals. Spéciation sympatrique chez les cichlidés en Amazonie ? : spéciation et sélection sexuelle dans le modèle *Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875). Génétique animale. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2020. Français. NNT : 2020MNHN0002 . tel-03125963

HAL Id: tel-03125963

<https://theses.hal.science/tel-03125963v1>

Submitted on 30 Jan 2021

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.

MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE



École Doctorale 227

Sciences de la Nature et de l'Homme : évolution et écologie

Année 2020

N°attribué par la bibliothèque

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Génétique des populations

présentée et soutenue publiquement par

Guillain Estivals

le 29/01/2020

SPÉCIATION SYMPATRIQUE CHEZ LES CICHLIDÉS EN AMAZONIE ?

Spéciation et sélection sexuelle dans le modèle

***Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875)**

sous la direction de :

Dr. Jean-François RENNO

Dr. Fabrice DUPONCHELLE

Dr. Carmen R. GARCÍA DÁVILA

devant le jury :

Dr. Anne CHENUIL

Dr. Nicolas HUBERT

Pr Philippe KEITH

Dr. François BONHOMME

Directeur de Recherche, IRD

Chargé de Recherche, IRD

Directrice de laboratoire, IIAP

Directrice de Recherche, CNRS

Directeur de Recherche, IRD

Professeur, MNHN**Directeur de Recherche, CNRS****Directeur**

Co-Directeur

Co-Directrice

Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Examineur

REMERCIEMENTS / AGRADECIMIENTOS.....	1
RÉSUMÉ.....	5
A. INTRODUCTION.....	7
A. I. Le modèle <i>Apistogramma</i>	7
A. II. Contexte conceptuel.....	8
A. II. 1. Les cichlidés africains.....	8
A. II. 2. Les cichlidés centraméricains.....	13
A. II. 3. L'Amazonie, un contexte évolutif bien différent... ..	14
A. III. <i>Apistogramma agassizii</i> (Steindachner, 1875), un modèle de choix	16
B. MÉTHODES.....	20
B. I. Échantillonnage	20
B. II. Variation génétique à l'échelle des sous-bassins versants Nanay, Ucayali, Marañon	23
B. II. 1. La démarche adoptée	23
B. II. 2. Extraction d'ADN, amplification et génotypage des locus microsatellites	25
B. II. 3. Amplification et séquençage des gènes de la COI et de la Cyt b	25
B. III. Variation génétique à l'échelle des microbassins et des ruisseaux.....	26
B. III. 1. Mise en évidence des unités reproductives par « clustering » et pertinence de la méthode	26
B. III. 2. Scénarios évolutifs.....	27
B. IV. Isolement prézygotique	29
C. RÉSULTATS	32
C. I. VARIATION GENETIQUE À L'ECHELLE DES BASSINS : mise en évidence de Sp1, Sp2, Sp3 dans <i>Apistogramma agassizii</i>	32
C. I. 1. Allèles nuls.....	32
C. I. 2. Variabilité génétique dans l'ADN nucléaire et structuration des données	33
C. I. 3. Différenciation génétique dans Sp1, Sp2 et Sp3	40
C. I. 4. Polymorphisme des séquences COI et Cytb concaténées de Sp1, Sp2 et Sp3	42
C. I. 5. Relations phylogénétiques entre Sp1, Sp2 et Sp3	43
C. I. 6. Variation de couleur entre Sp1, Sp2 et Sp3	45
C. II. LA VARIATION GENETIQUE A L'ECHELLE DES MICROBASSINS : mise en évidence de populations ou de proto espèces (espèces potentielles)	46
C. II. 1. Variation génétique à l'échelle des microbassins et des ruisseaux : mise en évidence de populations ou d'espèces dans <i>Apistogramma</i> Sp1	46
C. II. 2. Variation génétique à l'échelle des microbassins et des ruisseaux : mise en évidence de populations dans <i>Apistogramma</i> Sp2.....	61

C. II. 3	Variation génétique à l'échelle des microbassins et des ruisseaux : mise en évidence de populations dans <i>Apistogramma</i> Sp3.....	66
C. II. 4	Test sur la pertinence de la méthode DACP pour mettre en évidence des espèces et des populations par la recherche de clusters	67
C. II. 5	Scénarios évolutifs de Sp1.....	69
C. III.	ISOLEMENT PREZYGOTIQUES À L'ECHELLE DES BASSINS ET DES MICROBASSINS	74
D.	DISCUSSION	76
1)	À l'échelle des sous bassins versants : spéciation allopatrique	76
2)	À l'échelle des microbassins : spéciation en mosaïque d'espèces d' <i>A. agassizii</i>	78
3)	Contexte historique : scénario de dispersion dans le « species flock » Sp1 dans la zone d'étude	79
4)	Les moteurs de la spéciation chez Sp1	82
5)	Contexte historique de la zone d'étude : scénario de dispersion dans le complexe d'espèces Sp2	84
6)	Arguments en faveur de la spéciation sympatrique en Amazonie	86
7)	Perspectives	87
8)	Biodiversité et conservation du genre <i>Apistogramma</i> dans le bassin Amazonien.....	88
E.	CONCLUSION	92
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	96
	ANNEXES.....	108

REMERCIEMENTS / AGRADECIMIENTOS

Français / Francés

Je suis extrêmement reconnaissant envers mes directeurs de thèse **Jean-François Renno** et **Fabrice Duponchelle** tout d'abord parce vous m'avez permis d'initier mon épopée amazonienne en me recrutant comme Volontaire International en Administration (V. I. A.), il y a 6 ans déjà... Puis pour m'avoir permis de réaliser ma thèse sur un sujet et un contexte d'étude qui me fascinent depuis mon enfance. Merci de m'avoir fait mûrir scientifiquement, de m'avoir appris à me cadrer, me structurer. Je garde en mémoire de bons moments d'échanges que ce soit scientifique, politique ou de la vie tout simplement autour d'un repas ou d'une bière (bon sur ce dernier point, Fabrice pas trop ^^).

Je souhaiterais remercier chaleureusement **Jean-Loup Guyot** ancien représentant de l'IRD au Pérou, sans toi je ne serais probablement pas en train d'écrire ces remerciements... À la fin de mon V.I.A au Pérou, au cours d'un déjeuner après l'évaluation du premier LMI, Jean-Loup m'avais posé la fameuse question « Et maintenant qu'est-ce que tu vas faire ? » je lui avais répondu que je voulais faire une thèse mais que c'était toujours pareil, pas de bourses... Après un moment de réflexion, il s'était rappelé qu'il y avait un appel à candidature pour une bourse de thèse Franco-Péruvienne de l'Université Péruvienne Cayetano Heredia, la fermeture devait avoir lieu une semaine plus tard... Je lui avais répondu que j'avais vu l'offre mais que Fabrice et Jean-François avaient été occupés par l'évaluation du LMI et qu'ils n'avaient pas eu le temps de monter un projet de thèse. De seul coup, Jean-Loup s'est levé et s'est dirigé vers Fabrice pour lui tirer les bretelles (façon de parler hein ?!) pour lui dire qu'il fallait absolument qu'on candidate et là tout a commencé... Merci Jean-Loup.

Un grand merci à ma co-directrice **Carmen Rosa García Dávila** de m'avoir accueilli les bras ouverts dans ton laboratoire, en me laissant à disposition tous les équipements du laboratoire et en m'offrant un espace pour travailler. Merci, pour tes remarques, tes suggestions et tes conseils rationnels lors des coups de mou. Merci aussi pour ces petites attentions « pause chocolat » et autres friandises !

J'en profite pour remercier **Maria Darias** et **Sylvain Gilles** qui m'ont encadré sur place à Iquitos lors de mon V. I. A. et pour m'avoir fait découvrir ces aspects liés à l'aquaculture d'espèces amazoniennes comme *Pseudoplatystoma punctifer* et *Arapaima gigas*.

Je remercie l'**Université Péruvienne Cayetano Heredia (UPCH)** et plus particulièrement la « Escuela de Postgrado Víctor Alzamora Castro » pour m'avoir accordé cette bourse de thèse et donc d'avoir concrétisé cette thèse.

Un grand merci à **Américo Sánchez** et **Rodolfo Cárdenas** de l'équipe Bioinfo qui m'ont permis de réaliser les analyses ABC sur le cluster de l'IIAP, merci d'avoir toujours été disponibles même les fins de semaines et même en vacances pour résoudre les problèmes de scripts.

Une grande reconnaissance à tous les pêcheurs, les guides et chasseurs qui m'ont accompagné sur le terrain et dont les capacités d'orientations en pleine forêt m'ont laissé sans voix, je pense particulièrement à toi **Jonny**. Merci à **Segundo** de Orán et **Rider Sousa** de Jenaro herrera. Merci **Roger Morí** et **Sergio Llanos** toujours partants pour m'accompagner sur le terrain ainsi qu'**Enrique**. Merci aussi à ceux que j'ai rencontré au gré des missions qui m'ont apporté un appui technique. Merci à tous les chefs de villages « Apu » qui m'ont donné l'autorisation pour collecter dans leur région. Sans vous tous ce travail de thèse n'aurait pas été possible.

Je remercie aussi les étudiants de Master 2 : **Simon Pasquier** pour m'avoir assisté lorsque je réalisais les travaux de rénovation de la salle d'expérimentation, tu ne t'attendais pas à poser du carrelage, hein ? **Etienne Airola** pour m'avoir assisté sur le terrain pour la mission « Nauta » et **Margot Deléglise** que j'ai co-encadré, pour m'avoir assisté pour les manipes de sélection sexuelle.

Un grand merci à tous les membres du Jury, **Anne Chenuil, Nicolas Hubert, Philippe Keith** et **François Bonhomme** pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et pour vos remarques.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel administratif que ce soit celui de l'IRD (**Alain Corde, Miriam Soto**) du MNHN (**Anaïs Ranera**) et de l'UPCH (**Violeta Pérez, Rebeca Lourdes**) qui ont toujours été là pour résoudre les petits problèmes administratifs et autres.

Je voudrais maintenant remercier ma famille en particulier **ma maman, ma sœur, ma grand-mère** maternelle et **mon père** pour m'avoir toujours soutenu. Mon séjour au Pérou qui devait normalement durer un an voir deux ans, aura finalement duré plus de 6 ans... La distance n'a pas toujours été facile... Je tiens aussi à m'excuser auprès de vous de ne pas avoir pu être là lors des moments importants ou difficiles, j'ai toujours pensé à vous... Je vous aime.

Je tiens aussi à remercier tous ceux qui ont fait que la distance a été moins difficile, **Christian F., Rodrigo, Mayra, Eduardo, Lucero, Diana, Claudia, Adela, Julieta, Carlos, Christian N., Gregorio, Mario, Mark, Simon, Etienne, Margot**, la liste est trop longue... Ceux que j'ai oublié peuvent me réclamer un coup à boire ^^ . Mention spéciale à **Sylvain** avec qui j'ai partagé tant de choses. **Sylvain**... toujours partant pour sortir, aller danser la salsa, la cumbia ou m'accompagner lors de petites escapades sur le Nanay. Merci pour ces longues soirées de discussion politiques et autres autours d'un de ces excellents dîners comme tu sais le faire. Au cours de ce séjour en Amazonie j'ai rencontré une foule de personnes intéressantes, je pense aussi à **Alberto Chirif**, anthropologue péruvien, une mine d'informations... merci pour ces discussions enrichissantes.

Pour terminer je tiens à remercier **Mónica**, merci pour ta bienveillance, ta patience et ton soutien inconditionnel même lorsque j'étais de mal humeur...

Cette épopée Amazonienne a transformé mon image de la société, on dit que le voyage nourrit l'esprit c'est maintenant pour moi plus qu'une évidence. Paradoxalement, j'ai appris à connaître mon pays en étant à l'étranger...

Estoy muy agradecido con mis directores de tesis **Jean-François Renno y Fabrice Duponchelle**, en primer lugar, porque me permitieron iniciar mi epopeya amazónica al reclutarme como Voluntario Internacional en Administración (V.I.A.) hace seis años.... Luego por permitirme realizar mi tesis sobre un tema y un contexto de estudio que me fascinan desde mi infancia. Gracias por haberme hecho madurar científicamente, por enseñarme a enmarcarme, a estructurarme. Tengo recuerdos los buenos momentos de intercambios, ya sean científicos, políticos o de vida, alrededor de una comida o una cerveza (bueno en este último punto, Fabrice no demasiado ^^).

Quisiera agradecer calurosamente a **Jean-Loup Guyot**, ex representante del IRD en el Perú, sin ti probablemente no estaría escribiendo estos agradecimientos.... Al final de mi V. I. A. en el Perú, durante un almuerzo después de la evaluación del primer LMI, Jean-Loup me hizo "la" pregunta: "¿Y ahora qué vas hacer?" Le dije que quería hacer una tesis de doctorado, pero que siempre era lo mismo, no había becas.... Después de un momento de reflexión, recordó que había una convocatoria para becas de tesis franco-peruana de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el cierre era programado una semana después.... Le respondí que había visto la convocatoria pero que Fabrice y Jean-François habían estado ocupados con la evaluación del LMI y que no habían tenido tiempo de preparar un proyecto de tesis doctoral. De repente, Jean-Loup se levantó y se dirigió hacia Fabrice para decirle que teníamos que aprovechar la oportunidad y postular a la beca, ahí empezó todo.... Gracias Jean-Loup.

Muchas gracias a mi co-directora **Carmen Rosa García Dávila** por recibirme con los brazos abiertos en tu laboratorio, dejándome el acceso a todos los equipos del laboratorio y ofreciéndome un espacio para trabajar. Gracias por tus comentarios, sugerencias y consejos racionales durante los momentos tormentosos. ¡Gracias también por estas pequeñas atenciones de "chocolate break" y otros dulces!

Quisiera también aprovechar esta oportunidad para agradecer a **María Darías y Sylvain Gilles** quienes me supervisaron en Iquitos durante mi V.I.A. y me hicieron descubrir estos aspectos relacionados con la acuicultura de especies amazónicas tales como *Pseudoplatystoma punctifer* y *Arapaima gigas*.

Quiero agradecer a la **Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH)** y más particularmente a la "Escuela de Postgrado Víctor Alzamora Castro" por otorgarme la beca de tesis de doctorado y hacer que esta tesis sea posible.

Muchas gracias a **Américo Sánchez y Rodolfo Cárdenas** del equipo de Bioinfo que me permitieron realizar los análisis ABC en la súper computadora del IIAP, gracias por haber estado siempre disponibles incluso los fines de semana y periodos vacacionales para resolver problemas de scripts.

Un gran agradecimiento a todos los pescadores, guías y cazadores que me acompañaron en el campo y cuya capacidad para guiarme en medio del bosque me dejó sin palabras, pienso en particular en ti **Jonny**. Gracias a **Segundo** de Orán y **Rider Sousa** de Jenaro herrera. Gracias a **Roger Mori y Sergio Llanos** que siempre estuvieron dispuestos a salir al campo conmigo y **Enrique**. Gracias también a los que conocí durante las misiones que me proporcionaron apoyo técnico. Gracias a todos los jefes "Apu" de las comunidades que me dieron permiso para coleccionar muestras en sus tierras. Sin todos ustedes, este trabajo de tesis no hubiera sido posible.

También quiero agradecer los alumnos del Master 2: **Simon Pasquier** por haberme ayudado en los trabajos de renovación de la sala de experimentación, no esperabas poner mayólicas, ¿verdad? **Etienne Airola** por haberme ayudado en el campo durante la misión "Nauta" y **Margot Deléglise**, a quien co-supervisé, por haberme ayudado con los experimentos de selección sexual.

Muchas gracias a todos los miembros del jurado, **Anne Chenuil, Nicolas Hubert, Philippe Keith** y **François Bonhomme** por haber aceptado evaluar mi trabajo de tesis y por sus comentarios.

También quiero agradecer a todo el personal administrativo, ya sean del IRD (**Alain Corde, Miriam Soto**), el MNHN (**Anaïs Ranera**) y la UPCH (**Violeta Pérez, Rebeca Lourdes**), que siempre han estado ahí para resolver pequeños problemas administrativos y de otro tipo.

Ahora me gustaría agradecer a mi familia en especial a **mi mamá**, a **mi hermana**, a **mi abuela** materna y a **mi papá** por apoyarme siempre. Mi estadía en Perú, que debía durar uno o dos años, finalmente duró más de 6 años.... La distancia no siempre fue fácil... También me gustaría pedirles disculpas por no haber podido estar allí en momentos importantes o difíciles, siempre he pensado en ustedes.... Los amo.

También quiero agradecer a todos los que hicieron menos difícil la distancia, **Christian F., Rodrigo, Mayra, Eduardo, Lucero, Diana, Claudia, Adela, Julieta, Carlos, Christian N., Gregorio, Mario, Mark, Simon, Etienne, Margot**, la lista es demasiado larga.... Los que se me olvidaron pueden pedirme un trago ^^ . Mención especial a **Sylvain** con quien compartí tantas cosas. **Sylvain**.... siempre listo para salir, bailar salsa, cumbia o acompañarme en unos recorridos por el Nanay. Gracias por estas largas noches de discusiones políticas y de otro tipo durante una excelente cena coma lo sabes hacer. Durante mi estadía en la Amazonía conocí a mucha gente interesante, también pienso en **Alberto Chirif**, un antropólogo peruano, una mina de informaciones... gracias por esas enriquecedoras discusiones.

Finalmente me gustaría agradecer a **Mónica**, gracias por tu cariño, paciencia y tu apoyo incondicional incluso cuando estaba de mal humor....

Esta epopeya amazónica ha transformado mi imagen de la sociedad, se dice que el viaje nutre la mente, ahora es más que evidente para mí. Paradójicamente, aprendí en conocer mi propio país mientras estaba en el extranjero....

RÉSUMÉ

Les cichlidés amazoniens ont été très peu étudiés en comparaison de leurs apparentés africains, qui sont des exemples remarquables de radiations adaptatives chez les vertébrés, et notamment les Haplochromines du lac Victoria avec plus de 500 espèces qui auraient divergé en moins de 15 000 ans. La plupart de ces espèces se seraient formées en sympatrie et les mécanismes de spéciation impliqués auraient pour moteurs principaux la sélection sexuelle couplée à de nouvelles opportunités écologiques.

Pour tester la spéciation rapide en sympatrie chez les cichlidés Amazoniens nous avons choisi le modèle *Apistogramma agassizii*, qui partage de nombreuses similitudes avec les Haplochromines comme : la philopatrie, un important polymorphisme de couleur avec un dimorphisme sexuel marqué, un choix de partenaire différentiel, une garde parentale. Nous avons échantillonné 1170 individus d'*A. agassizii* provenant de 36 popsites (unité de collecte la plus petite) situées dans la région du Loreto en Amazonie péruvienne. La variabilité génétique d'*A. agassizii* dans l'ensemble de la zone d'étude a été étudiée en utilisant 2 marqueurs mitochondriaux (COI et Cyt b) et 10 locus microsatellites, permettant d'obtenir différents niveaux de résolution dans le temps et l'espace des événements de différenciation et d'identifier des clades, des clusters et des unités reproductives.

L'échantillon de 1170 individus a été génotypés. Nous avons obtenu un nombre total d'allèles compris entre 10 et 75 par locus. Sur les 1170 individus génotypés, 104 individus ont été séquencés pour les deux marqueurs mitochondriaux. Au total 44 haplotypes ont été obtenus à partir des séquences concaténées. Les résultats des analyses réalisées sur les données nucléaires et mitochondriales ont mis en évidence 3 « species flocks » vicariants d'abord considérés comme des espèces Sp1, Sp2 et Sp3 qui auraient commencé à diverger de leur ancêtre commun le plus récent (MRCA) il y a 1,83 Ma (calibration à partir de fossiles). À cette époque, la zone d'étude aurait connu une phase de transition entre un milieu lacustre (lac Pebas) et un milieu fluvial, à l'origine de la fragmentation de l'aire de distribution du MRCA.

Les 3 « species flocks » s'organiseraient de façon fractale suivant la hiérarchisation du réseau hydrographique, avec des degrés de différenciation génétique variables en fonction des niveaux de hiérarchie. Les valeurs de différenciations génétiques (estimateur θ du F_{ST}) que nous avons observé à l'intérieur des « species flocks » entre unités reproductives sans écart à la panmixie, sont du même ordre de grandeur (Sp1 : $0,16 \pm 0,06$; Sp2 : $0,17 \pm 0,09$; jusqu'à 0,40), voire supérieures, aux valeurs généralement observées entre espèces appartenant à des genres différents chez les Haplochromines du lac Victoria. C'est ainsi que les grands cours d'eau à l'intérieur de sous-bassins hydrographiques, comme le Marañon, l'Ucayali et l'Amazone, constitueraient le niveau hiérarchique de rang 1. Ils limiteraient la dispersion des 3 « species flocks » Sp1, Sp2, Sp3 mis en évidence, en constituant des barrières aux flux de gènes à l'origine de spéciations allopatriques. Les microbassins hydrographiques constitueraient le niveau de hiérarchisation inférieur de rang 2, avec des différenciations génétiques d'amplitude variable structurant les species flocks en sympatrie. Le terme de « sympatrie » étant ici employé au sens large, considérant que ces microbassins très proches les uns des autres sont connectés par une rivière principale sur la même rive. Enfin, à l'intérieur des microbassins, les ruisseaux constitueraient le niveau hiérarchique de rang 3 dans lequel des proto-espèces (unité génétique dont le processus de spéciation peut être réversible) divergeraient en sympatrie stricte, entre ruisseaux connectés, voire à l'intérieur d'un même ruisseau (dans une même popsité ou point de collecte).

Nous avons mis en évidence que l'histoire évolutive du « species flock » Sp1 avait été conditionnée par des événements hydro-géomorphologiques multiples qui auraient alternativement favorisés des

évènements de fragmentation ou de dispersion induisant des mélanges de populations mises en contacts secondaires.

Des expérimentations sur le mode du choix de partenaire ont été réalisées en tenant compte les 3 niveaux hiérarchiques identifiés. Au niveau de hiérarchie de rang 1 (sous-bassin), les femelles Sp1 et Sp2 ont choisi préférentiellement des mâles de leur propre « species flock » (Sp1 : $p\text{-value} = 0,0005$; Sp2 : $p\text{-value} = 0,0029$). Pour tester le choix de partenaire pour les rangs 2 (micro-bassin) et 3 (ruisseau) nous nous sommes intéressés au « species flock » Sp1. Pour le rang 2 nous avons testé le choix des femelles en leur proposant un mâle de leur ruisseau (même microbassin) et un mâle d'un ruisseau d'un autre microbassin. Pour le rang 3 nous avons testé le choix des femelles en leur proposant un mâle de leur ruisseau et un mâle d'un autre ruisseau appartenant au même microbassin. Dans les deux configurations, les femelles marquaient généralement une préférence sexuelle selon l'origine des mâles, sans que celle-ci ait pu être testée de façon suffisamment approfondie pour corroborer que la sélection sexuelle jouerait un rôle moteur dans le processus de spéciation en sympatrie.

Les mécanismes évolutifs mis en évidence dans le modèle *Apistogramma agassizii* pourraient également être impliqués dans la diversification d'autres espèces de Cichlidés, voire d'autres groupes d'organismes en Amazonie et expliquer pour partie l'hyper diversité spécifique dans le plus grand bassin hydrographique du monde.

A. INTRODUCTION

A. I. Le modèle *Apistogramma*

L'Amazonie héberge plus de 2400 espèces de poissons (Reis et al., 2016) parmi lesquelles les ordres des Characiformes, Siluriformes et Cichliformes sont les plus représentés (López-Fernández et al., 2010). Les cichlidés amazoniens ont été très peu étudiés en comparaison de leurs apparentés africains qui présentent des exemples « type » de radiation adaptative chez les vertébrés (Fryer et al., 1972 ; Kocher, 2004 ; Seehausen, 2015 ; Burress et al., 2018). Le fait que les cichlidés amazoniens soient distribués dans des réseaux de rivières, souvent difficiles d'accès, rendant difficile leur étude (Pitman et al., 2011) tandis que les cichlidés des lacs africains (Tanganyika, Malawi et Victoria) et centraméricains (lacs du Nicaragua) particulièrement bien documentés au regard du nombre d'espèces, constitueraient des modèles plus simples à étudier (Barluenga et Meyer, 2004). Ces lacs sont récents, de quelques milliers d'années à une dizaine de millions pour le lac Tanganyika, avec des écosystèmes relativement stables, ont été colonisés par un petit nombre de lignées (Salzburger et al., 2002a, 2004 ; Takahashi et Okada, 2002 ; Joyce et al., 2005). Au contraire, l'Amazonie a connu de nombreux événements géologiques (Räsänen et al., 1990, 1992 ; Patton et al., 1994 ; Hoorn et al., 1995 ; Da Silva et Patton, 1998) et climatiques (Colinvaux, 1987, 1993 ; Colinvaux et al., 1996) favorisant des événements de fragmentation et de dispersion (Dumont et al., 1990, Hubert et Renno, 2006, Oberdorff et al., 2019). Il est donc difficile de retracer l'histoire évolutive des espèces dans un tel environnement (McLennan et Brooks, 2002 ; Brooks et Van Veller, 2003). Toutefois, les relations phylogénétiques entre les cichlidés néotropicaux (américains) sont assez bien documentées (Lundberg et al., 1998 ; Farias et al., 1999, 2000 ; Musilová et al., 2008 ; Lopez-Fernandez et al., 2010, Arbour et Lopez-Fernandez, 2016), mais peu d'études se sont intéressées aux événements de spéciation récents et à leurs mécanismes (Piálek et al., 2012 ; Burress et Tan, 2017). Pourtant les cichlidés amazoniens ont les mêmes caractéristiques que celles qui ont favorisé la spéciation des cichlidés dans les grands lacs africains : capacités d'adaptation trophique (Arbour et Lopez-Fernandez, 2016 ; Burress et Tan, 2017), philopatrie (ont tendance à rester à l'endroit où ils sont nés) et dans certains genres une forte sélection sexuelle a été mise en évidence (Römer et Beseinherz, 2005 ; Ready et al., 2006 ; Engelking et al., 2010). Lopez-Fernandez et al. (2010) ont montré que les genres des cichlidés néotropicaux auraient divergé rapidement. À une échelle de temps beaucoup plus récente, les genres *Crenicichla* et *Apistogramma* semblent être les plus susceptibles de présenter des cas de spéciation rapide ou de radiation adaptatives (Ready et al., 2006 ; Piálek et al., 2012 ; Britzke, 2015 ; Tougard et al., 2017 ; Burress et Tan, 2017). Ces genres sont les plus diversifiés de tous les cichlidés néotropicaux ; chacun d'eux regroupe une centaine d'espèces et de nouvelles espèces sont décrites régulièrement (Römer, 2006 ; Römer et Hahn, 2008, 2013 ; Römer et al., 2011, 2012, 2015, **2017 (Annexe 1)** ; Britzke et al., 2014 ; Piálek et al., 2015 ; Ito et Py-Daniel, 2015 ; Varella et al., 2018). Ces deux genres sont chacun monophylétiques (Piálek et al., 2012 ; Tougard et al., 2017 ; Werneck Félix da Costa et al., 2019). Des études ont montré qu'il existe chez les *Crenicichla* des radiations adaptatives basées principalement sur des adaptations trophiques (Piálek et al., 2012 ; Burress et Tan, 2017) et chez *Apistogramma*, il a aussi été montré qu'il existe probablement des événements de radiation récents (Ready et al., 2006 ; Albert et Reis, 2011 ; Tougard et al., 2017). Le genre *Apistogramma* présente une importante variabilité morphologique interspécifique et dans certaines espèces une importante variabilité phénotypique. Contrairement aux espèces du genre *Crenicichla*, les espèces du genre *Apistogramma* présentent un dimorphisme sexuel marqué et dans certaines espèces un choix différentiel de partenaire (Römer et Beseinherz, 2005 ; Engelking et al., 2010 ; Ready et al., 2006). Ces caractéristiques des *Apistogramma*, similaires à celles des Haplochromines des grands lacs Africains, ont motivé le choix du genre

Apistogramma comme modèle d'étude des mécanismes de spéciation récents chez les cichlidés en Amazonie.

L'objectif de cette thèse est de déterminer s'il existe des événements de différenciation génétique rapides chez *Apistogramma agassizii* pouvant conduire à la spéciation en sympatrie au sein d'un même réseau de ruisseaux (microbassin) et d'essayer d'approcher les mécanismes de spéciation en testant le rôle du choix d'appariement (mate choice) dans le processus de différenciation génétique.

A. II. Contexte conceptuel

A. II. 1. Les cichlidés africains

La famille des cichliformes regrouperait actuellement plus de 3000 espèces de poissons téléostéens. Elle est surprenante de par sa diversité de tailles, de formes, de couleurs et de comportements, notamment ceux liés à la reproduction, en particulier les soins parentaux. Il n'est donc pas étonnant que les cichlidés soient une des familles de poissons les plus appréciées par le marché ornemental.

Les cichlidés présentent aussi un large éventail d'adaptations trophiques, elles vont de l'adaptation spécialisée à la consommation de phytoplancton jusqu'à la prédation. Ils ont colonisé tous les milieux disponibles des grands lacs africains (Fryer et Iles, 1972 ; Coulter, 1991 ; Meyer, 1993 ; Stiassny et Meyer 1999 ; Kornfield et Smith, 2000 ; Schluter, 2000 ; Kocher, 2004 ; Konings, 1988, 1995 ; Turner, 1996). Le niveau de spécialisation trophique est tel que certaines espèces se sont spécialisées à une tâche particulière comme le raclage d'algues sur une face particulière des rochers ou la consommation d'écailles d'autres poissons (Mbomba, 1983 ; Takahashi et al., 2007). Cette facilité d'adaptation à différents types de prises alimentaires est due à une particularité des cichlidés : ils possèdent deux paires de mâchoires, une paire comparable à celle des autres téléostéens et une autre dérivée du 5^{ème} arc branchial (« mâchoire pharyngée ») leur conférant une plus grande polyvalence dans l'exploitation de la ressource alimentaire mais également une hyperspécialisation permettant de limiter la compétition interspécifique quand les ressources deviennent rares (McKaye et Marsh, 1983 ; Salzburger et Meyer, 2004).

Les deux tiers de la biodiversité des cichlidés se concentrent essentiellement dans les lacs de l'Afrique de l'Est et notamment dans les lacs Malawi, Victoria et Tanganyika, soit près de 2000 espèces (Danley et al., 2012). Les temps de divergences récents et les niveaux d'endémisme y sont si exceptionnels que les cichlidés des grands lacs africains sont cités comme exemples de référence de spéciations et d'adaptations adaptatives rapides chez les vertébrés (Kocher, 2004 ; Salzburger et Meyer, 2004). De par leurs tailles, ces lacs d'eau douce s'apparentent des « mers intérieures » situées dans la zone d'écartement entre les plaques Est africaine et centre africaine. Ils diffèrent de par leurs superficies et leurs profondeurs, cette dernière pouvant atteindre près de 1450 m pour le lac Tanganyika et 700 m pour le Malawi. En comparaison, le lac Victoria est moins profond, environ 80 m, en revanche c'est le lac ayant la plus grande superficie (Johnson et al., 1996). Depuis les premières découvertes de Boulenger (1898) les cichlidés des grands lacs africains n'ont cessé d'attirer l'attention de la communauté scientifique, pour notamment essayer de comprendre quelle est l'origine de cette fabuleuse biodiversité, ce qui se traduit par l'existence de centaines d'études sur le sujet (Fryer et Iles 1972 ; Stiassny et Meyer, 1999 ; Kornfield et Smith, 2000 ; Schluter, 2000 ; Kocher, 2004).

Au-delà du modèle d'étude qu'offrent les cichlidés des grands lacs africains, il est intéressant de voir comment la communauté scientifique arrive peu à peu au gré des innovations conceptuelles et

technologiques à démêler ce casse-tête que constituent les radiations adaptatives. Les travaux de Dobzhansky (1937), Mayr (1942) et Kosswig (1947) ont constitué la base conceptuelle. Mayr (1942) a été le premier à associer les deux concepts de spéciation explosive et groupe d'espèce « species flock » (Salzburger et Meier, 2004). Par « species flock », Mayr entend un groupe d'espèces situés dans une même zone géographique et ayant un niveau d'endémisme important. Greenwood (1984a) a, par la suite, ajouté le caractère d'étroite relation phylogénétique. À partir des années 80 puis 90, les connaissances sur les cichlidés des grands lacs africains se sont accélérées, il en ressort globalement que leur histoire évolutive diffère en fonction du lac considéré. Le lac Tanganyika est le plus vieux des trois lacs, il aurait entre 9 et 12 Ma, (Cohen et al., 1993, 1997). Du fait de leur histoire évolutive plus ancienne, la phylogénie des cichlidés du Tanganyika a été dans un premier temps mieux résolue que celle des cichlidés de la région du lac Victoria et Malawi (Sturmbauer et Meyer, 1992 ; Salzburger et al., 2002a). Les marqueurs génétiques utilisés jusqu'alors ne permettaient pas de rendre compte des événements récents de spéciation. Le lac Tanganyika est celui ayant la plus faible richesse spécifique, soit environs 250 espèces (Salzburger et Meier, 2004). Il a été colonisé par des lignées distinctes qui auraient divergé par la suite à l'intérieur du lac (Nishida, 1991 ; Kocher et al., 1993 ; Takahashi et al., 2001b ; Salzburger et al., 2002a ; Takahashi et Okada, 2002). Certains auteurs ont avancé l'hypothèse qu'initialement le lac Tanganyika aurait été plus riche en espèces de cichlidés mais que les anciens « species flock » auraient été peu à peu éliminées au cours de l'évolution (Meyer, 1993 ; Schluter, 2000 ; Salzburger et al., 2002a ; Streelman et Danley, 2003).

Le lac Malawi concentre la plus grande diversité spécifique : selon Turner et al. (2001) il y aurait dans ce lac près de 1000 espèces de cichlidés. Il serait âgé de 2 à 5 Ma (Johnson et Ng'ang'a, 1990 ; Delvaux, 1995). Jusque dans les années 2010 on pensait que ces espèces étaient monophylétiques, jusqu'alors les études ne s'étaient basées que sur la phylogénie de gènes mitochondriaux et sans considérer les espèces dans les rivières alentours. En 2011, Joyce et al. ont montré à partir de données d'ADNmt et nucléaires (2045 locus AFLP polymorphes) que la radiation du lac Malawi n'était pas monophylétique mais qu'elle était composée de six lignées profondément divergentes qui seraient le résultat de multiples invasions et d'hybridations avec des lignées d'Haplochromines provenant de rivières alentours.

Les lacs de la région du Victoria (lacs : Victoria, Albert, Edward, Kivu et Saka) hébergeraient 700 espèces qui auraient divergé au cours des derniers 100 000 - 200 000 ans. Au moins 500 espèces seraient endémiques du seul lac Victoria et auraient divergé au cours des derniers 15 000 ans (Salzburger et Meyer, 2004 ; Meier et al., 2017). Le lac Victoria serait âgé de 250 000 à 750 000 ans mais il se serait asséché il y a entre 15 600 et 14 700 ans (Johnson et al., 1996). Les cichlidés de la région du Victoria appartiendraient à un seul groupe monophylétique d'haplochromines qui aurait évolué à partir d'un seul ancêtre (Meyer et al., 1990 ; Kocher et al., 1993 ; Moran et al., 1994 ; Shaw et al., 2000 ; Nagl et al., 2000 ; Seehausen et al., 2003 ; Verheyen et al., 2003, Meier et al. ; 2017). Ce groupe est appelé le « species flock » de la région du lac Victoria (« Lake Victoria Region Superflock » ou **LVRS**). Une publication récente de Meier et al. (2017) a montré que l'ensemble des LVRS proviendrait d'un essaim hybride issu de deux lignées d'haplochromines, une du haut Congo et l'autre du Haut Nile.

Les mécanismes qui ont mené à cette formidable biodiversité chez les cichlidés d'Afrique de l'Est sont complexes et n'ont pas encore été tous élucidés. Néanmoins, ces mécanismes reposent sur la spéciation allopatrique et sympatrique.

La spéciation allopatrique est liée à un isolement spatial des populations. Ne pouvant plus échanger de gènes, au cours du temps et en fonction de l'intensité des forces évolutives, elles divergent jusqu'à conduire à la formation de nouvelles espèces. Par exemple, les événements géologiques et climatiques ont joué un rôle majeur dans les fluctuations du niveau des eaux (Beadle, 1974 ; Scholz et Rosendahl,

1988 ; Delvaux, 1995 ; Johnson et al., 1996 ; Lezzar et al., 1996 ; Cohen, 1997 ; Nicholson, 1999 ; Danley et al., 2012 ; Elmer, 2009 ; Lyons et al., 2015). Ces fluctuations ont pu favoriser la spéciation allopatrique par fragmentation intra-lacustre de l'habitat, isolant certaines populations (Owen et al., 1990 ; Rüber et al., 1998 ; Danley et al., 2000 ; Sturmbauer et al., 2001, 2003 ; Baric et al., 2003).

La spéciation en sympatrie quant à elle ne fait pas intervenir d'isolement géographique, les populations divergent alors qu'elles sont capables de se rencontrer dans leur environnement. La spéciation en sympatrie, basée sur un isolement prézygotique à travers la sélection sexuelle a été très tôt avancée comme un des moteurs des radiations spécifiques chez les cichlidés d'Afrique de l'est (Woltereck, 1931 ; Rensch, 1933 ; Kosswig, 1947 ; Brooks, 1950). Elle pourrait jouer un rôle important dans l'évolution des cichlidés de l'Est Africain (Dominey, 1984 ; Meyer, 1993 ; Turner et Burrows, 1995 ; Terai et al., 2002, 2006 ; Deutsch, 1997 ; Seehausen et Alphen, 1999 ; Barlow, 2000 ; Danley et Kocher, 2001). Dans ces lacs se sont les femelles qui choisissent un type de mâle particulier, principalement en fonction de sa couleur et secondairement en fonction sa taille et de sa territorialité. Il a été montré que ce choix de partenaire est d'autant plus fort entre espèces sœurs qui vivent en sympatrie stricte et qui diffèrent de par leur couleur plutôt que du point de vu trophique (Deutsch, 1997 ; Reinthal et Meyer, 1997 ; Seehausen et Alphen, 1999). Certains auteurs ont montré que la sélection sexuelle couplée à de nombreuses opportunités écologiques favoriserait la spéciation en sympatrie géographique (Wagner et al., 2012). Seehausen et al. (1997) ont montré que lorsque la turbidité du milieu augmente due à l'eutrophisation par exemple, il n'y a plus de sélection sexuelle entre espèces proches tandis que les couleurs nuptiales des mâles disparaissent, avec à terme une baisse de la diversité spécifique.

Il est important de faire la distinction entre la sélection sexuelle, le choix de partenaire, la préférence et l'appariement assortatif, l'un n'impliquant pas nécessairement l'autre (Servedio et Boughman, 2017). Le choix de partenaire est lié au comportement des mâles ou des femelles, le choix peut être aléatoire ou préférentiel. Le choix préférentiel est donc un biais dans le choix d'appariement, le mâle ou la femelle reconnaît un trait particulier chez le partenaire avec qui il/elle choisit de se reproduire. Dans certains cas ce biais peut être assortatif, parfois non, et dans certains cas entraîner une sélection sexuelle. Lorsque l'appariement est assortatif, le couple présente des caractéristiques communes « qui se ressemblent s'assemblent ». Cet appariement assortatif devrait être associé à une différenciation génétique. L'appariement assortatif n'est pas toujours associé à un choix préférentiel, en effet, il peut exister des situations où des phénotypes particuliers ségrégent en fonction de micro habitats à l'intérieur desquels ils se reproduisent aléatoirement. Si dans chacun des micro habitats tous les individus ont le même succès d'accouplement alors l'appariement assortatif n'entraîne pas de sélection sexuelle (Servedio et Boughman, 2017). Il y a donc sélection sexuelle lorsque dans un environnement homogène (sympatrie stricte), coexistent différents appariements assortatifs qui aboutissent à une divergence génétique.

Le concept même de spéciation sympatrique est généralement accepté mais toute la difficulté réside dans la définition même de la sympatrie et notamment dans l'échelle géographique considérée (Fitzpatrick et al., 2008 ; Seehausen, 2015). Plusieurs études réalisées sur des cichlidés des grands lacs africains ont montré que même si du point de vue géographique le processus de spéciation s'est réalisé en sympatrie, elle implique cependant une structuration spatiale (Seehausen et Magalhaes, 2010 ; Seehausen, 2015).

Les cichlidés ont généralement une faible capacité de dispersion et ont tendance à être philopatrick (Salzburger et Meyer, 2004). Des études sur des cichlidés du lac Malawi basée sur des analyses de données microsatellites ont montré qu'une hétérogénéité d'habitat pouvait constituer un obstacle au flux de gènes entre populations (Oppen et al., 1997 ; Arnegard et al., 1999 ; Markert et al., 1999). Une discontinuité de l'habitat de seulement 35 m peut parfois être suffisante pour isoler deux populations

(Rico et Turner, 2002). Une sélection différentielle entre ces habitats peut initier le processus de spéciation entre populations en contact (Gavrilets, 2004). D'après Barluenga et Meyer (2004) il existerait une corrélation entre la richesse spécifique et la taille du lac et la différenciation spécifique serait favorisée dans les grands lacs par leur profondeur. Il a ainsi été montré chez des espèces du genre *Pundamilia* et *Neochromis* que la différenciation génétique était corrélée à une augmentation de la profondeur (Seehausen et Magalhaes, 2010).

La différenciation génétique en sympatrie est dépendante des conditions de luminosité du milieu. En effet, le long du gradient de profondeur, l'intensité de la lumière et le spectre lumineux évoluent. Dans une eau claire, lorsque la profondeur augmente, les grandes longueurs d'ondes sont peu à peu filtrées (celles correspondant au rouge notamment). Les courtes longueurs d'ondes (celles correspondant au bleu notamment), plus énergétiques que les grandes, sont moins filtrées par la colonne d'eau et atteignent de plus grande profondeur que les rouges. En conséquence, la perception des couleurs est progressivement décalée vers le bleu lorsque la profondeur augmente. Cependant, dans les milieux turbides, l'intensité lumineuse diminue plus rapidement qu'en eau claires et le signal lumineux est diminué des deux côtés du spectre i.e. correspondant au bleu et au rouge (Seehausen et al., 2007). Chez des espèces qui ont divergé récemment les morphes de couleurs sont distribués selon ce gradient de profondeur (Maan et al., 2006 ; Seehausen et Magalhaes, 2010 ; Seehausen, 2008, 2015 ; Meier et al., 2017). Le morphotype bleu des haplochromis est distribué dans les eaux peu profondes alors que le phénotype rouge/jaune est rencontré dans les eaux plus profondes (**Figure 1**). Il a été montré que le nombre d'espèces qui se reproduisent en totale sympatrie diminue lorsqu'augmente la profondeur (Seehausen et al., 2008, Seehausen 2015). Une des explications est que les contraintes appliquées aux comportements de reconnaissance de partenaires en eau profonde, ainsi que dans les milieux faiblement éclairés, limitent le nombre d'espèces qui peuvent s'isoler reproductivement (Seehausen et al., 1998).

Du point de vue de la physiologie, la distribution des morphotypes selon le gradient de profondeur est corrélée à la sensibilité des pigments visuels (Meier et al., 2017). Il existe chez les haplochromines du lac Victoria un type d'opsine particulièrement variable dans la sensibilité des grandes longueurs d'ondes (Long Wavelength-Sensitive, **LWS**) (Terai et al., 2002, 2006 ; Seehausen et Magalhaes, 2010 ; Miyagi et al., 2012 ; Meier et al., 2017). Chez *Pundamilia* par exemple le phénotype bleu est, par rapport au phénotype rouge, plus sensible à la couleur bleue. Meier et al. (2017) ont montré que les deux lignées, haut Congo et haut Nile, originaires du « super flock » du lac Victoria présentent deux grandes classes différentes d'haplotypes d'opsines LWS, la classe I et II respectivement (**Figure 1**). Chez les LVRS on observe ces deux mêmes classes d'haplotypes qui sont souvent associés à des environnements lumineux différents, la classe I serait associée à des eaux claires et peu profondes, alors que la classe II serait associée à des eaux troubles et profondes. Les événements de spéciation récents et anciens au sein de la radiation des LVRS, semblent donc être en relation avec la fixation d'un type d'haplotype d'opsine pour un environnement donné. Seehausen et al. (2008) et Miyagi et al. (2012) ont montré que la spéciation était complète entre populations en sympatrie géographique lorsqu'il y avait des adaptations différentielles des systèmes visuels en lien avec la reconnaissance d'un phénotype particulier. En revanche, en allopatrie, Terai et al. (2006) ont montré que même s'il existe des adaptations divergentes entre populations, sur la base de l'association entre opsine et couleur du mâle, il n'y avait pas de spéciation.

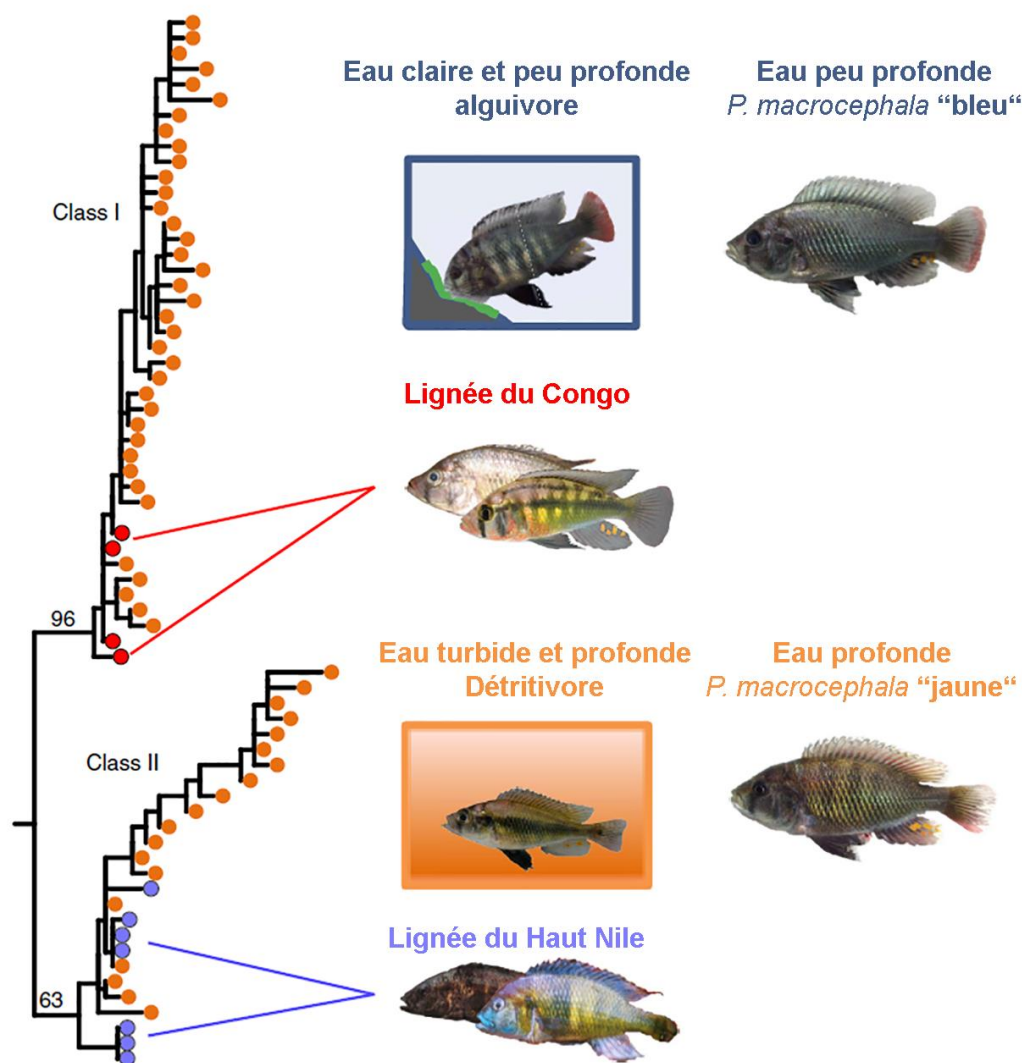


Figure 1. Distribution des phénotypes « bleu » et « jaune » de *Pundamilia macrocephala* (Haplochromine) selon les conditions de luminosité du milieu. Le phénotype « bleu » est associé à un type d'opsine de classe I et le phénotype « jaune » un type d'opsine de classe II. Figure modifiée (Meier et al. 2017)

La répartition des morphes de couleurs en fonction de la profondeur serait aussi associée à une différenciation morphologique au niveau du type de dentition et des sites de reproduction (Seehausen et Magalhaes, 2010). Il semblerait que de subtiles différences de profondeur et d'habitat associés au caractère philopatrick des cichlidés, facilitent l'évolution de l'isolement reproductif en initialisant le déséquilibre de liaison entre les gènes impliqués dans l'adaptation (systèmes visuel et trophique) et ceux de l'accouplement (Seehausen et al., 2008). L'accouplement assortatif maintiendrait ou renforcerait ce déséquilibre à travers l'interaction de la sélection naturelle et sexuelle (Seehausen et al., 2008).

A. II. 2. Les cichlidés centraméricains

Bien que les cichlidés centraméricains ne représentent qu'une faible proportion de la richesse spécifique totale chez les cichlidés, ils ont attiré l'attention de nombreux auteurs (Barlow, 1976 ; Barlow et Munsey, 1976 ; Barlow et Rogers, 1978 ; Meyer, 1987, 1989, 1990a, 1990b ; Wilson et al., 2000, Barluenga et Meyer, 2004 ; Elmer et al., 2010c, 2013, 2014 ; Recknagel et al., 2013, Härer et al., 2017, Machado-Schiaffino et al., 2017). C'est notamment le cas des cichlidés Midas des grands lacs du Nicaragua. La raison d'un tel engouement est due au fait qu'ils ont des caractéristiques écologiques et biologiques très similaires à celles de leurs apparentés des grands lacs de l'Est Africain. En effet, ils vivent presque exclusivement dans des lacs de cratères, ce qui est rare chez les cichlidés néotropicaux (américains), ils présentent de l'endémisme, un fort polymorphisme de formes et de couleur, des adaptations locales et une forte sélection sexuelle (Barlow, 1976 ; McKaye et Barlow, 1976 ; McKaye, 1980 ; Meyer, 1990a, b ; Wilson *et al.*, 2000 ; Barluenga et Meyer, 2004 ; Elmer et al., 2010b). Ils regroupent 11 espèces décrites qui appartiennent au genre *Amphilophus*, qui constituent un modèle simple de radiation chez les cichlidés (Recknagel et al., 2013 ; Barluenga et Meyer, 2004). L'histoire évolutive des cichlidés Midas a donc été testée au regard du « paradigme » des « species flock » des grands lacs de l'Est Africain.

On rencontre les cichlidés Midas au Nicaragua, dans plusieurs lacs dont l'origine est liée à la tectonique des plaques et à l'activité volcanique. Ces lacs se différencient principalement par leur taille et leur âge. Les deux plus grands, le lac Nicaragua et le lac Managua, seraient aussi les plus anciens : au moins 1 Ma (Riedel, 1972 ; Bussing, 1976). Ils formaient à l'origine un seul lac qui aurait été colonisé par des poissons d'eau douce il y a environ 500 000 ans (Bussing, 1976). Les lacs Nicaragua et Managua se seraient séparés lors d'une baisse du niveau d'eau du « paléolac » survenue à la fin du pléistocène (le pléistocène est compris entre 1,8 et 0,01 Ma). À partir de ces deux lacs au moins huit lacs de cratères auraient été colonisés indépendamment par des Cichlidés Midas, il y a moins de 24 000 ans (Recknagel et al., 2013 ; Machado-Schiaffino et al., 2017). Les cichlidés Midas qui occupent ces lacs présentent différents stades de spéciation et d'adaptations locales (Wilson et al., 2000 ; Barluenga et Meyer, 2004). On rencontre deux éco-morphes qui se différencient de par leur forme, leur type de mâchoire pharyngienne et la taille de leurs lèvres (Barluenga et al., 2006 ; Elmer et al., 2010a ; Manousaki et al., 2013 ; Machado-Schiaffino et al., 2014). Ces éco-morphes sont apparus et ont évolué de façon indépendante dans différents lacs de cratères (Elmer et al., 2010b ; Manousaki et al., 2013). Il a été montré que la différenciation génétique entre les deux écotypes dépendait du temps de colonisation du lac (Machado-Schiaffino et al., 2017). En effet, dans les lacs les plus jeunes, la différenciation génétique entre les morphotypes est absente (Elmer et al., 2010c). Certaines espèces présentent deux types de morphes de couleurs pour lesquels le choix assortatif est important et entre lesquels il existe une forte différenciation génétique (Wilson et al., 2010). Même s'ils sont beaucoup moins diversifiés que les cichlidés des grands lacs africains, les cichlidés nicaraguayens semblent se différencier en sympatrie et spéciation selon des mécanismes similaires comme l'isolement trophique et la sélection sexuelle.

A. II. 3. L'Amazonie, un contexte évolutif bien différent...

D'après Dagosta et Pinna (2019), 258 espèces des cichlidés seraient formellement décrites pour le bassin amazonien. Dans la littérature, il existe peu d'études qui se sont intéressées aux événements de divergence récents parmi ces cichlidés. Aucune étude n'a mis en évidence la présence d'événements de divergence ou de spéciation ayant eu lieu en sympatrie stricte. Il a cependant été montré chez certains cichlidés une forte structuration génétique notamment entre populations de *Cichla temensis* (Willis et al., 2015), de *Geophagus brasiliensis* (Alves-Silva et Dergam, 2015) et entre les espèces du genre *Symphysodon* (Amado et al., 2011). Dans les cichlidés amazonien, l'organisation génétique semble globalement s'organiser en fonction de réseaux hydrographiques favorisée par leurs faibles capacités de dispersions (Ready et al., 2006 ; Willis et al., 2015 ; Leita et al., 2017), mais aussi en fonction des conditions environnementales des habitats.

Le contexte environnemental dans lequel évoluent les cichlidés amazoniens et notamment le genre *Apistogramma* choisi comme modèle de notre étude, est bien différent de celui de leurs apparentés des grands lacs africains et nicaraguayens. Si l'on considère les datations de Genner et al (2007) et de Tougaard et al. (2017), le genre *Apistogramma* serait apparu entre 17,3 et 62 Ma. La raison d'un tel écart dans l'estimation de leur date d'apparition est due au choix de la calibration pour décrire leur origine. Deux hypothèses se confrontent, la première fait l'*a priori* que l'origine des cichlidés est antérieure à la fragmentation du Gondwana (121–165 Ma, Sparks et Smith, 2005) et donc que la distribution actuelle des cichlidés est la résultante de sa fragmentation. La seconde est basée sur des datations fossiles (33,9 – 55,8 Ma ; Malabarba et al., 2006) qui suggèrent une colonisation transatlantique des cichlidés à partir de l'Afrique (Friedman et al., 2013). Même si l'on considère la date la plus récente (17,3 Ma), le genre *Apistogramma* a probablement connu des changements environnementaux majeurs. Selon les estimations les plus anciennes l'Amazonie aurait commencé à couler vers l'Est il y a approximativement 10 Ma (Hoorn et al., 2010). Auparavant, il existait un gigantesque lac probablement d'eau douce, le lac Pebas qui recouvrait une partie de l'ouest de l'actuel bassin Amazonien (Lundberg et al., 1998). Plus récemment, les périodes Pliocène (5 à 1,8Ma) et pléistocène (1,8Ma à 0,01Ma) caractérisées par de nombreuses oscillations climatiques ont connu une succession d'événements glaciaires et interglaciaires qui ont eu des répercussions à l'échelle mondiale. Ces cycles ont joué un rôle majeur en Amazonie sur le climat (Stute et al., 1995b ; Harris et Mix, 1998 ; Servant et al., 1993 ; Hammen, 1974 ; Hammen et Absy, 1994 ; Colinvaux et al., 1996 ; Häggi et al., 2017, Zhang et al., 2017, Fontes et al., 2017) notamment sur les régimes des précipitations (Colinvaux et Liu, 1987, Wesselingh et Hoon, 2011), et le type de végétation (Clapperton, 1993 ; Häggi et al., 2017). Ces événements glaciaires mais aussi géologiques ont affecté la dynamique fluviale (changements du cours des rivières), en particulier les phases d'érosions / sédimentations (Baker et Fritz, 2015) et la distribution des espèces (Dumont et al., 1990 ; Hubert et Renno, 2006 ; Oberdorff et al., 2019). Tous ces événements ont façonné les paysages et la distribution des cours d'eaux modernes.

Les paysages actuels ne sont pas pour autant figés, les paysages liés aux plaines d'inondations sont en constante évolution. En effet, la dynamique fluviale, favorise l'apparition de nouveaux lacs par déconnection de méandres. Au cours du temps, ces lacs peuvent se maintenir puis par la suite être reconnectés à la rivière (capture) ou se combler. Par exemple, d'après Dumont et Fournier (1994) la migration des méandres du rio Ucayali dans la dépression Ucamara (entre la rivière Maraçon et Ucayali) peut atteindre 60 mètres par an (**Figure 2**). L'Amazonie est caractérisée par un réseau complexe de rivières et de lacs ayant des paramètres physicochimiques particuliers. On peut ainsi distinguer trois types d'eau principaux. Les eaux blanches, noires et claires qui sont due aux propriétés géologiques de leur bassin (Sioli, 1956b). Les rivières d'eaux blanches proviennent des Andes, elles sont caractérisées par une forte charge en solides dissous et en sédiments riches en nutriments. Ces



Figure 2. Carte du bassin amazonien. La zone en vert correspond à la dépression ucayara. Les rivières soulignées en rouge sont celles mentionnées dans le texte.

eaux ont un pH proche de la neutralité et une conductivité variable, entre 40 et 140 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Ríos-Villamizar et al., 2013). Par exemple, le rio Marañon, le rio Ucayali sont des rivières d'eaux blanches. Les rivières d'eaux noires drainent généralement de vastes étendues de sable blanc (podzols) pauvres en sédiments. En traversant les larges étendues forestières, elles se chargent en tanins et en acides humiques, leur conférant leur aspect ambré-rougeâtre. Ces eaux ont un pH acide de l'ordre de 4 - 5 (dans un affluent du Nanay nous avons même mesuré une valeur de 3,2) et une conductivité inférieure à 20 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Ríos-Villamizar et al., 2013). L'exemple type de rivière d'eau noire est le Negro, au Brésil. Au Pérou, le Nanay fait partie des rivières d'eaux noires. Les rivières d'eaux claires traversent généralement des sols granitiques précambriens (âges de plus de 542 Ma) pauvres en sédiments. Ces eaux ont un pH de 6-7 et une conductivité comprise entre 10 et 20 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Ríos-Villamizar et al., 2013). Le Tapajós et le Xingú (Brésil) sont par exemple des rivières d'eaux claires.

Chaque année la plaine d'inondation du bassin amazonien connaît une phase de crue et de décrue qui affecte la migration, le taux de recrutement et le taux de mortalité de poissons juvéniles (Sousa et Freitas, 2008 ; Olsen et al., 2019) et influence la connectivité des habitats (Fernandes et al., 2009 ; Hurd et al., 2016). De nombreuses espèces se sont adaptées à ces conditions changeantes (Junk, 1985 ; Val et al., 1998). Ces conditions environnementales particulières de l'Amazonie donnent d'innombrables niches écologiques très différentes à celles des grands lacs africains et nicaraguayens. De plus, en Amazonie les niches écologiques et les réseaux hydriques constituent un réseau fractal complexe qui se distribue sur un plan horizontal plutôt que vertical. Ces environnements particuliers pourraient

favoriser l'apparition de radiations adaptatives, de mécanismes de spéciation sympatriques et écologiques, semblables à ce qui est observé dans les grands lacs africains et nicaraguayens.

A. III. *Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875), un modèle de choix

Les espèces du genre *Apistogramma* ont généralement de petites aires de répartitions. Cependant, 3 espèces sur les 94 formellement décrites à ce jour sont largement distribuées sur le bassin amazonien. Il s'agit des espèces *Apistogramma cacatuoides* (Hoedeman, 1951), *A. bitaeniata* (Pellegrin, 1936) et *A. agassizii* (Römer, 2000, 2006). L'espèce *A. agassizii* est celle qui est la plus largement distribuée, son aire de répartition connue s'étend de l'embouchure de l'Amazone jusqu'aux rivières Marañon et Ucayali. Elle est aussi rencontrée dans bon nombre de ses affluents (non exhaustif) comme les rios Tapajos, Xingu, Negro, Yavarí, Madeira, Tigre, ...etc. (Britzke, 2015). On rencontre cette espèce dans tous les types d'eau et dans différents types d'habitats (dans les zones d'inondations et en dehors) (**Figure 3**). Cependant, elle affectionne les zones avec peu de courant où s'amoncellent les débris végétaux et plus particulièrement les feuilles mortes (Römer, 2000) (**Figure 3 d**). L'espèce *A. agassizii* est facilement reconnaissable des autres espèces du genre par la forme lancéolée de sa nageoire caudale (**Figure 4**). Il existe chez cette espèce un fort dimorphisme sexuel. Les mâles peuvent atteindre une longueur standard approximative de 60 mm, ils sont très colorés. Les femelles quant à elles sont plus petites, elles peuvent atteindre une longueur standard approximative de 40 mm et leur coloration est cryptique (se confond avec l'environnement). En revanche, en période de reproduction la couleur des femelles passe au jaune intense (**Figure 4**).



Figure 3. Exemple de différents habitats dans lesquels est rencontrée l'espèce *Apistogramma agassizii*. **a)** type d'eau noire, **b)** type d'eau blanche, **c)** type d'eau claire. **d)** amoncellement de débris végétaux : habitat de prédilection de l'espèce *A. agassizii*

À l'échelle de l'Amazonie, il existe chez certaines populations géographiques des patrons de coloration particuliers (Römer, 2000, 2006 ; Koslowski, 2002). À l'échelle locale, différents morphes de couleurs vivent en sympatrie (**Figure 4**), les morphes jaunes/orange et bleu prédominent. Des expérimentations (Vela-Diaz, 2011 ; Tomadin, 2012) ont montré qu'au sein d'*A. agassizii* opère un choix différentiel de partenaire à plusieurs échelles géographiques. Les femelles d'*A. agassizii* se reproduisaient préférentiellement avec des mâles de la même localité d'origine qu'elle, plutôt qu'avec des mâles d'autres ruisseaux. Le choix différentiel de partenaire serait d'autant plus fort que les localités d'origines sont proches (donc que la probabilité de rencontre est forte). De plus, les femelles d'*A. agassizii* provenant d'un même ruisseau se reproduisaient systématiquement et de manière répétitive avec des mâles qui présentaient le « même » patron de couleur, bleu ou jaune/orangé.

Une étude moléculaire récente a montré que le taxon *A. agassizii* n'est pas monophylétique à l'échelle du bassin amazonien : l'espèce *A. gephyra* est située dans le taxon ; elle est divisée en 4 clades, dont un en Amazonie péruvienne (Britzke, 2015). Il est donc probable qu'au sein de l'espèce *A. agassizii*, décrite sur des critères morphométriques et de couleur, existent plusieurs unités reproductives (unités panmictiques ou populations génétiques) différenciées qui échangent peu ou pas de gènes entre-elles et donc plusieurs espèces biologiques distinctes comme le suggèrent Römer (2000), Britzke (2015) et Tougard et al. (2017). Dans *A. agassizii*, des événements récents de spéciation et de formation d'unités reproductives en sympatrie pourraient être expliqués par des mécanismes de différenciation génétique rapide basés notamment sur la sélection sexuelle. Le taxon *A. agassizii*, décrit à ce jour comme une seule espèce, présente donc de nombreuses similitudes avec ses apparentés Haplochromis des grands lacs africains : dimorphisme sexuel marqué, polymorphisme de couleur, choix d'appariement préférentiel, plusieurs clades ou unités reproductives laissant supposer des complexes d'espèces proches et en sympatrie. Elle est donc un bon modèle pour tester la spéciation sympatrique en Amazonie.



Figure 4. En haut, morphotypes de mâles *Apistogramma agassizii* « jaune/orangé » (à gauche) et « bleu » (à droite) vivant en sympatrie. En bas, femelles d' *A. agassizii* : coloration cryptique (à gauche) et coloration en période de reproduction (à droite).

A. IV. Structure de la thèse

Afin de répondre à notre objectif scientifique, différentes échelles géographiques ont été utilisées : le sous bassin versant, le microbassin à l'intérieur du sous-bassin, et le ruisseau à l'intérieur d'un microbassin. Nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- 1) Quels sont les contours génétiques d'*A. agassizii* dans la zone d'étude ?
Les rivières peuvent-elle jouer un rôle barrière au flux de gènes chez *Apistogramma agassizii* et plus largement chez *Apistogramma* ?

Nous avons d'abord voulu tester si les individus échantillonnés dans la zone d'étude appartenaient tous à une même espèce biologique (Mayr, 1942) ou phylogénétique (Hennig, 1966), *A. agassizii*, tout en mettant en évidence d'éventuelles populations génétiques (unités reproductives). Ces résultats ont été mis en relation avec leur site de collecte. Deux types de marqueurs ont été utilisés, les marqueurs mitochondriaux avec le gène de la Cytochrome c oxydase subunité I (COI) et le gène de la Cytochrome b qui permettent d'identifier des événements de différenciation génétique relativement anciens et des marqueurs nucléaires dont la variation est supposée neutre, en utilisant 10 locus microsatellites (Querouil et al., 2015) pour identifier des événements plus récents de différenciation génétique en relation avec la mutation, la dérive et la migration, et pour définir d'éventuelles unités reproductives actuelles.

Les résultats de cette étude seront présentés dans le **chapitre I : VARIATION GÉNÉTIQUE À L'ÉCHELLE DES SOUS BASSINS**

- 2) À quelle échelle géographique la fragmentation des espèces et des populations opère-t-elle sur la divergence génétique ? Au niveau du sous bassin versant ? Entre microbassins ?
- 3) Existe-t-il en sympatrie, dans un même microbassin, différentes populations génétiques (cf. panmictiques) ?

À partir des résultats obtenus dans le chapitre 1, nous avons essayé pour chacune des unités évolutives mises en évidence, de démêler les différents niveaux de hiérarchisation entre leurs populations. L'histoire évolutive des populations a ensuite été recherchée par méthode de coalescence. Les résultats relatifs aux questions 2) et 3) seront présentés dans le **chapitre II : LA VARIATION GÉNÉTIQUE À L'ÉCHELLE DES MICROBASSINS**.

- 4) *A. agassizii* est-elle génétiquement structurée par la sélection sexuelle ? Existe-t-il un isolement prézygotique entre populations ?

L'objectif de cette étude était de déterminer en expérimentant sur le choix de partenaire s'il existe un isolement reproducteur en fonction du niveau hiérarchique considéré. Les résultats seront présentés dans le **chapitre III : ISOLEMENT PRÉZYGOTIQUE À L'ÉCHELLE DES SOUS-BASSINS ET DES MICROBASSINS**.

Les chapitres **DISCUSSION** et **CONCLUSION** porteront sur les capacités de radiations du modèle *Apistogramma agassizii* et l'hypothèse de la spéciation sympatrique en Amazonie au regard du paradigme que constituent les cichlidés des grands lacs africains. Le modèle *Apistogramma* sera ensuite replacé dans le contexte global de la conservation des écosystèmes amazoniens et le défi que constitue la conservation de ce type d'espèces. Des perspectives de recherches nécessaires pour consolider les approches entreprises et pour tester les hypothèses énoncées dans la discussion, seront présentées.

B. MÉTHODES

B. I. Échantillonnage

Entre 2015 et 2018, ont été prospectés 76 sites géographiques dans lesquels étaient présent le genre *Apistogramma*. Sur les 76 sites, 35 présentaient l'espèce *A. agassizii*. Aucun individu d'*A. agassizii* n'a été rencontré dans les sites géographiques correspondant aux rivières et affluents du Napo, Momon, Itaya et Mazán (**Figure 5**).

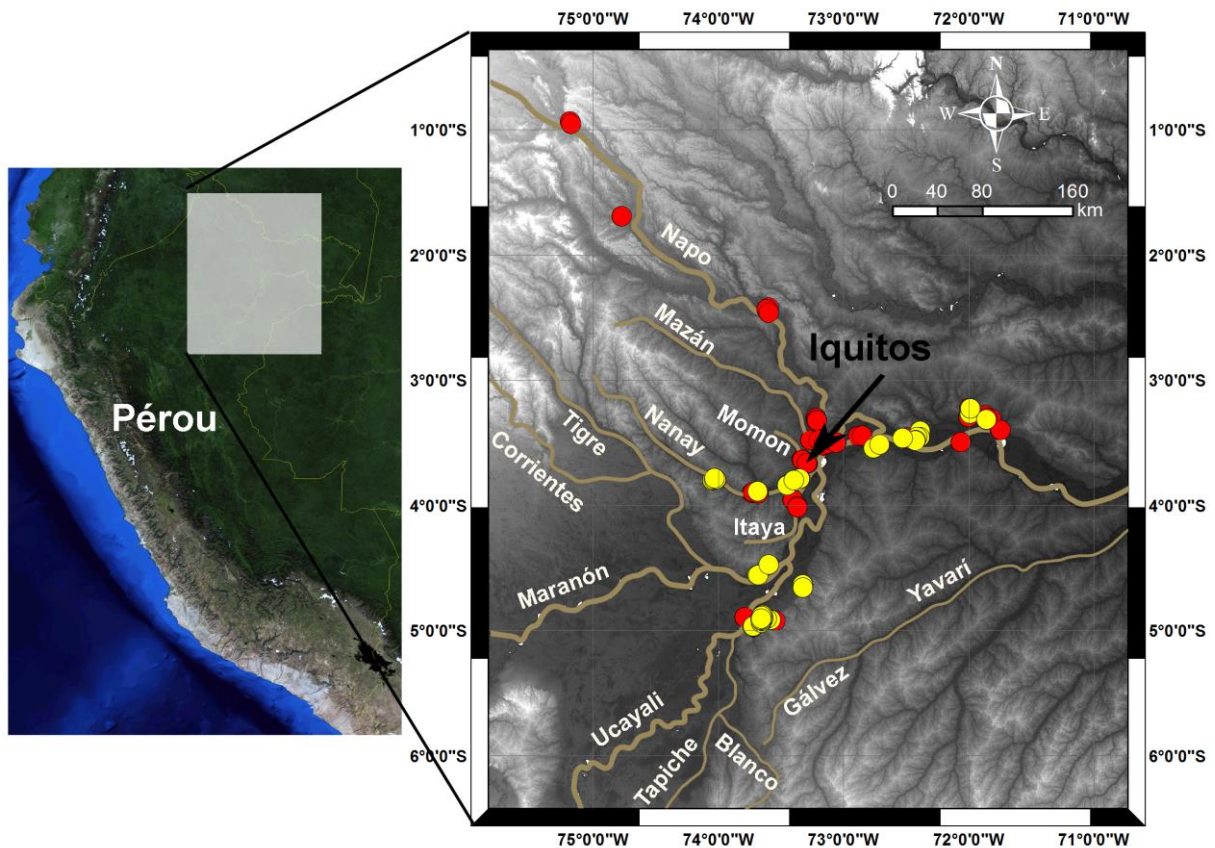


Figure 5. Positions géographiques des 76 sites prospectés entre 2015 et 2018. Les points en rouge correspondent aux sites pour lesquels aucuns individus d'*Apistogramma agassizii* n'ont été rencontrés mais pour lesquels ont été trouvé au moins une espèce du genre *Apistogramma*. Les points en jaune (35) correspondent aux sites pour lesquels *Apistogramma agassizii* a été trouvé

Les poissons ont été pêchés en utilisant une senne de plage ou une épuisette (**Figure 6**). Au total 1135 individus d'*Apistogramma agassizii* ont été collectés sur les 35 sites dans les sous bassins versant de l'Ucayali (353 000 km²), Marañon (380 000 km²), Amazone (6 915 000 km²) et Nanay (17 600 km²) (**Figure 7**). Nous avons dans un premier temps défini notre zone d'étude à partir de trois régions où *A. agassizii* était connu pour être abondant d'après les informations recueillies auprès des pêcheurs ornementaux. La première zone d'étude est la rivière Nanay (**Figure 7a**), qui représente la plus grande rivière d'eau noire de l'Amazonie péruvienne. *A. agassizii* est principalement distribué dans sa plaine inondable. La seconde zone d'étude correspond aux environs de Jenaro Herrera (Loreto, Pérou) (**Figure 7b**). Cette région est drainée par des réseaux complexes de microbassins en zone forestière, de différentes tailles (entre 485 et 8 km²) qui se déversent à différents niveaux de la rivière Ucayali. Les microbassins de cette région, sur la rive droite de l'Ucayali, sont situés sur la terre ferme "tierra firme", c'est-à-dire qu'ils ne sont pas submergés par les crues de l'Ucayali. Une troisième zone d'étude

correspond aux environs d'Orán (**Figure 7c**). Cette région est plus vallonnée que celle de Jenaro Herrera, elle est drainée par des réseaux complexes de ruisseaux mais à la différence de Jenaro Herrera certains d'entre eux sont connectés par l'intermédiaire d'une zone marécageuse au niveau de leur source (**Figure 7c**). Il existe aussi dans la partie Sud-Est de cette région de tout petits réseaux de ruisseaux qui s'apparentent plus à des ravines connectées entre elles par un lac de méandre qui s'est formé au cours de la dynamique fluviale de l'Amazonie (**Figure 7c**). Nous avons échantillonné aux alentours de ces 3 régions afin d'évaluer la structuration génétique de l'espèce à différentes échelles géographiques. Une fois collectés, les poissons ont été anesthésiés à l'eugénol selon le protocole défini par Chanseau et al. (2002) jusqu'à l'arrêt respiratoire, puis stockés dans des tubes codés un par un et conservés avec de l'éthanol 96%. L'alcool a été renouvelé après 24 heures. Les tubes avec les spécimens sont conservés dans la collection du "Laboratorio de Biología y Genética Molecular del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana" (**LBGM-IIAP**, Iquitos, Pérou). À ces échantillons ont été ajoutés 35 individus provenant de la rivière Tapiche (un affluent de l'Ucayali), collectés en 2009 et qui étaient conservés dans la collection du LBGM-IIAP. Chaque population géographique collectée en un même site, a été par la suite appelé « popsite ». Au total 1170 individus provenant de 36 popsites ont été étudiés.



Figure 6. Type de matériel utilisé pour collecter *Apistogramma agassizii*

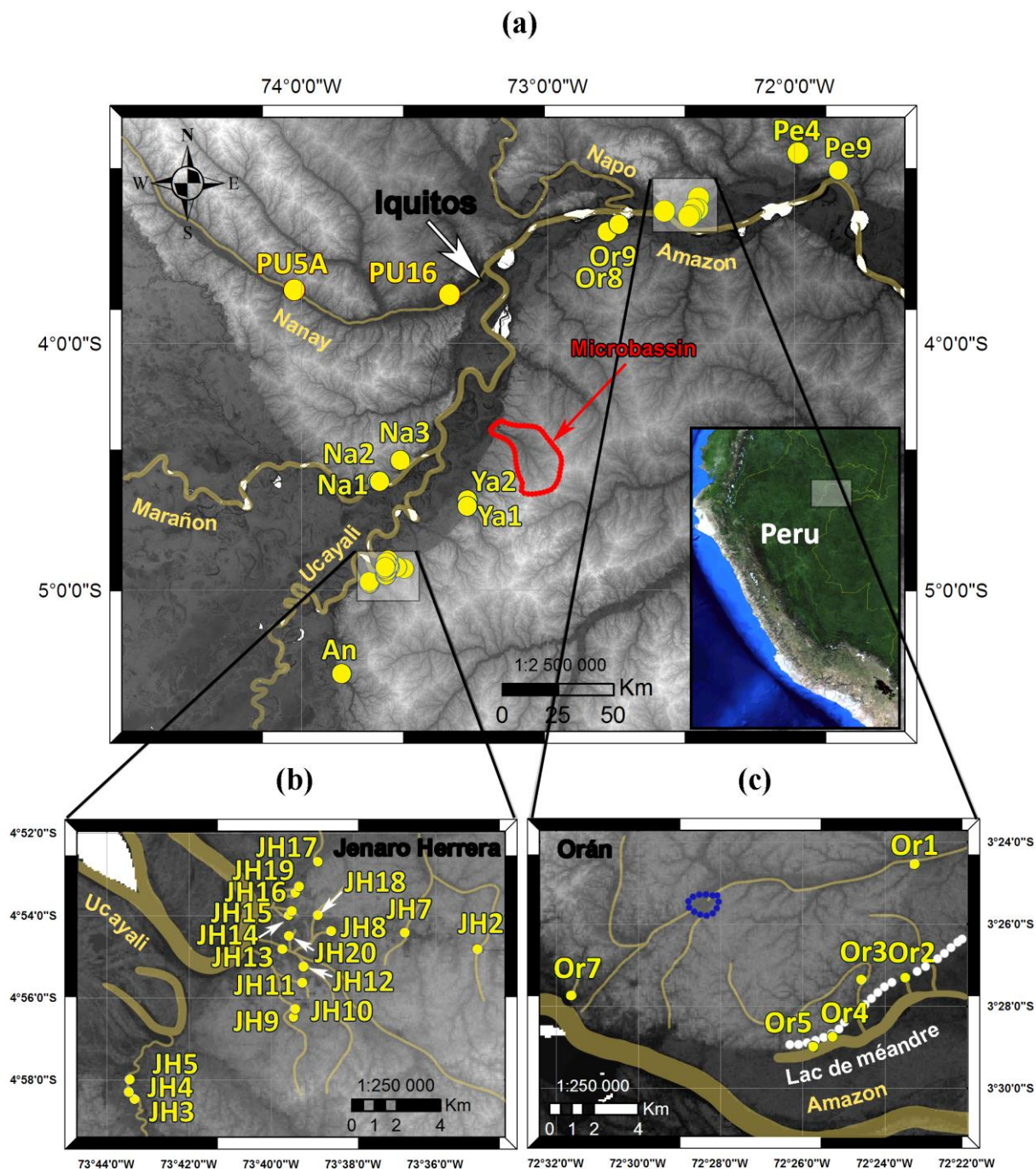


Figure 7 : Carte d'élévation de, **a)** la zone d'échantillonnage (Loreto (Pérou)) des 36 sites de collecte (popsites), en rouge délimitation de ce que nous considérons comme un microbassin **b)** la zone d'échantillonnage dans la région de Jenaro Herrera et **c)** la zone d'échantillonnage dans la région de Orán. Le cercle en pointillés bleu désigne la zone de connexion entre différents microbassins. Les pointés en blanc désignent la zone où l'on rencontre des corps d'eau similaires à des ravines. Les dégradés de gris correspondent aux changements d'altitude, les parties claires correspondent aux zones hautes, en foncé aux zones basses.

B. II. Variation génétique à l'échelle des sous-bassins versants Nanay, Ucayali, Marañon

B. II. 1. La démarche adoptée

La variabilité génétique d'*Apistogramma agassizii* dans l'ensemble de la zone d'étude a été étudiée au moyen de marqueurs mitochondriaux : la Cytochrome c Oxydase sous-unité I (**COI** ; Miya et Nishida, 2000 ; Ramos, 2007) et la Cytochrome b (**Cyt b**, Tougard et al., 2017 ; López-Fernández et al., 2010) ; et de 10 marqueurs nucléaires (locus microsatellites) (Quéroutil et al., 2015).

Les gènes de la COI et de la Cyt b nous ont permis d'identifier les événements de cladogenèse et d'anagenèse tandis que les locus microsatellites ont permis de mettre en évidence les entités génétiques (unités reproductives) structurées en clusters ou populations génétiques. Les trois marqueurs utilisés qui appartiennent aux deux types d'ADN, permettent d'obtenir différents niveaux de résolution sur l'échelle temporelle des événements de différenciation. Le gène de la COI est par rapport aux autres types de marqueurs le mieux conservé le long de la phylogénie (taux de mutation plus faible), il permet d'identifier les événements évolutifs anciens. Il est couramment utilisé pour différencier les espèces (García-Dávila et al., 2015). Le gène de la Cyt b se révèle parfois plus performant que celui de la COI pour différencier les espèces qui ont récemment divergé. Les locus microsatellites sont plus variables car non codants et donc pas sous sélection. Ils permettent d'identifier les événements récents de divergence et surtout ont une hérédité biparentale permettant de définir des unités reproductives actuelles.

Cette thèse s'intéressant tout particulièrement à ces événements récents de divergence et à la définition des populations (unités évolutives définies ici selon le critère de la panmixie), nous avons commencé par les génotypages pour mettre en évidence les unités évolutives. Au total 1170 individus ont été génotypés pour les 10 locus microsatellites.

Les allèles nuls ont été recherchés en prenant comme unité taxinomique la popsité en utilisant le programme Micro-Checker version 2.2.3. (Oosterhout et al., 2004), puis en considérant la même unité taxinomique, les paramètres de génétique des populations ont été calculés à travers la mesure des valeurs de : (1) la diversité allélique, le nombre moyen d'allèles par locus, la richesse allélique et le nombre d'allèles privés (**NTA**, **NMA**, **RA** et **NAP**, respectivement) en utilisant les logiciels Fstat version 1.2 (Goudet, 1995) et GENETIX version 4.05.2 (Belkhir et al., 2004), (2) la diversité génétiques tel que l'hétérozygotie attendue, l'hétérozygotie attendue non biaisée et l'hétérozygotie observée (**H exp.**, **H n.b.** et **H obs.**, respectivement) avec le logiciel GENETIX et (3) les écarts à la panmixie, évalués en fonction des valeurs de l'estimateur du F_{IS} (Weir et Cockerham, 1984), en utilisant le programme GENETIX.

Nous avons ensuite réalisé une analyse factorielle des correspondances (**AFC**) sur les individus (en conservant l'information popsité) pour estimer l'organisation des données, nous avons pour cela utilisé le programme GENETIX. Les relations de distance génétique entre les popsites ont été évaluées en construisant un diagramme non raciné de type Neighbor Joining à partir d'une matrice de distance de Nei (1983). La robustesse des nœuds a été testée par « bootstrap » à partir de 1000 tirages. Les analyses sur les distances génétiques ont été réalisées en utilisant la librairie « adegenet » de R (Jombart, 2008).

La structuration génétique en clusters sans *a priori* sur la position géographique des individus a ensuite été recherchée avec deux méthodes : DAPC (Jombart et al., 2010), STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Les premiers niveaux de hiérarchisation des données génétiques ont été recherchés sans faire

intervenir la position géographique des individus, mais en considérant les groupements mis en évidence avec l'AFC et le dendrogramme des distances génétiques.

Avec la méthode DAPC, les clusters génétiques sont tout d'abord recherchés par méthode de K-mean, qui consiste à assigner les individus à un cluster (**k**) à l'intérieur duquel leur distance moyenne est minimisée. Ces clusters sont considérés comme les clusters définis *a priori*. Puis à partir d'une analyse discriminante en composante principale (**ADCP**), des valeurs de réassignations sont obtenues pour chaque individu aux clusters définis *a priori*. Une bonne réassignation est le signe d'une forte discrimination entre les clusters. Le nombre de **k** a été considéré comme bon lorsqu'il donnait le plus grand nombre de clusters possibles totalement disjoints.

Pour rechercher les clusters, le logiciel STRUCTURE se base sur le calcul d'une loi *a posteriori* (méthode Bayésienne) qui combine à la fois une loi *a priori* et une fonction de vraisemblance ($\ln P$) ; elle est couplée à une méthode d'échantillonnage, celle de Monte-Carlo par chaînes de Markov (MCMC), pour explorer l'espace des paramètres. La structuration des données pour les valeurs de **k** a été testée sur 20 itérations. L'algorithme stochastique de la méthode MCMC nécessitant un certain laps avant d'atteindre le plateau de l'asymptote, nous avons fixé la longueur du « burnin period » à 50 000 afin d'exclure la partie instable et nous avons fixé la longueur de la chaîne à 500 000 répétitions. Nous avons déterminé la meilleure valeur du **k** à partir de la mesure du Δk (Evanno et al., 2005) avec la formule suivante : $\Delta k = (X \ln P(k_{+1}) - 2 X \ln P(k_0) + X \ln P(k_{-1})) / \sigma(k_0)$.

Les individus à séquencer ont été choisis en fonction des résultats obtenus sur les données génotypiques lors de la recherche des niveaux de hiérarchisation les plus élevés. Au total, 110 individus de 35 popsites ont été sélectionnés pour le séquençage des gènes COI et Cyt b. Les fragments de séquences totales ont été obtenus par alignement des fragments forward et reverse en utilisant le programme MEGA-X v.10.0.5 (Kumar et al., 2018). Aucun gap ni donnée manquante n'a été observé. Les séquences d'un même individu ont été concaténées et le nombre d'haplotypes, la diversité haplotypique, la variance de la diversité haplotypique et la diversité nucléotidique (**Nhap**, **Hd**, **V(Hd)** et **π** , respectivement) ont été calculés en utilisant le programme DnaSP v.6 (Rozas et al., 2017). Un arbre de maximum de vraisemblance (**ML**) a été réalisé avec le programme MEGA-X v.10.0.5 (Kumar et al., 2018) à partir des haplotypes en utilisant le meilleur modèle évolutif estimé avec le critère d'information d'Akaike corrigé (**AICc**) de Burnham et Anderson (2004), afin d'identifier les clades et les anagenèses.

Afin de reconstruire l'histoire évolutive entre les clades, nous avons supposé que l'horloge moléculaire était constante. Nous avons alors calculé les divergences par clades d'haplotypes à partir du nombre de substitutions de nucléotides selon la méthode du maximum composite likelihood (MEGA-X v.10.0.5 (Kumar et al., 2018)). Les dates de divergences ont été estimées d'après Genner et al. (2007) en utilisant deux types de calibrations, la première considère que l'origine des cichlidés est antérieure à la fragmentation du Gondwana (121–165 Ma, Sparks et Smith, 2005), tandis que la seconde prend en compte la datation fossile des cichlidés impliquant une dispersion transatlantique (33,9 – 55,8 Ma ; Malabarba et al., 2006 ; Friedman et al., 2013). Dans chacun des cas nous avons considérés comme référence les dates de divergences entre les genres *Apistogramma* et *Crenicichla* que les mêmes auteurs ont estimés à 50,2 (calibration par rupture du Gondwana) et 17,3 Ma (calibration par les fossiles). Afin d'avoir une meilleure estimation du taux moyen de substitution entre *Apistogramma* et *Crenicichla* nous avons utilisé l'ensemble de nos séquences COI d'*Apistogramma agassizii* auxquelles nous avons ajouté des séquences d'*Apistogramma* provenant de GeneBank et mesuré le taux de substitution nucléotidique entre ces séquences et celles de *Crenicichla* obtenues dans la même base de données (**Annexe 2**).

Les « espèces » d'*A. agassizii* ont été identifiées sur la base de trois critères : 1) la structuration en clusters génétique, sur la base des 10 locus microsatellites, qui en sympatrie correspondent à des unités reproductives distinctes (Mallet, 1995), 2) la structuration en clade monophylétique sur la base des marqueurs COI et Cyt b concaténés (Hennig, 1966 ; Cracraft, 1989 ; Mayden et Wood, 1995), et 3) l'isolement prézygotique, cause ou conséquence de la spéciation (Mayr, 1942).

B. II. 2. Extraction d'ADN, amplification et génotypage des locus microsatellites

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir d'environ 10 mg de nageoire et en utilisant un protocole d'extraction au CTAB modifié de Doyle et Doyle (1987).

L'amplification des 10 locus microsatellites a été réalisée avec des amorces mises au point par Quéroutil et al. (2015) et en utilisant le kit Qiagen Multiplex PCR. Les 10 locus ont été amplifiés en 4 multiplex (**Tableau 1**). Chaque locus de chaque multiplex était marqué par une amorce fluorescente (6-FAM, HEX ou NED (Applied Biosystems)). Les volumes de réactions, en particulier les quantités d'amorces, ont été ajustés car certains locus amplifiaient mieux que d'autres. Le programme d'amplification utilisé a été celui préconisé par le fabricant du kit (T°C d'hybridation 57°C et 28 cycles). L'analyse de la longueur des fragments a été réalisée sur un séquenceur ABI 3130 XL à 16 capillaires (Applied Biosystems). Pour chaque capillaire, nous avons utilisé 1 µL du produit PCR dilué, ajouté à 8,85 µL de formamide et 0,15 µL de ROX 500™ puis dénaturés 10 min à 70°C. La taille de chaque allèle a été obtenue en utilisant le programme Geneious 9.1.8 (Kearse et al., 2012).

Tableau 1 : Caractéristiques des conditions pour l'analyse des multiplex des 10 marqueurs microsatellites

Multiplex	Locus	Séquences amorces	Proportion d'amorce	Facteur de dilution	Intervalle de taille des allèles	Nombre d'allèles
MPX1	Api-mic-01	L: TTGGCTCAGGTTAGAGCTGG R: AAACAATCCGCTGCTAATG	1	8	100-218	55
	Api-mic-09	L: TGTGGTTTCAGCGTCTCAAG R: GATGGTGGTCTCTTCATCCC	1		123-221	28
MPX2B	Api-mic-08	L: GCAAAAAGCGTCAACACTGA R: GAGTTCATTAGCCCAGTTCCC	1	8	116-200	31
	Api-mic-14	L: TTCATGCCTTTGTGTCTGGA R: CCACAAAAGTCCGAGACC	1		114-182	34
	Api-mic-28	L: CGCTGCATTCTTCAATACCA R: GGTGCTCGATTGGTTTCATT	1		192-244	17
	Api-mic-16	L: TGCAGCATGGACACAATCTT R: GTTTCAGGGGTGGACTATG	1		136-154	10
MPX3	Api-mic-30	L: CCCATGTTGTTGCTTTGTTG R: GGTACCCAAATCCTCACCT	1	10	172-241	35
	Api-mic-32	L: CTGGTGGGTTGGATGATTTT R: TCCCTTTGTCCTTGAGCTGT	1		195-279	33
MPX4B	Api-mic-06	L: AATGTCAGCCACAAAAAGG R: GTCCACATGCTTCAGTCAGG	0,75	7	122-288	75
	Api-mic-11	L: ATGCACAAATGGACACATGC R: CCTGGTTTGCTGTTCTTAA	0,5		121-195	18

B. II. 3. Amplification et séquençage des gènes de la COI et de la Cyt b

Le gène de la COI a été amplifié en utilisant les amorces L5698-Asn (F) 5'-AGG CCT CGA TCC TAC AAA GKT TTA GTT AAC-3' (Miya et Nishida, 2000) et H7271 (R) 5'-GTG GTG GGC TCA TAC AAT AAA-3' (Ramos, 2007). Pour les deux fragments, une partie des amplifications ont été réalisées dans un volume de 10 µL contenant : 1 µL de buffer 10x pour Kod Hot Start DNA Polymerase (Novagen®), 1,7 µL dNTP (25 mM), 0,8 µL MgSO₄ (25 mM), 0,7 µL Kod Hot Strat DNA Polymerase (1,0U/µL), 3,8 µL H₂O, 0,5 µL

pour chaque amorce et 1 µl ADN (100 ng/µl). L'autre partie a été réalisée dans des volumes de 30 µl. Le programme d'amplification utilisé comprenait une phase d'activation de la polymérase de 2 min à 94°C puis 35 cycles : de 30 s à 94°C, 40 s à 54°C et 1 min à 72°C, pour terminer une extension finale de 10 min à 72°C.

Le gène de la Cyt b a été amplifié en utilisant les amorces ApistoCB1 (F) 5'-ATG GCA AWT TTA CGA AA-3' (Tougard et al., 2017) et CytIntR (R) 5'-GGT GAA GTT GTC TGG GTC-3' (López-Fernández et al., 2010). L'amplification a été réalisée dans un volume de 30 µl contenant 3 µl de buffer 10 x pour Kod Hot Start DNA Polymerase (Novagen®), 5,1 µl de dNTP (25 mM), 2,4 µl de MgSO₄ (25 mM), 2,1 µl de Kod Hot Strat DNA Polymerase (1.0 U/µl), 11,4 µl d'H₂O, 1,5 µl de chaque amorce et 3 µl d'ADN (100 ng/µl). Le programme d'amplification utilisé comprenait une phase d'activation de la polymérase de 5 min à 94°C puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 51,7°C et 1 min à 72°C, pour terminer une extension finale de 5 min à 72°C. Les réactions de séquences ont été réalisées dans les deux sens en utilisant les mêmes amorces que pour l'amplification. Une partie de l'analyse des séquences a été réalisée sur un séquenceur ABI 3130XL à 16 capillaires (Applied Biosystems). Les amplifications réalisées dans des volumes de 30 µl (2/3 COI et 100% Cyt b) ont été envoyés en France à la société Genosceen afin de réaliser le séquençage par prestation de service.

B. III. Variation génétique à l'échelle des microbassins et des ruisseaux

B. III. 1. Mise en évidence des unités reproductives par « clustering » et pertinence de la méthode

Les deux méthodes de « clustering » utilisées précédemment (DAPC et STRUCTURE) ont été réutilisées sans tenir compte de la position géographique des individus et cette fois-ci en recherchant la méthode la plus pertinente pour trouver le nombre de k qui semble être le plus optimal. Avec la méthode DAPC le nombre de clusters optimal a été recherché comme précédemment par méthode de k-mean mais cette fois-ci sans imposer un nombre de k. Les configurations pour chaque k ont été comparées en utilisant le critère d'information bayésien (**BIC**). Idéalement, la valeur du BIC la plus basse correspond au nombre de k optimal. Le nombre optimal de composantes principales utilisées pour construire l'espace discriminant de la DAPC a été déterminé en utilisant la fonction *optim.a.score*. La méthode DAPC ne se base que sur des critères géométriques pour identifier les clusters.

Au contraire, STRUCTURE utilise des hypothèses de génétique des populations, avec un modèle de mélange (admixture), de fréquences alléliques corrélées entre populations (considère du flux de gènes ou une ascendance commune entre populations) et tend ainsi à trouver les clusters les plus panmictiques possibles (dans lequel les individus se reproduisent aléatoirement, comme attendu dans une population génétique à « l'équilibre » de Hardy Weinberg). La structuration des données pour chaque valeur de k a été testée sur 10 itérations.

La méthode STRUCTURE donne pour chaque individu sa probabilité d'appartenance à un cluster, alors que DAPC donne seulement une valeur d'assignation d'un individu à un cluster défini *a priori* par méthode de k-mean. Les méthodes STRUCTURE et DAPC ne sont donc pas directement comparables entre elles.

Pour faire un choix entre les deux méthodes nous avons considéré que la meilleure méthode était celle qui trouve la plus grande proportion de clusters pour lesquels on ne peut pas rejeter l'hypothèse de la panmixie. À partir de la méthode choisie, les données ont été réorganisées en clusters et pour chacun d'entre eux les paramètres de génétique des populations ont été mesurés. Les clusters obtenus ont

ensuite été considérés comme au plus près de populations génétiques car correspondant aux plus petites unités de reproduction.

Sans mise à l'épreuve de la méthode employée, on ne peut pas rejeter l'hypothèse qu'elle puisse générer des clusters à partir de n'importe quelle matrice de données et que ceux-ci puissent être sans aucune pertinence biologique : qu'ils soient donc artéfactuels. Dans le temps imparti pour la thèse, ne pouvant valider les clusters mis en évidence par une autre méthode indépendante que celle qui les a générés, comme par exemple par un test de l'isolement reproducteur opérée entre eux, leur pertinence a été testée pour le niveau hiérarchique le plus grand (échelle du sous-bassin) et le plus petit (échelle du microbassin). Pour cela nous avons comparés les valeurs de F_{ST} entre clusters issus de la matrice réelle brassée artificiellement, avec (1) après avoir cassé les déséquilibres de liaisons (en permutant aléatoirement les génotypes dans chaque locus) et (2) après avoir créé une population panmictique (en permutant aléatoirement les allèles entre les génotypes de chaque locus). Si les F_{ST} obtenus à partir de la matrice réelle sont supérieurs à ceux obtenus à partir des matrices brassées aléatoirement, alors nous rejeterons l'hypothèse de clusters d'origine artéfactuelle.

B. III. 2. Scénarios évolutifs

L'histoire évolutive des populations a été recherchée en utilisant l'approche de la coalescence par la méthode de calcul bayésien approché (**ABC**) avec le programme DIYABC (Cornuet et al., 2014). À la différence de l'inférence Bayésienne, la méthode ABC ne se base pas sur une loi *a posteriori* mais sur une loi *a posteriori* résumée simulée. Cela consiste à modéliser des jeux de données théoriques, simulés à partir d'une loi *a priori* (un scénario évolutif et ses paramètres démographiques), de statistiques résumées (ex : nombre moyen d'allèles par locus, nombre d'haplotypes...etc.) et d'un modèle de mutation (ex : taux moyen de mutation des locus microsatellites...etc.). Cela permet de considérer seulement des paramètres d'intérêts, diminuant ainsi les dimensions des données et donc le temps de calcul. Pour chaque modèle testé, sont simulés des jeux de données, on obtient alors la distribution *a posteriori* des jeux de données simulés de l'ensemble des paramètres d'intérêts. Ces jeux de données simulées sont ensuite comparés par mesure de similarité à des jeux de données générés à partir des mêmes conditions (*a priori*, statistiques résumées et taux de mutation) mais cette fois-ci en y intégrant les données observées. Le principe de la méthode est de trouver parmi les scénarios testés, celui qui est le plus à même de produire les données observées. C'est à partir du scénario le plus probable que sont ensuite estimés les paramètres démographiques.

La méthode comporte trois étapes : 1) paramétrage du modèle et choix des statistiques résumées, 2) choix du meilleur scénario et qualité du modèle, 3) estimation des paramètres démographiques.

a) Paramétrage du modèle et choix des statistiques résumées

Le paramétrage des modèles comprend deux étapes. La première correspond au paramétrage historique. Cela consiste tout d'abord à définir les scénarios testés par une succession d'évènements au cours du temps (**t**) avec pour départ le présent (t_0), vers le passé (t_n). Chaque pas de temps décrit un ou des évènements particuliers comme par exemple la divergence entre deux populations, le changement dans la taille efficace d'une population, un évènement de mélange entre population, etc... Par exemple pour le scénario x on considère qu'à t_1 la population 2 de taille efficace N_2 a divergé de la population 1 de taille efficace N_1 , à t_2 la population 1 de taille efficace N_1 a divergé de la population 3 de taille efficace N_3 , etc... Pour l'ensemble des scénarios testés, une gamme d'estimation est donnée pour chaque paramètre (ex : taille efficace N_1 comprise entre 10 000 et 100 000, t_1 compris entre 500 et 3000 générations) (**Annexe 3**).

La seconde étape correspond au paramétrage du modèle de mutation. Les caractéristiques de chaque locus microsatellite (le type de motif et la gamme de taille des allèles exprimé en nombre de répétitions) ont été renseignées. La gamme de taille des allèles est tirée d'une approximation à partir des données observées (**Annexe 4**). Le modèle de mutation des microsatellites comprend 6 paramètres : le taux de mutation μ (moyen et par locus), le coefficient p (moyen et par locus) qui correspond à la distribution moyenne du nombre de répétitions du marqueur microsatellite et le taux d'insertion d'un seul nucléotide (moyen et par locus) (**Annexe 5**).

Ensuite, sont choisies les statistiques résumées à partir desquelles vont être simulés les jeux de données (**Annexe 6**). De nombreuses statistiques résumées sont proposées par le programme, cependant, seule une partie a été choisie pour simuler les données car selon Cornuet et al. (2010), il est nécessaire de choisir des statistiques résumées différentes pour 1) simuler les données et 2) vérifier la qualité du modèle. Au total, 1 500 000 jeux de données ont été simulés pour chaque scénario évolutif testé. C'est en réalisant des analyses sur ces jeux de données simulées que le meilleur scénario est choisi et que les paramètres démographiques sont estimés.

b) Choix du meilleur scénario et qualité du modèle

Le meilleur des scénarios testés a été choisi au terme de trois analyses. La première consistait à comparer les scénarios testés à partir de leurs probabilités postérieures et de leur intervalle de confiance (IC 95%). Deux approches ont été utilisées : la première approche dite « directe » utilise, pour chacun des scénarios testés, 500 jeux de données générés au plus proche des observés ; la seconde approche dite « régression logistique » (logit) comprend une phase d'ajustement sur 1% des données simulées les plus proches des observées (i.e. 15 000). Cela permet de prendre en considération les variations qui existent entre données simulées et observées.

La seconde analyse consistait à déterminer la confiance dans les scénarios testés, elle a été déterminée à travers la mesure des erreurs de type I et II sur les données *a priori* en utilisant les mêmes approches (directe et logit) que précédemment. Le calcul de l'erreur de type I consiste à déterminer la probabilité que le scénario considéré soit rejeté alors qu'il est le bon (faux négatif). Le calcul de l'erreur de type II consiste à déterminer la probabilité que le scénario considéré soit retenu alors qu'il n'est pas le bon (faux positif).

La troisième analyse consistait à vérifier la qualité du modèle à partir des distributions *a posteriori* de chacune des statistiques résumées. La proportion des données observées > simulées ont été évaluées, elles devraient être comprises dans l'intervalle [0,05 – 0,95]. Dans le cas contraire, cela signifie que le modèle surestime (<0,05) ou sous-estime (>0,95) la valeur de la statistique résumée concernée.

Une ACP a ensuite été réalisée à partir des jeux de données simulés *a priori* et *a posteriori* en fonction des statistiques résumées. Si le scénario est bon, les données observées sont incluses dans le nuage de points des jeux de données simulées *a posteriori*.

c) Estimation des paramètres démographiques

À partir du meilleur modèle capable de générer des données au plus proche des observés, les paramètres démographiques ont été estimés. Pour chaque paramètre démographique, la précision de l'estimation des paramètres a été déterminée par la mesure de la racine carrée de l'erreur quadratique moyenne relative (**RRMSE**) et la médiane absolue de l'écart absolu (**RMedAD**). De petites valeurs de ces mesures indiquent une bonne précision de l'estimation des paramètres.

B. IV. Isolement prézygotique

L'isolement prézygotique a été testé à travers le choix de partenaire. Différentes échelles géographiques ont été considérées : entre bassins, entre microbassins et entre ruisseaux d'un même microbassin. Cela consistait à présenter deux mâles à une femelle, l'un provenant de la même popsité qu'elle et l'autre provenant d'une autre popsité choisit en fonction de l'échelle géographique testée.

Dix-huit aquariums de 100x30x30 cm divisés en 3 compartiments ont été utilisés pour l'expérimentation (**Figure 8**). La partie centrale, d'une dimension de 60 x 30 x 30 cm, était réservée à une femelle et chaque extrémité d'une dimension de 25 x 30 x 30 cm était réservée à un mâle. Les vitres séparant le compartiment de la femelle et des deux mâles ont été percées (26 trous de 8 mm de diamètre) dans leur partie basse afin de permettre le passage des possibles signaux olfactifs et/ou acoustiques. Le sol de chaque compartiment a été recouvert par un substrat foncé de grosse granulométrie (> 2 cm). Le compartiment de la femelle était doté d'un filtre éponge pour la filtration mécanique et biologique. Les sites de pontes consistaient en deux tubes PVC d'une longueur de 10 cm et 4,8 cm de diamètre. Chaque tube a été coupé en deux dans le sens de la longueur et disposé de part et d'autre de la vitre séparant le compartiment du mâle et de la femelle. Chaque aquarium était doté de son propre éclairage d'une photopériode de 12/24h et la salle d'expérimentation était climatisée à 25°C pour maintenir une température d'eau d'environ 25,5°C. Chaque aquarium était isolé visuellement vis-à-vis des autres par un film plastique noir, afin d'éviter les interactions entre aquariums adjacents.

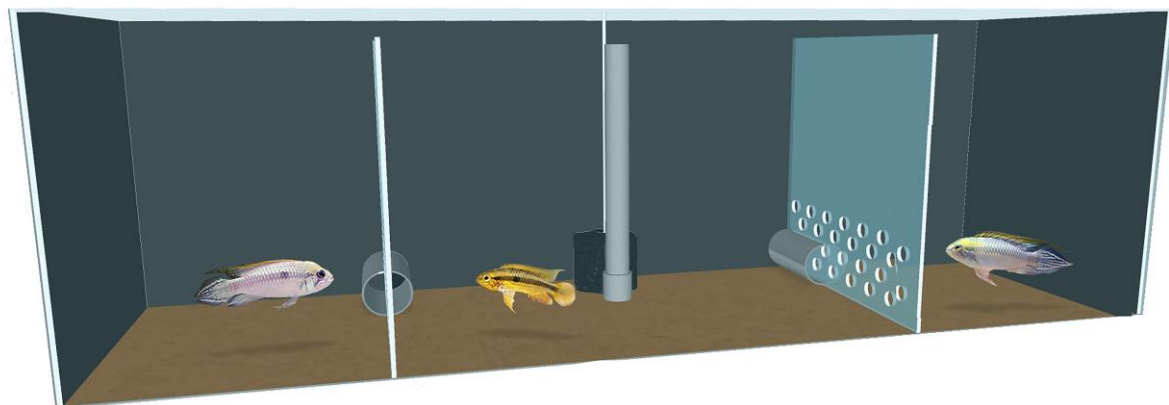


Figure 8 . Configuration type d'un aquarium utilisé pendant les expérimentations sur le choix de partenaire avec au centre la femelle et de part et d'autre les mâles.

Chaque individu a été marqué par un « nano PIT tag » (FDX-B, 7 x 1,35 mm, Loligo® Systems) inséré dans la cavité péritonéale. Ce marquage électronique a permis un suivi individuel précis des poissons utilisés en expérimentation, d'éviter les erreurs de numérotation, de faciliter la logistique et d'optimiser le bien-être des poissons (le marquage individuel permet de maintenir les individus en bacs collectifs entre deux expérimentations, plutôt qu'en isolement, ce qui diminue fortement leur stress). Le « nano PIT tag » à inséré a tout d'abord été lu afin d'écarter les marqueurs défectueux. Les poissons ont été manipulés après avoir été anesthésiés avec de l'eugénol selon le protocole de Chanseau et al. (2002). Lorsque le poisson était couché sur le flanc, que les mouvements operculaires étaient lents et de faible amplitude, une incision a été réalisée au niveau de la partie latérale gauche de la cavité péritonéale après avoir fait « sauter » une écaille (**Figure 9**). Le PIT tag a été introduit avec un injecteur puis poussé avec le doigt dans la cavité péritonéale. La cavité péritonéale a ensuite été massée afin de positionner le PIT tag dans la cavité et de refermer la plaie. Le code du PIT tag a ensuite été lu et noté.

Pour les mâles, la taille standard, la taille totale et le type de morphotype (couleur) ont été notés pendant la manipulation. Les poissons ont ensuite été placés dans un récipient sans eugénol. Après avoir montré un comportement normal les poissons ont été placés dans un aquarium dans lequel a été ajouté 4 mg d'oxytétracycline par litre afin d'éviter les infections bactériennes post-manipulations. Les femelles étaient capables de se reproduire une semaine après la manipulation.

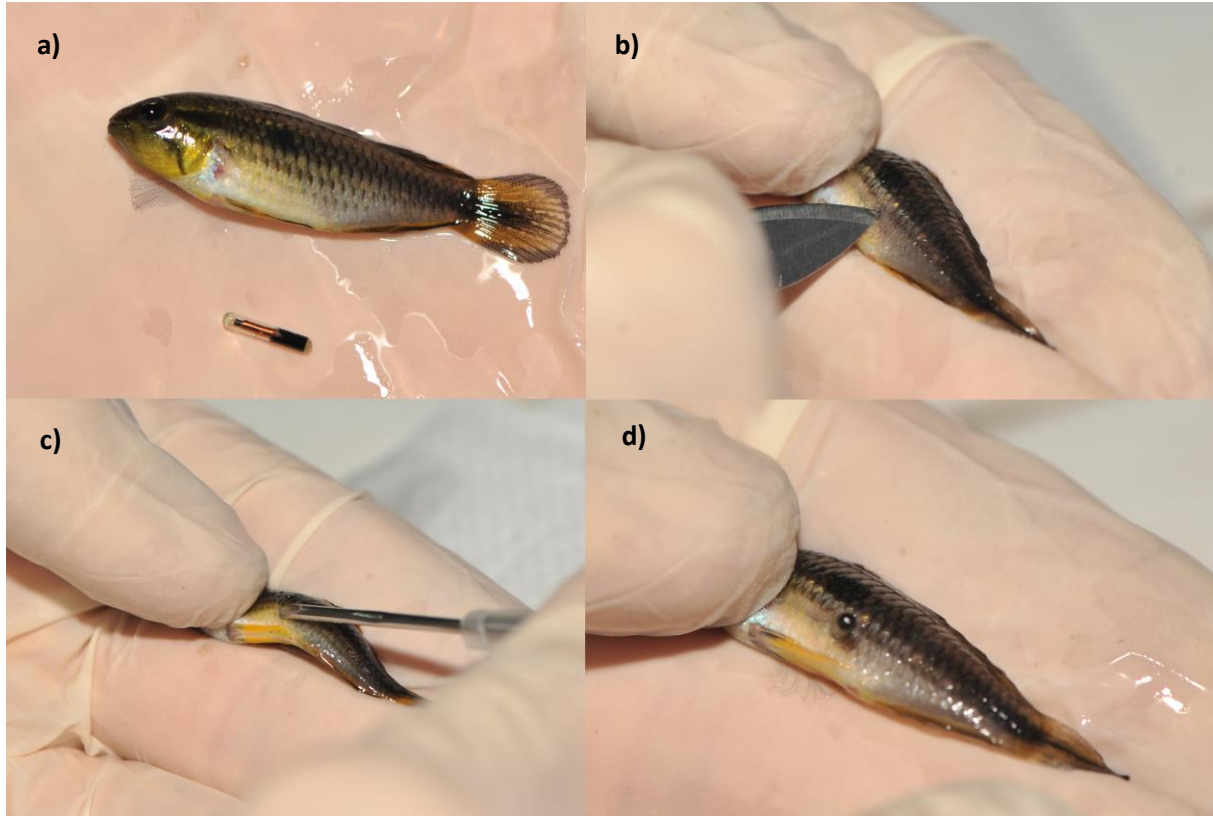


Figure 9. Procédure de marquage des poissons avec PIT tag. **a)** femelle *Apistogramma agassizii* et PIT tag, **b)** retrait d'une écaille et incision au niveau de la partie postérieure de la cavité péritonéale, **c)** insertion du PIT tag avec un injecteur et **d)** position du PIT tag avant d'être inséré dans la cavité péritonéale.

Pendant l'expérimentation, nous avons proposé à chaque femelle des mâles de tailles et de couleurs similaires (rouge vs rouge ; bleu vs bleu) afin d'éviter un biais lié au type de mâle. Par ailleurs, entre chaque aquarium nous avons alterné les mâles d'une même popsité de sorte qu'ils soient selon les aquariums une fois à gauche et une fois à droite afin de limiter l'effet aquarium ou l'effet salle d'expérimentation. Il a été considéré qu'une femelle faisait son choix lorsqu'elle pondait du côté d'un des deux mâles (Couldridge et Alexander, 2001, 2002; Römer et Beisenherz, 2005).

Dans une configuration donnée, le choix des femelles a été testé dans trois conditions lumineuses afin de tester différents environnements lumineux qui se rapprochaient le plus des conditions naturelles et de mesurer s'il pouvait exister un choix différentiel en fonction de l'environnement lumineux testé. La première condition lumineuse correspondait à une illumination Led (appelé par la suite « Led »), malgré un pic d'émission vers les 450 nm ce type d'illumination est plutôt homogène au regard des autres éclairages artificiels, cependant, elle n'émet pas d'ondes lumineuses correspondant aux UV (**Figure 10**, condition (A)). La seconde condition lumineuse correspondait à une illumination par tube fluorescent (appelé par la suite « fluo ») de type lumière du jour émettant peu dans l'UV (**Figure 10**, condition (B)). La troisième condition lumineuse correspondait à une association d'illuminations de leds et de tubes fluorescents spécifiques ayant un spectre d'émission importante dans les UV (appelé par la suite « Led/UV », (**Figure 10**, condition (A + C))). Certains poissons et notamment certains cichlidés sont sensibles aux longueurs d'ondes correspondant aux UV (Carleton et al., 2000 ; Losey et al., 2003 ; Hofmann et al., 2009).

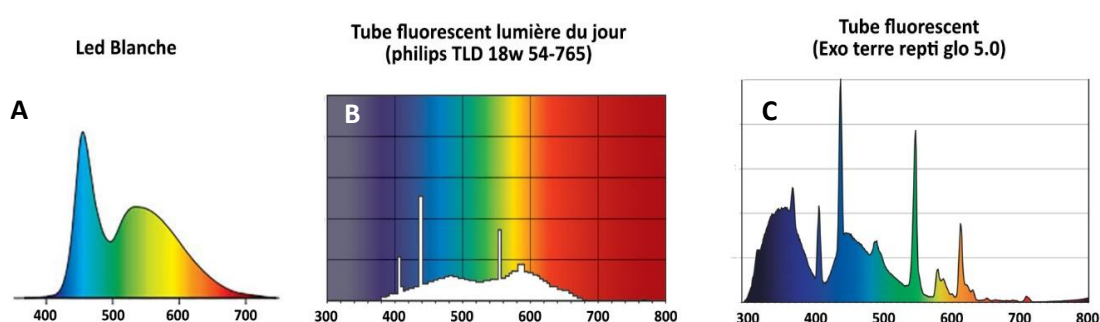


Figure 10. Couverture spectrale des 3 types d'illuminations utilisés pendant les expérimentations sur le choix de partenaire. Les valeurs sont indicatives, elles sont celles mesurées par les fabricants. Les intensités relatives de chacun des spectres ne sont pas calibrées. Condition lumineuse (A) ; Condition lumineuse (B); Condition lumineuse (A + C)

Pour déterminer si les femelles se reproduisaient préférentiellement avec des mâles de leur propre popsité, nous avons déterminé si la distribution des données s'écarte significativement de la loi binomiale. Si le choix de partenaire n'est pas aléatoire alors on s'attend à ce que la distribution des données soit asymétrique. Un test de χ^2 a été réalisé entre les résultats obtenus en fonction des différentes conditions lumineuses et selon les popsités afin de déterminer si le choix de partenaire varie en fonction de l'environnement lumineux.

C. RÉSULTATS

C. I. VARIATION GENETIQUE À L'ECHELLE DES BASSINS : mise en évidence de Sp1, Sp2, Sp3 dans *Apistogramma agassizii*

Ce chapitre a fait l'objet d'un manuscrit accepté sous réserve de modifications mineures dans *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems*, « The Amazonian dwarf cichlid *Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875) is a geographic mosaic of potentially tens of species: conservation implications, Estivals et al. » (Annexe 7).

C. I. 1. Allèles nuls

Nous avons considéré au début de la thèse 12 locus microsatellites. Parmi les 12 locus utilisés, un locus posait des problèmes lors de la lecture des pictogrammes pour identifier la taille des allèles. Pour certaines popsites, le patron des pictogrammes (hétérozygotes, homozygotes) changeaient par rapport aux autres popsites ce qui rendait l'interprétation de la taille des allèles très difficile. Nous avons choisi par précaution de retirer ce locus de l'analyse. Lors de la recherche des allèles nuls (allèles qui ne sont pas amplifiés) pour chacune des 36 popsites avec le programme Micro-Checker, un locus était quasi systématiquement suspecté de présenter un allèle nul, il a été retiré de l'analyse.

Parmi les 10 locus restants le logiciel a suspecté à 8 reprises (8 popsites) des allèles nuls sur les 36 popsites pour le locus 06, 3 fois pour les locus 28 et 30, 2 fois pour les locus 01 et 09, 1 fois pour les locus 08, 14 et 16, 0 pour les locus 32 et 11. Ces résultats ne témoignent pas nécessairement de la présence d'allèles nuls. En effet, pour détecter la présence d'allèles nuls, le logiciel se base sur les écarts entre l'hétérozygotie théorique et observée pour chaque locus et chaque popsite. Des écarts entre hétérozygotie théorique et observée peuvent être dû à : 1) un biais d'échantillonnage (échantillonnage insuffisant) ; 2) une forte consanguinité, 3) la présence de plusieurs unités génétiques dans l'échantillon considéré (effet Wahlund), ici la popsite ; 4) des allèles qui ne s'amplifient pas ou mal et ne sont pas ou sont faiblement visibles qu'à l'état homozygotes, mais ne le sont pas à l'état hétérozygote créant un déficit artificiel de celui-ci. Le locus 06 est celui qui aurait d'après les résultats obtenus avec Micro-Checker la plus forte suspicion d'allèles nul 8/36 popsites, cependant c'est aussi le locus qui présente le plus grand nombre d'allèles, 75 au total (**Tableau 1**). Il est probable que les écarts détectés entre hétérozygotie théorique et observée pour ce locus soient seulement liés à l'échantillonnage.

Une autre méthode pour identifier la présence d'allèles nuls dans les données consiste à rechercher la présence de valeurs manquantes. Si un ou des allèles nuls sont présents à l'état homozygote pour un génotype donné alors ils doivent se manifester par des génotypes manquants. Sur les 11700 génotypes obtenus pour les 1170 individus (un génotype par locus) seul 34 génotypes sont manquants soit 0,29% de valeurs manquantes sur l'ensemble des génotypes. Sur les 1170 génotypes correspondant au locus 06 seul 6 génotypes sont manquants.

Au terme de ces analyses et de ces observations nous avons considérés que s'il y avait des allèles nuls dans notre jeu de données leurs fréquences seraient faibles et leur effet sur la structure génétique observée serait anecdotique.

C. I. 2. Variabilité génétique dans l'ADN nucléaire et structuration des données

La diversité génétique entre popsites est très hétérogène (**Tableau 2**). Si l'on compare par exemple les deux popsites Or8 et Or7, qui ont le même effectif, nous constatons qu'elles ont un nombre total d'allèles de 101 et 24, respectivement. La richesse allélique pour l'ensemble des popsites est comprise entre 2,40 et 9,82 pour une valeur moyenne de $5,86 \pm 1,90$ (σ = écart type). La plus forte richesse allélique est celle de la popsite An avec 9,82, suivie par les popsites JH4, JH3 et JH5 avec des valeurs de 9,54, 9,51 et 9,35, respectivement. La popsite Or7 est celle ayant la plus faible richesse allélique. Le nombre moyen d'allèle privé par popsite est de $2 \pm 3,3$ (σ) cependant, la popsite « An » en comptabilise 19. Les valeurs de l'estimateur du F_{is} montrent un écart significatif à la panmixie pour sept popsites (JH3, Or8, JH13, JH2, JH11, JH16 et JH14) sur un total de 35 popsites.

Tableau 2: Diversité génétique et allélique des 36 popsites échantillonnées d'*Apistogramma agassizii* basé sur le génotypage de 10 locus microsatellites. N = effectif ; NTA = nombre total d'allèles ; NMA = nombre moyen d'allèles ; RA = richesse allélique ; NAP = nombre d'allèles privés ; $H_{exp.}$ = Hétérozygotie attendue ; $H_{n.b.}$ = Hétérozygotie attendue non biaisée ; $H_{obs.}$ = Hétérozygotie observée et F_{is} = écarts à la panmixie (* = p -value < 0,05)

Population	Diversité allélique					Diversité génétique			
	N	NTA	NMA	RA	NAP	$H_{exp.}$	$H_{n.b.}$	$H_{obs.}$	F_{is}
An	35	138	13,80	9,818	19	0,754	0,765	0,762	0,003
JH4	39	132	13,20	9,537	1	0,749	0,758	0,761	-0,003
JH3	48	140	14,00	9,512	6	0,754	0,762	0,708	0,072*
JH5	36	130	13,00	9,349	2	0,739	0,749	0,737	0,017
Ya3	24	92	9,20	8,147	2	0,715	0,730	0,729	0,001
Or8	30	101	10,10	7,904	4	0,710	0,722	0,654	0,096*
Or9	30	98	9,80	7,738	2	0,707	0,719	0,747	-0,040
JH10	30	83	8,30	7,259	1	0,706	0,718	0,703	0,021
JH7	29	88	8,80	7,146	4	0,644	0,655	0,682	-0,042
Ya2	23	77	7,70	6,991	1	0,694	0,709	0,735	-0,037
JH17	39	88	8,80	6,803	3	0,686	0,695	0,690	0,007
Or4	30	78	7,80	6,337	3	0,588	0,598	0,600	-0,004
Or5	30	75	7,50	6,115	1	0,537	0,547	0,514	0,061
JH9	77	74	7,40	6,091	1	0,658	0,662	0,657	0,007
JH13	52	79	7,90	6,015	2	0,681	0,688	0,650	0,055*
Or3	30	73	7,30	5,910	2	0,555	0,564	0,560	0,007
JH2	48	74	7,40	5,738	2	0,636	0,643	0,581	0,096*
Or2	30	71	7,10	5,559	0	0,496	0,504	0,493	0,022
JH11	30	63	6,30	5,524	0	0,655	0,667	0,621	0,069*
Or1	30	66	6,60	5,482	4	0,531	0,540	0,557	-0,032
Pe4	27	60	6,00	5,198	5	0,488	0,497	0,500	-0,006
JH15	26	55	5,50	5,168	0	0,650	0,663	0,700	-0,058
JH16	32	58	5,80	5,166	0	0,632	0,642	0,578	0,101*
Pe9	19	52	5,20	4,942	0	0,597	0,613	0,679	-0,110*
JH19	38	56	5,60	4,908	0	0,618	0,627	0,657	-0,050
Na2	24	55	5,50	4,675	0	0,391	0,399	0,425	-0,067
JH14	28	50	5,00	4,647	0	0,613	0,624	0,539	0,138*
JH20	39	53	5,30	4,567	1	0,549	0,556	0,536	0,036
JH18	40	45	4,50	4,184	0	0,611	0,618	0,605	0,022
Na1	24	47	4,70	4,164	0	0,391	0,399	0,408	-0,023
PU16	30	48	4,80	4,144	3	0,410	0,417	0,430	-0,032
JH8	30	42	4,20	3,963	0	0,564	0,574	0,563	0,019
JH12	16	37	3,70	3,700	0	0,544	0,562	0,613	-0,093
Na3	22	34	3,40	3,253	0	0,425	0,435	0,436	-0,004
PU5A	25	32	3,20	3,028	1	0,358	0,365	0,364	0,003
Or7	30	24	2,40	2,317	1	0,350	0,356	0,387	-0,089

L'analyse factorielle des correspondances de l'ensemble des 1170 génotypes met en évidence la présence de 3 groupes totalement disjoints sur les plans factoriels 1 (inertie = 17,43%), 2 (13,03%) et 3 (6,60%) (**Figure 11**).

**AFC sur les génotypes de 1170 individus provenant de 10 locus microsatellites
d'*Apistogramma agassizii***

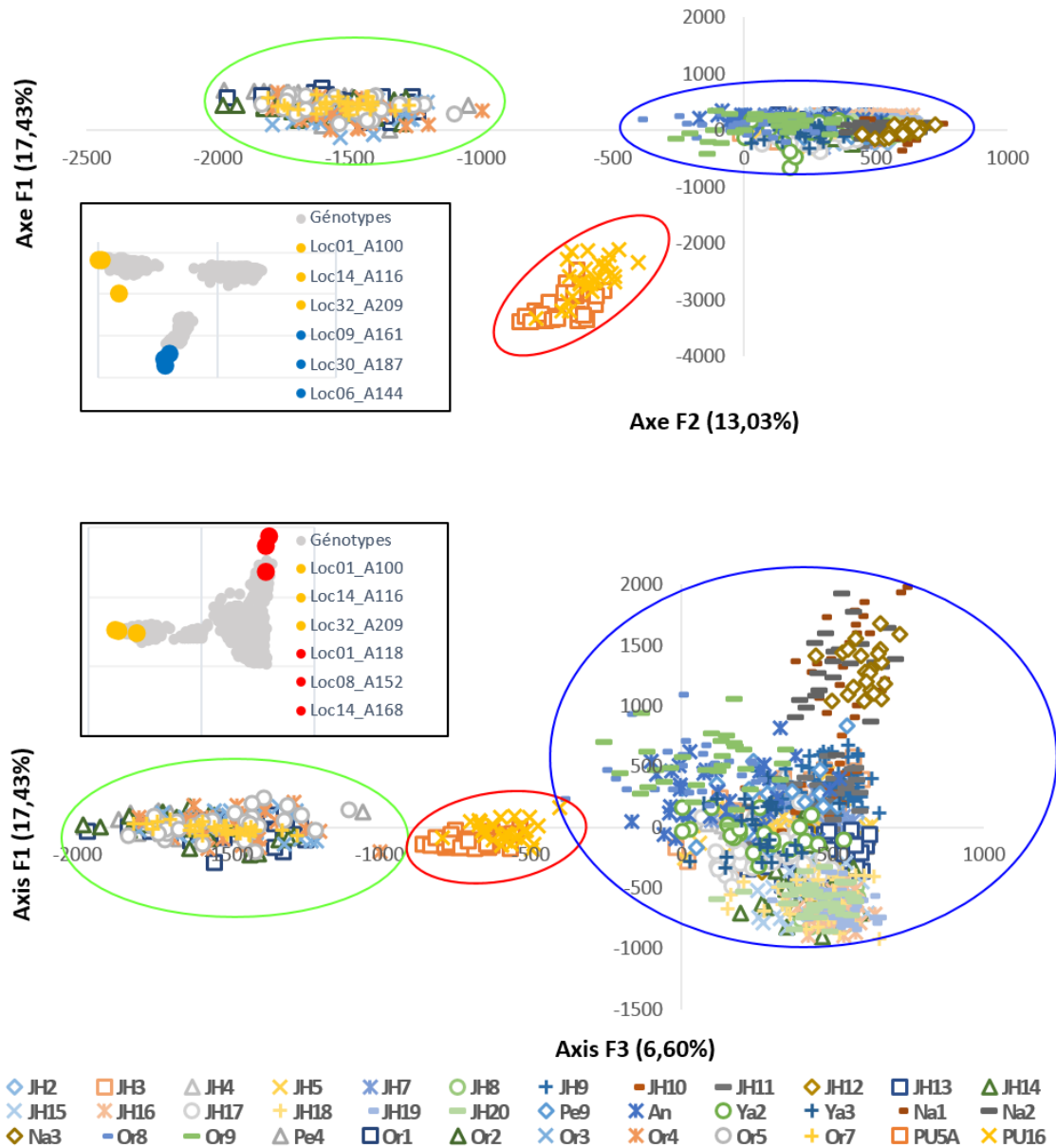


Figure 11. Projection sur les plans factoriels 1-2 (en haut) et 1-3 (en bas) des génotypes des 1170 individus (10 locus microsatellites) provenant des 36 popsites échantillonnées d'*Apistogramma agassizii* dans la région du Loreto (Pérou). Chaque popsité est identifiée par un code couleur et un symbole. L'ellipse bleue entoure les génotypes des individus du groupe 1 (JH2, JH3, JH4, JH5, JH7, JH8, JH9, JH10, JH11, JH12, JH13, JH14, JH15, JH16, JH17, JH18, JH19, JH20, Pe9, An, Ya2, Ya3, Na1, Na2, Na3, Or8 et Or9), la verte ceux du groupe 2 (Pe4, Or1, Or2, Or3, Or4, Or5, et Or7) et la rouge ceux du groupe 3 (PU5A et PU16). Dans l'encadré en bas à gauche est représenté en gris le nuage de points des génotypes des 1170 individus et pour chaque axe factoriel les trois allèles ayant les plus fortes contributions (en jaune pour F1, bleu pour F2 et rouge pour F3). Loc « X » = nom du locus et A « X » = taille de l'allèle.

Les individus appartenant à une même popsité sont toujours regroupés dans un même groupe (nuage de points). Les popsites JH2, JH3, JH4, JH5, JH7, JH8, JH9, JH10, JH11, JH12, JH13, JH14, JH15, JH16, JH17, JH18, JH19, JH20, Pe9, An, Ya2, Ya3, Na1, Na2, Na3, Or8 et Or9 constituent le groupe 1 (Bleu); le groupe 2 (Vert) est constitué par les popsites Pe4, Or1, Or2, Or3, Or4, Or5, et Or7; et le groupe 3 (Rouge) par les popsites PU5A et PU16. Les trois allèles ayant la plus forte contribution sur chacun des axes factoriels 1 et 2 ont des fréquences élevées dans au moins un des 3 groupes (**Tableau 3a**). Pour

chacun des 10 locus, au moins un allèle a une forte fréquence dans un seul des 3 groupes (freq. >0.5, **Tableau 3b**), à l'exception des allèles 100 et 142 des locus 01 et 16 dont les fréquences sont supérieures à 0,5 dans 2 groupes : le groupe 2 et le 3. Les allèles 161 (Locus 09) et 123 (locus 11) sont semi-diagnostiques (non fixé dans le groupe) des groupes 3 et 1 respectivement.

Tableau 3: a) Fréquences des allèles ayant la plus forte contribution sur les axes F1 et F2 de l'analyse factorielle des correspondances (AFC) à l'intérieur de chacun des groupes et **b)** allèles ayant une fréquence allélique > 0,5 pour ou moins un des trois groupes. Le groupe 1 est composé par les popsites: JH2, JH3, JH4, JH5, JH7, JH8, JH9, JH10, JH11, JH12, JH13, JH14, JH15, JH16, JH17, JH18, JH19, JH20, An, Pe9, Ya2, Ya3, Na1, Na2, Na3, Or8, Or9; groupe 2: Pe4, Or1, Or2, Or3, Or4, Or5, Or7 et groupe 3: PU5A, PU16.

a)			Fréquences		
Locus	Allèle	Axe	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Loc01	100	F1	-----	0,5049	0,9182
Loc14	116	F1	0,0072	0,7937	-----
Loc32	209	F1	0,0022	0,6401	0,0273
Loc09	161	F2	-----	-----	0,4091
Loc06	144	F2	0,0006	0,0048	0,5648
Loc30	187	F2	0,0045	0,0048	0,8364
b)			Fréquences ≥ 0,5		
Locus	Allèle	Axe	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Loc01	100		-----	0,5049	0,9182
Loc06	138		0,0628	0,6014	-----
Loc06	144		0,0006	0,0048	0,5648
Loc08	138		0,1195	0,0558	0,7909
Loc09	129		0,5209	0,1293	-----
Loc09	131		0,2863	0,6024	-----
Loc11	123		0,7099	-----	-----
Loc11	127		0,0655	0,5145	-----
Loc11	137		0,0040	0,0942	0,5833
Loc14	116		0,0074	0,7937	-----
Loc16	142		0,2649	0,9082	0,9364
Loc16	144		0,5676	0,0024	0,0455
Loc28	196		0,1020	-----	0,9727
Loc28	200		0,0353	0,5631	-----
Loc30	187		0,0045	0,0048	0,8364
Loc32	201		0,2035	-----	0,6636
Loc32	203		0,5609	-----	0,3091
Loc32	209		0,0023	0,6401	0,0273

Le dendrogramme des distances génétiques confirme la présence de trois groupes génétiques (**Figure 12**), les mêmes qui ont été identifiés à partir de l'AFC (**Figure 11**). Le groupe 2 est supporté par une valeur de bootstrap de 93 et le groupe 3 par une valeur de 98. Les groupes 2 et 3 sont soutenus par une valeur de bootstrap de 84. Le groupe 1 est très structuré, certaines popsites sont très différenciées. Tel est le cas pour les popsites Na1, Na2 et Na3, qui forment un ensemble soutenu par une valeur de bootstrap de 97. Un autre ensemble est formé par les popsites JH15, JH19 et JH16 soutenu par une valeur de bootstrap de 70. Les popsites JH12, JH13, JH20, JH18 et JH8 en forment un autre, soutenu par une valeur de bootstrap de 69.

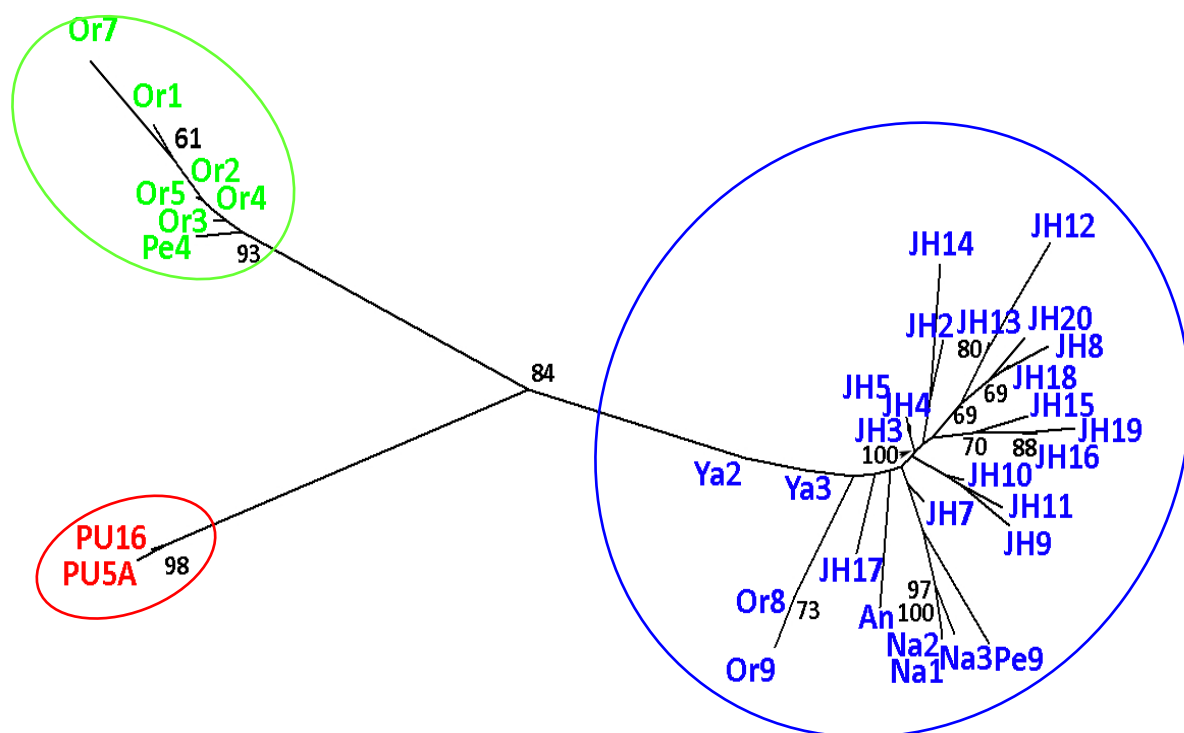
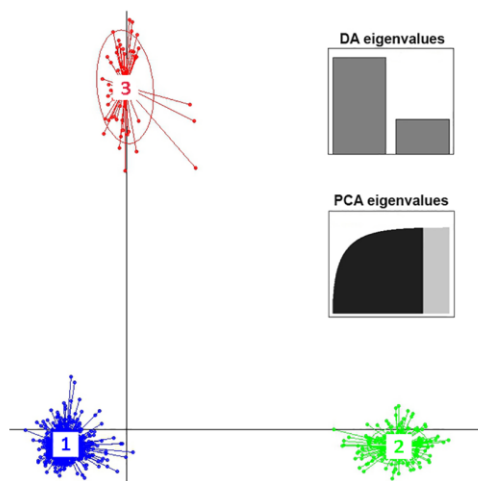


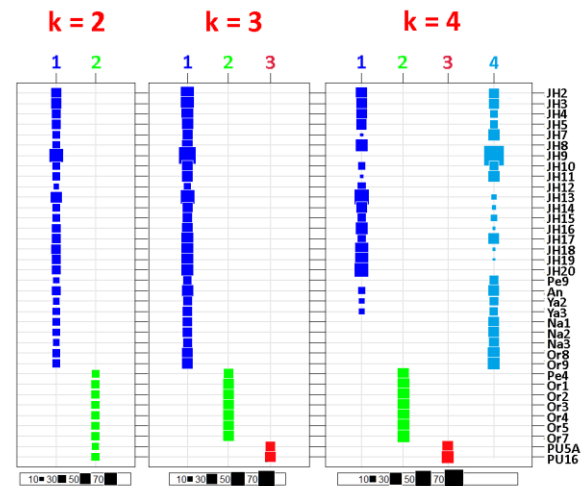
Figure 12. Dendrogramme non raciné des distances génétiques des 36 popsites (1170 individus) génotypés sur 10 locus microsatellites, construit à partir d'un arbre de neighbor joining et d'une distance de Nei (1972). Les codes aux extrémités des branches correspondent aux popsites, les valeurs sur les nœuds correspondent à celles des bootstraps ≥ 60 . Le code couleur: bleu, vert et rouge des elipses et des popsites correspond aux groupes 1, 2 et 3 identifiés sur l'AFC.

L'AFC et le dendrogramme des distances génétiques concordent, les données sont organisées en trois groupes. Pour $k = 3$, la méthode DAPC montre aussi trois clusters distincts bien différenciés. Cette structuration en trois clusters correspond aux plus petites unités totalement disjointes (tous les individus d'une popsité appartiennent à un seul cluster) (**Figure 13a**). Les valeurs de réassignations obtenues à partir de l'ADCP donnent pour chacun des trois clusters une valeur de 1 (100% des individus ont été réassignés à leur cluster *a priori*). Les structurations par $k = 2, 3$ et 4 montrent différents niveaux de hiérarchisation, un premier niveau d'organisation pour $k = 2$. Les popsites du cluster 2 (vert) du niveau de hiérarchisation de $k = 2$ se répartissent ensuite en deux clusters pour $k = 3$, puis pour $k = 4$ il y a à la fois des popsites et des individus du cluster 1 (bleu) qui se répartissent dans deux nouveaux clusters. On constate donc qu'à partir de $k = 4$, la hiérarchisation des données génétique n'est plus seulement liée directement à la géographie, les individus de certaines popsites se répartissant dans des clusters distincts. Les trois clusters mis en évidence par la méthode DAPC correspondent donc à 3 clusters totalement disjointes, identiques aux trois groupes mis en évidence précédemment par l'AFC et par le dendrogramme des distances génétique. Les niveaux de hiérarchisations pour $k = 2$ et $k = 3$ identifiés par la méthode DAPC sont cohérent avec la structure observée sur le dendrogramme de distances génétiques.

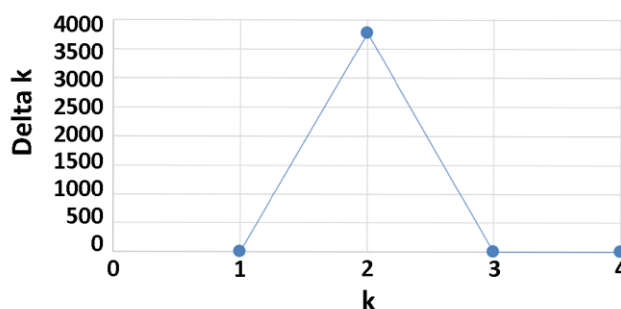
a) **Analyse discriminante en composante principale**



Tableaux de contingence



b) **Nombre de clusters en fonction de la valeur du Delta K**



Assignment des individus

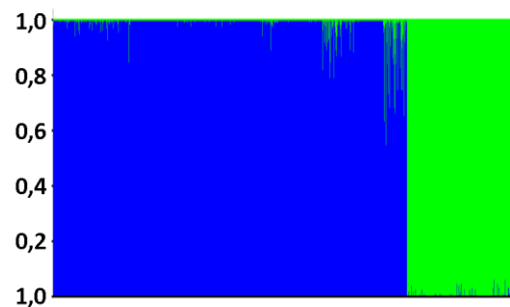


Figure 13. a) À gauche, nuage de points de l'analyse discriminante en composante principale (ADPC) dans l'espace discriminant 1-2 pour $k = 3$, obtenu à partir des génotypes microsatellites de 1170 individus pour 10 locus et provenant de 36 popsites d'*Apistogramma agassizii* échantillonnées dans le Loreto (Pérou). Chaque cluster est identifiable par le même code couleur utilisé précédemment dans l'AFC (bleu, vert et rouge). Les points représentent les individus et les ellipses l'inertie des clusters. À droite, distribution des individus de chaque popsite pour $k = 2, 3$ et 4. La taille des carrés est proportionnelle au nombre d'individus **b)** Résultats issus du logiciel STRUCTURE, à gauche, nombre de clusters en fonction de la valeur du Delta k d'après la formule définie par Evanno et al. (2005). La valeur de chaque Delta k a été obtenue à partir de 20 itérations. À droite probabilité d'assignation des 1170 individus pour $k = 2$ d'après la plus grande valeur obtenue pour Delta K .

Alors que tous les tests réalisés sur l'organisation des données (AFC, dendrogramme des distances génétiques, DAPC) concordent pour une structure en 3 entités, STRUCTURE donne un autre résultat : les données seraient organisées en deux clusters (**Figure 13b**). La structuration trouvée par STRUCTURE pour $k=2$ est identique à celle trouvée par la méthode DAPC pour $K = 2$. En revanche, la méthode STRUCTURE ne permet pas d'identifier de structure pour $k = 3$. De plus, si pour chaque itération de $k = 3$ on observe la composition des clusters on constate qu'elle change énormément entre itérations (**Figure 14**).

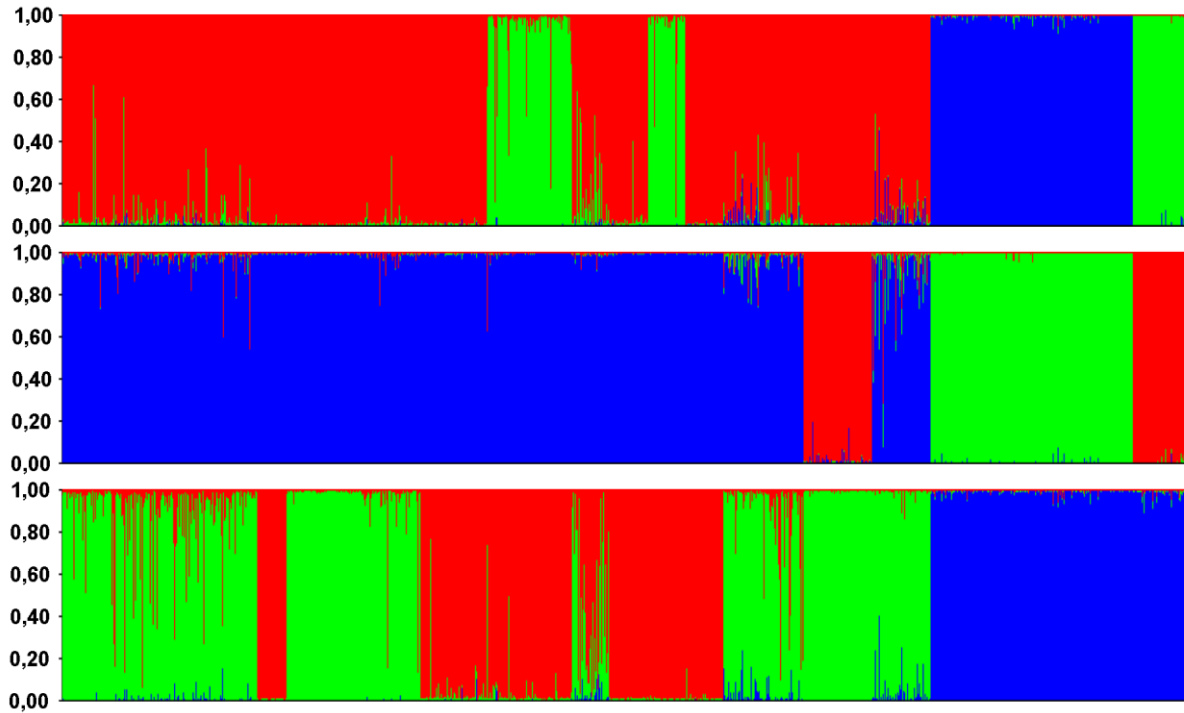


Figure 14. Exemple de différentes configurations de clusters obtenus entre différentes itérations pour $k = 3$ avec le programme STRUCTURE à partir des génotypes microsatellites de 1170 individus pour 10 locus et provenant de 36 popsites d'*Apistogramma aqassizii* échantillonnées dans le Loreto (Pérou).

Il est important de souligner que les auteurs de la méthode DAPC ont observé le même phénomène en comparant les deux méthodes : il semblerait que STRUCTURE soit moins performante que DAPC pour démêler les niveaux de hiérarchisation des données. La structuration en 3 unités reproductives d'après la méthode DAPC a donc été retenue. Ces 3 unités reproductives ont un sens géographique, l'unité 1 (en bleu) regroupe 27 popsites, elle a la plus large distribution dans la zone d'étude (**Figure 15**), elle s'étend sur la rive gauche de la rivière Marañon et les rives droites de la rivière Ucayali et du fleuve Amazone. Les deux autres unités ont des aires de distributions beaucoup plus réduites dans la zone échantillonnée. L'une regroupe 7 popsites, elle est distribuée dans les systèmes des rivières Ampiyacu et Apayacu (vert), l'autre regroupe 2 popsites, elle est présente dans la rivière Nanay (rouge) (**Figure 15**). Ces 3 unités reproductives sont isolées génétiquement et géographiquement, elles correspondent probablement à 3 « espèces génotypiques ». Elles seront appelées par la suite Sp1 (unité 1), Sp2 (unité 2) et Sp3 (unité 3). Les valeurs de F_{ST} entre les trois unités sont comprises entre 0,26 et 0,40 (Sp1 vs Sp2 : 0,26 ; Sp1 vs Sp3 : 0,31 ; Sp2 vs Sp3 : 0,40).

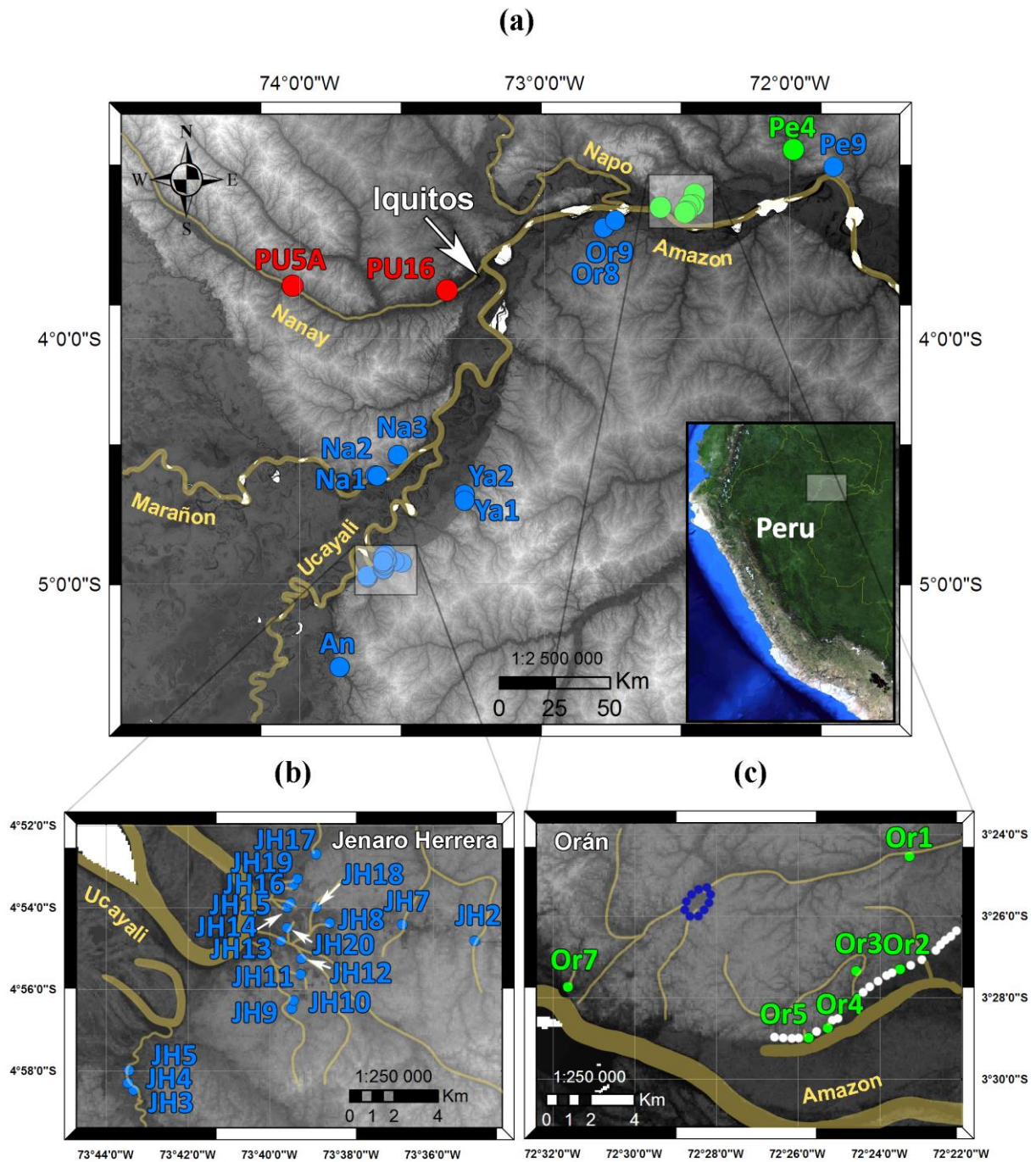


Figure 15 : Carte d'élévation de, **a)** la zone d'échantillonnage (Loreto (Pérou)) des 36 sites de collecte (popsites), **b)** la zone d'échantillonnage dans la région de Jenaro Herrera et **c)** la zone d'échantillonnage dans la région de Orán. Le cercle en pointillés bleu foncé désigne la zone de connexion entre différents microbassins. Les pointés en blanc désignent la zone où l'on rencontre des corps d'eau similaires à des ravines. Les dégradés de gris correspondent aux changements d'altitude, les parties claires correspondent aux zones hautes, en foncé aux zones basses. Sp1 en bleu, Sp2 en vert et Sp3 en rouge.

C. I. 3. Différenciation génétique dans Sp1, Sp2 et Sp3

Les valeurs de l'estimateur θ du F_{ST} par paire de popsites à l'intérieur de Sp1 sont comprises entre 0,00 et 0,36 (**Tableau 4**). Sur les 351 paires de comparaisons, toutes sont significatives ($p\text{-value} < 0,01$) à l'exception de 4 valeurs qui correspondent aux paires de comparaisons entre les popsites JH3, JH4 et JH5 et celle entre Na1 et Na2. Les popsites Na1, Na2 d'une part et Na3 d'autre part, sont les plus différenciées.

En ce qui concerne Sp2 (vert), les valeurs de l'estimateur θ du F_{ST} par paires de comparaisons sont comprises entre 0,00 et 0,33 (**Tableau 5**). Sur les 21 paires de comparaisons toutes sont significatives ($p\text{-value} < 0,01$) excepté entre Or2 et Or5. La popsite Or7 est la plus différenciée à l'intérieur de Sp2.

Pour Sp3, la valeur du F_{ST} entre les deux popsites est significative ($p\text{-value} < 0,01$), elle est de 0,10.

Tableau 4. Valeurs par paires de comparaisons de l'estimateur θ du F_{ST} de Weir et Cockerham (1984) entre les 27 popsites de Sp1. Les valeurs de F_{ST} surlignées en vert sont $< 0,05$; $0,05 \leq$ jaune $< 0,15$; $0,15 \leq$ orange $< 0,25$ et bleu $\geq 0,25$. Les valeurs non surlignées ne sont pas significatives, les autres sont toutes significatives ($p\text{-value} < 0,01$).

	JH3	JH4	JH5	JH7	JH8	JH9	JH10	JH11	JH12	JH13	JH14	JH15	JH16	JH17	JH18	JH19	JH20	Pe9	An	Ya2	Ya3	Na1	Na2	Na3	Or8	Or9
JH2	0,08	0,07	0,08	0,07	0,16	0,14	0,08	0,12	0,22	0,12	0,12	0,15	0,14	0,14	0,14	0,18	0,16	0,19	0,13	0,16	0,11	0,24	0,24	0,21	0,17	0,18
JH3	-----	0,00	0,00	0,05	0,11	0,08	0,03	0,06	0,13	0,07	0,11	0,08	0,08	0,06	0,09	0,10	0,12	0,13	0,06	0,07	0,05	0,19	0,18	0,16	0,08	0,09
JH4	0,00	-----	0,00	0,05	0,12	0,09	0,03	0,06	0,15	0,08	0,11	0,08	0,09	0,07	0,09	0,11	0,11	0,13	0,07	0,08	0,05	0,19	0,19	0,17	0,10	0,11
JH5	0,00	0,00	-----	0,05	0,12	0,10	0,04	0,08	0,14	0,07	0,11	0,08	0,09	0,07	0,10	0,11	0,12	0,13	0,07	0,08	0,05	0,20	0,20	0,18	0,09	0,10
JH7	0,05	0,05	0,05	-----	0,18	0,08	0,06	0,09	0,20	0,11	0,15	0,10	0,12	0,10	0,15	0,16	0,17	0,13	0,09	0,12	0,08	0,18	0,17	0,15	0,11	0,13
JH8	0,11	0,12	0,12	0,18	-----	0,20	0,14	0,19	0,17	0,13	0,21	0,18	0,18	0,18	0,05	0,19	0,10	0,24	0,20	0,20	0,18	0,32	0,32	0,32	0,21	0,21
JH9	0,08	0,09	0,10	0,08	0,20	-----	0,05	0,07	0,22	0,14	0,2	0,13	0,15	0,13	0,17	0,18	0,21	0,17	0,13	0,14	0,13	0,18	0,18	0,18	0,12	0,15
JH10	0,03	0,03	0,04	0,06	0,14	0,05	-----	0,05	0,16	0,09	0,13	0,10	0,09	0,09	0,12	0,12	0,14	0,16	0,10	0,12	0,09	0,20	0,20	0,19	0,12	0,13
JH11	0,06	0,06	0,08	0,09	0,19	0,07	0,05	-----	0,20	0,12	0,19	0,13	0,12	0,13	0,16	0,15	0,21	0,17	0,11	0,13	0,11	0,21	0,21	0,20	0,15	0,16
JH12	0,13	0,15	0,14	0,20	0,17	0,22	0,16	0,20	-----	0,09	0,24	0,18	0,18	0,22	0,16	0,18	0,21	0,31	0,20	0,24	0,21	0,35	0,34	0,36	0,21	0,22
JH13	0,07	0,08	0,07	0,11	0,13	0,14	0,09	0,12	0,09	-----	0,16	0,12	0,14	0,13	0,10	0,17	0,13	0,17	0,12	0,15	0,11	0,25	0,25	0,22	0,15	0,15
JH14	0,11	0,11	0,11	0,15	0,21	0,20	0,13	0,19	0,24	0,16	-----	0,17	0,13	0,15	0,17	0,16	0,19	0,20	0,14	0,16	0,13	0,30	0,29	0,26	0,18	0,22
JH15	0,08	0,08	0,08	0,10	0,18	0,13	0,10	0,13	0,18	0,12	0,17	-----	0,09	0,12	0,13	0,11	0,19	0,20	0,13	0,14	0,11	0,25	0,24	0,23	0,15	0,16
JH16	0,08	0,09	0,09	0,12	0,18	0,15	0,09	0,12	0,18	0,14	0,13	0,09	-----	0,15	0,16	0,05	0,19	0,21	0,14	0,16	0,14	0,27	0,26	0,27	0,18	0,19
JH17	0,06	0,07	0,07	0,10	0,18	0,13	0,09	0,13	0,22	0,13	0,15	0,12	0,15	-----	0,14	0,18	0,15	0,14	0,10	0,07	0,08	0,24	0,24	0,22	0,12	0,14
JH18	0,09	0,09	0,10	0,15	0,05	0,17	0,12	0,16	0,16	0,10	0,17	0,13	0,16	0,14	-----	0,17	0,08	0,19	0,16	0,14	0,13	0,28	0,27	0,27	0,18	0,20
JH19	0,10	0,11	0,11	0,16	0,19	0,18	0,12	0,15	0,18	0,17	0,16	0,11	0,05	0,18	0,17	-----	0,22	0,24	0,17	0,18	0,16	0,30	0,29	0,30	0,19	0,20
JH20	0,12	0,11	0,12	0,17	0,10	0,21	0,14	0,21	0,21	0,13	0,19	0,19	0,19	0,15	0,08	0,22	-----	0,23	0,18	0,20	0,18	0,35	0,34	0,33	0,23	0,24
Pe9	0,13	0,13	0,13	0,13	0,24	0,17	0,16	0,17	0,31	0,17	0,20	0,20	0,21	0,14	0,19	0,24	0,23	-----	0,13	0,15	0,12	0,24	0,23	0,22	0,17	0,19
An	0,06	0,07	0,07	0,09	0,20	0,13	0,10	0,11	0,20	0,12	0,14	0,13	0,14	0,10	0,16	0,17	0,18	0,13	-----	0,11	0,08	0,24	0,23	0,20	0,10	0,12
Ya2	0,07	0,08	0,08	0,12	0,20	0,14	0,12	0,13	0,24	0,15	0,16	0,14	0,16	0,07	0,14	0,18	0,20	0,15	0,11	-----	0,04	0,28	0,27	0,25	0,10	0,13
Ya3	0,05	0,05	0,05	0,08	0,18	0,13	0,09	0,11	0,21	0,11	0,13	0,11	0,14	0,08	0,13	0,16	0,18	0,12	0,08	0,04	-----	0,26	0,25	0,21	0,08	0,10
Na1	0,19	0,19	0,20	0,18	0,32	0,18	0,20	0,21	0,35	0,25	0,30	0,25	0,27	0,24	0,28	0,30	0,35	0,24	0,24	0,28	0,26	-----	0,00	0,16	0,24	0,26
Na2	0,18	0,19	0,20	0,17	0,32	0,18	0,20	0,21	0,34	0,25	0,29	0,24	0,26	0,24	0,27	0,29	0,34	0,23	0,23	0,27	0,25	0,00	-----	0,15	0,23	0,26
Na3	0,16	0,17	0,18	0,15	0,32	0,18	0,19	0,20	0,36	0,22	0,26	0,23	0,27	0,22	0,27	0,30	0,33	0,22	0,20	0,25	0,21	0,16	0,15	-----	0,22	0,25
Or8	0,08	0,10	0,09	0,11	0,21	0,12	0,12	0,15	0,21	0,15	0,18	0,15	0,18	0,12	0,18	0,19	0,23	0,17	0,10	0,10	0,08	0,24	0,23	0,22	-----	0,02
Or9	0,09	0,11	0,10	0,13	0,21	0,15	0,13	0,16	0,22	0,15	0,22	0,16	0,19	0,14	0,20	0,20	0,24	0,19	0,12	0,13	0,10	0,26	0,26	0,25	0,02	-----

Tableau 5. Valeurs par paires de comparaisons de l'estimateur θ du F_{ST} de Weir et Cockerham (1984) entre les 7 popsites de Sp2. Les valeurs de F_{ST} surlignées en vert sont $< 0,05$; $0,05 \leq$ jaune $< 0,15$; $0,15 \leq$ orange $< 0,25$ et bleu $\geq 0,25$. Les valeurs non surlignées ne sont pas significatives, les autres sont toutes significatives $p\text{-value} < 0,01$.

	Pe4	Or1	Or2	Or3	Or4	Or5	Or7
Pe4	----	0,13	0,08	0,12	0,08	0,07	0,33
Or1	0,13	----	0,07	0,11	0,06	0,07	0,23
Or2	0,08	0,07	----	0,05	0,01	0,00	0,27
Or3	0,12	0,11	0,05	----	0,03	0,04	0,28
Or4	0,08	0,06	0,01	0,03	----	0,02	0,21
Or5	0,07	0,07	0,00	0,04	0,02	----	0,26

Après les premières analyses réalisées sur les génotypages, nous avons appris par un pêcheur de poissons ornementaux que la popsité Pe9 (Sp1) avait pour origine une introduction d'individus dans la zone de distribution de Sp2 (**Figure 15**), introduction confirmée par Römer (pers. com.), nous avons donc retiré cette popsité des prochaines analyses afin de ne pas « brouiller » l'information relative à l'évolution des *Apistogramma agassizii* dans la région.

C. I. 4. Polymorphisme des séquences COI et Cytb concaténées de Sp1, Sp2 et Sp3

Sur les 35 popsites, aucune séquence (COI et Cytb) n'a pu être obtenue pour les individus de la popsité « An » de Sp1. Il s'agit de la seule popsité qui n'a pas été échantillonnée pendant la thèse, elle a été échantillonnée en 2008 par Carlos Santillan et Antonia Vela Díaz, et a été probablement mal conservée dans la collection.

Considérés séparément, la longueur de chaque fragment est de 924 pb (paires de bases) pour le COI et 714 pb pour le Cytb. Le nombre de sites nucléotidiques variables pour le COI est de 22 (15 haplotypes sur 63 séquences) pour Sp1, 5 sites (5 haplotypes sur 22 séquences) pour Sp2 et 3 sites (4 haplotypes sur 19 séquences) pour Sp3. Le nombre de sites variables pour le Cyt b est de 27 (14 haplotypes sur 64 séquences) pour Sp1, 13 sites (11 haplotypes sur 22 séquences) pour Sp2 et 2 sites (3 haplotypes sur 20 séquences) pour Sp3.

Au total, 104 séquences concaténées d'une longueur de 1638 pb ont été obtenues. Sur les 63 séquences analysées pour Sp1, on observe 23 haplotypes ($Hd(\sigma) = 0,868 \pm 0,035$, $\pi(\sigma) = 0,005 \pm 7,3 \times 10^{-4}$), pour Sp2 il y a 22 séquences correspondant à 15 haplotypes ($Hd(\sigma) = 0,948 \pm 0,030$, $\pi(\sigma) = 0,002 \pm 1,9 \times 10^{-4}$) et pour Sp3 il y a 19 séquences correspondant à 6 haplotypes ($Hd(\sigma) = 0,766 \pm 0,072$, $\pi(\sigma) = 0,001 \pm 1,4 \times 10^{-4}$) (**Tableau 6**). Avec une valeur moyenne de différenciation nucléotidique par paires de séquences (K) de 8,424, Sp1 est l'unité la plus différenciée (Sp2, K= 3,052 et Sp3, K=1,193).

Tableau 6. Polymorphisme des séquences concaténées (COI + Cytb) pour Sp1, Sp2 et Sp3 dans *Apistogramma cf. agassizii*.

	Sp1	Sp2	Sp3
Nombre de séquences (N)	63	22	19
Nombre d'haplotypes (H)	23	15	6
Nombre total de sites	1638	1638	1638
Nombre total de sites polymorphes	49	18	5
Diversité haplotypique (Hd) $\pm$ SD(Hd)	0,868 $\pm$ 0,035	0,948 $\pm$ 0,030	0,766 $\pm$ 0,072
Diversité nucléotidique (π) $\pm$ SD(π)	0,005 $\pm$ 7,3x10 ⁻⁴	0,002 $\pm$ 1,9x10 ⁻⁴	0,001 $\pm$ 1,4x10 ⁻⁴
Différenciation nucléotidique moyenne par paire de séquences (K)	8,424	3,052	1,193

C. I. 5. Relations phylogénétiques entre Sp1, Sp2 et Sp3

L'arbre de maximum de vraisemblance a été construit à partir des haplotypes et raciné avec deux groupes externes *A. eremnopyge* et *A. bitaeniata* (**Figure 16**). Il est construit en utilisant le meilleur modèle évolutif sélectionné selon le critère d'Akaike corrigé (**AICc**) de Burnham et Anderson (2004), TN93+G (Log likelihood = -3223,99 ; paramètre gamma = 0,4314 (5 catégories +G), ratio transition/transversion = 7,2864).

Les trois « espèces » (Sp1, Sp2 et Sp3) mises en évidence par la méthode DAPC selon leurs génotypes, correspondent aussi à trois clades monophylétiques (**Figure 16**). Chacun des trois clades est soutenu par une valeur de bootstrap de 100. D'après la topologie de l'arbre, la lignée ayant formée Sp1 serait sœur de la lignée constituée par les clades Sp2 et Sp3. Les trois « espèces » auraient commencé à diverger de leur ancêtre commun le plus récent (**MRCA**) il y a entre 1,83 Ma (Datation Fossile des Cichlidés, **DFC**) et 5,31 Ma (Datation selon la Fragmentation du Gondwana, **DFG**). Les « espèces » Sp2 et Sp3 auraient commencé à diverger de leur MRCA il y a 1,50 Ma (DFC) et 4,34 (DFG). L'espèce Sp1 est composée de deux haplotypes basaux et de trois clades. L'haplotype le plus basal (Hap. 23), correspondrait exclusivement aux popsites Na1, 2 et 3 de la région de la rivière Marañon (**Figure 15**). Cet haplotype aurait commencé à diverger du MRCA avec les autres haplotypes de Sp1 il y a entre 0,79 (DFC) et 2,28 Ma (DFG). Puis l'haplotype 22, qui semble être spécifique aux haplotypes des popsites Or8 et Or9 (**Figure 15**), aurait commencé à diverger du MRCA avec les trois clades de Sp1 il y a entre 0,79 (DFC) et 2,28 Ma (DFG). Les trois clades de Sp1 auraient commencé à diverger de leur MRCA il y a entre 0,26 Ma (DFC) et 0,74 Ma (DFG).

Mise en évidence d'au moins trois « espèces » dans *Apistogramma agassizii*

Les analyses mitochondriales et nucléaires mettent en évidence 3 unités évolutives isolées génétiquement selon au moins deux concepts de l'espèce : 1) regroupement des individus en un cluster génotypique, 2) monophylétisme, et unité reproductive qui pourrait être le résultat d'un isolement à la reproduction.

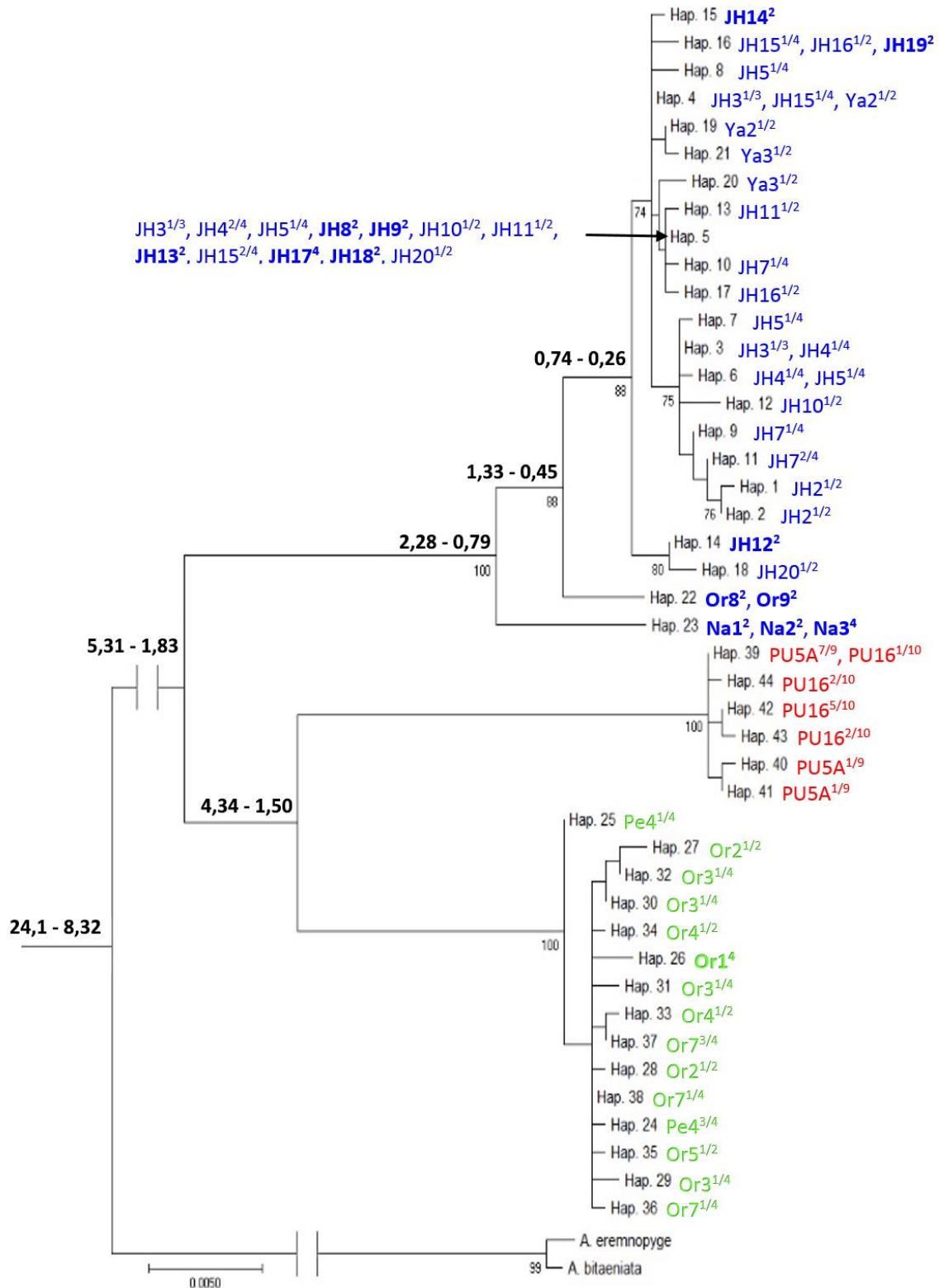


Figure 16. Arbre du maximum de vraisemblance des séquences concaténées du COI et du Cyt b (1638 pb) de 44 haplotypes provenant de 63 individus de Sp1, 22 individus de Sp2 et 19 de Sp3 raciné avec deux groupes externes *A. eremnopyge* et *A. bitaeniata* en utilisant le modèle TN93+G (Log likelihood = -3223,99). Le code couleur utilisé est le même que sur les figures précédentes. Les valeurs en gras au dessus des nœuds correspondent aux dates de divergences obtenues d'après les calibrations issues de Genner et al. (2007), la valeur à gauche considère l'origine des cichlidés antérieure à la fragmentation du Gondwana et celle de droite considère une calibration fossile des cichlidés.

C. I. 6. Variation de couleur entre Sp1, Sp2 et Sp3

Ces 3 unités évolutives ont des aires de distributions différentes et semblent, *a posteriori* de leur identification génétique, se distinguer par des critères morphométriques variables mais reproductibles, notamment les patrons de coloration de leur nageoire caudale (**Figure 17**). En effet, les mâles de Sp1 ont une bande bleue (blanche sur l'image) en forme de "V" entre deux bandes foncées relativement larges (distales et proximales) sur la partie submarginale de la caudale. Par effet de contraste la bande bleue est particulièrement visible chez les morphotypes « jaune-orangé ».

Pour Sp2, la bande bleue en forme de « V » est généralement plus irrégulière chez les individus bleus par rapport à Sp1 et elle est même souvent absente chez le morphotype « jaune-orangé ». Tous les mâles bleus ont des motifs bleus « en dentelle » très bien définis sur la partie centrale et proximale de la nageoire caudale qui ont tendance à se confondre avec la bande bleue en forme de « V ». Les individus de Sp2 ne présentent qu'une seule bande sombre sur la partie distale de la nageoire caudale. Ces motifs bleus sont généralement absents ou tachetés pour le morphotype « jaunes-orangé ».

Dans Sp3, pour le morphotype « bleu », la bande bleue en forme de "V" semble toujours être présente, elle est mince, droite et se trouve généralement entre deux bandes sombres et minces (distale et proximale). Alors que pour le morphotype « jaune », la bande bleue peut être absente et la bande sombre proximale est toujours absente. Pour le morphotype « bleu » les motifs bleus de la partie centrale et proximale de la caudale sont diffus et ont tendance à suivre les rayons de la nageoire alors que pour le morphotype « jaunes-orangé », la couleur jaune-orangée est unie.

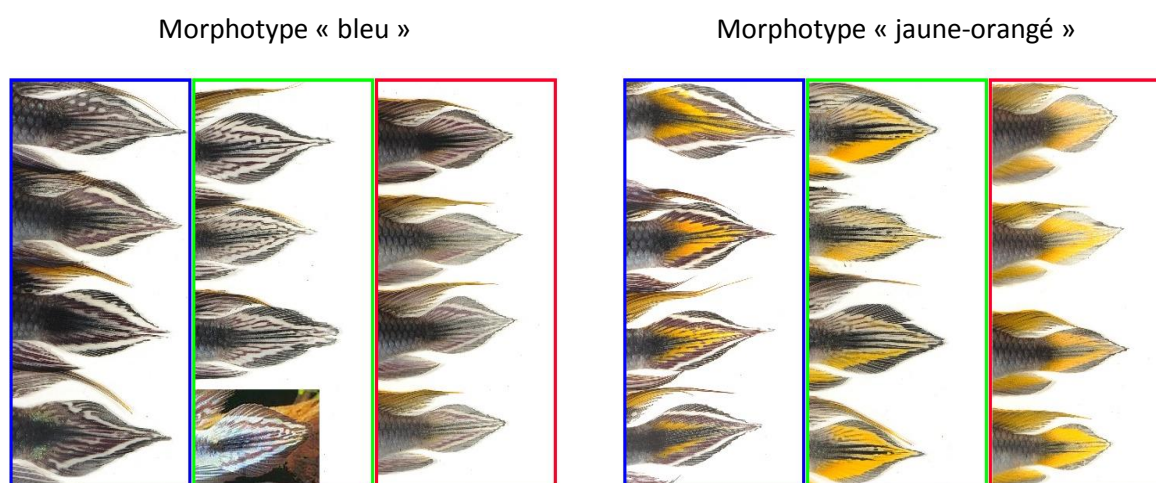


Figure 17. Photos de nageoires caudales de morphotypes « bleu » et « jaune-orangé » d'*Apistogramma agassizii* de Sp1, Sp2 et Sp3. Le code couleur utilisé pour les encadrés est le même que celui utilisé dans toutes les autres figures : bleu pour Sp1, vert pour Sp2 et rouge pour Sp3. La dernière image du morphotype "bleu" de Sp2 est celle d'un individu de la rivière Ampiyacu identifié par Koslowski (2002). Ces phénotypes spécifiques ont été identifiés *a posteriori* pour chacune des 3 espèces. L'échelle est les conditions dans lesquelles ont été prises les photographies sont les mêmes sur toutes les photos à part pour celle de Koslowski (2002)

C. II. LA VARIATION GENETIQUE A L'ECHELLE DES MICROBASSINS : mise en évidence de populations ou de proto espèces (espèces potentielles)

C. II. 1 Variation génétique à l'échelle des microbassins et des ruisseaux : mise en évidence de populations ou d'espèces dans *Apistogramma* Sp1

a) Choix de la méthode de « clustering »

La structuration génétique des 889 individus de Sp1 (26 popsites (sans Pe9)), s'est révélée particulièrement complexe. Les deux méthodes, DAPC et STRUCTURE, ont donné des résultats contrastés suite à la recherche de clusters. Dans un premier temps, en considérant l'ensemble des données. Pour DAPC, les valeurs du BIC les plus basses correspondent à des valeurs de k entre 16 et 18 selon les itérations (**Figure 18 a**).

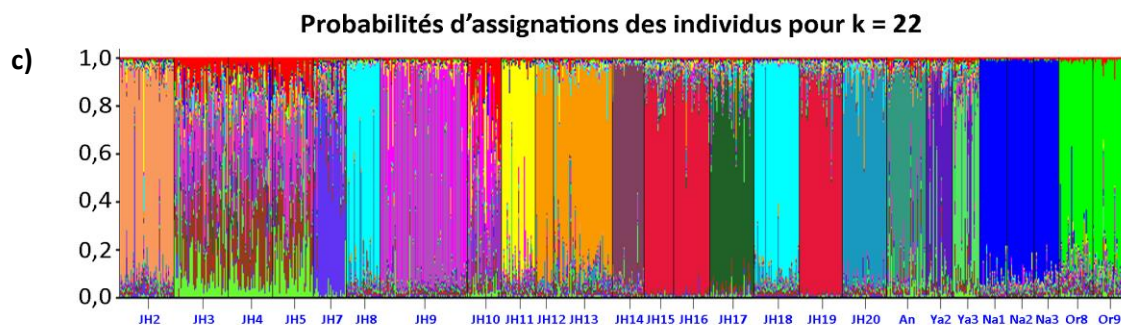
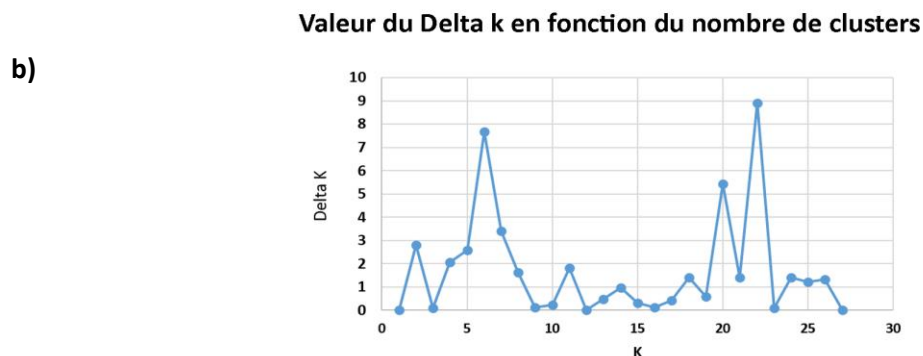
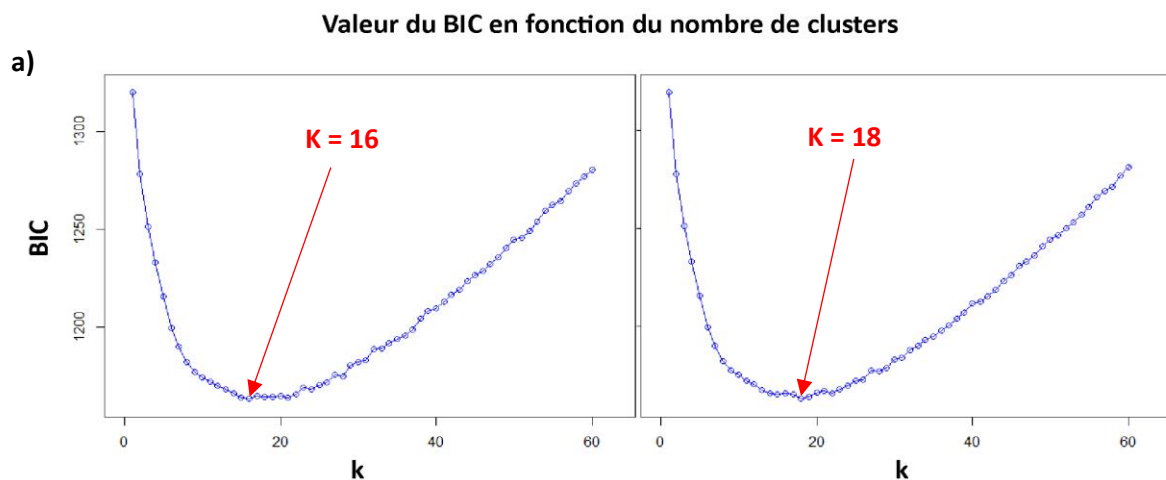


Figure 18. Recherche du nombre de clusters génétiques pour l'ensemble des données de Sp1 (889 individus, 10 locus microsatellites) **a)** avec DAPC, méthode de k-mean selon le critère d'inférence bayésien (BIC). **b)** avec STRUCTURE, mesure de la variation du delta k et **c)** histogramme des probabilités d'assignations des individus pour k = 22 (STRUCTURE).

Le fait que la valeur du BIC la plus basse ne corresponde pas à un changement net de pente de la courbe du BIC et que la valeur de k entre itérations soit volatile ne permet pas de statuer sur le nombre de cluster le plus adéquat. D'après les auteurs de la méthode (Jombart et al., 2010), ce type de résultats témoigne d'une hiérarchisation complexe des données. Pour la méthode structure, plusieurs sauts du delta k (calculé selon Evanno et al., 2005) sont identifiables en particulier deux, un pour $k = 6$ et $k = 22$ (**Figure 18b**). Lorsque l'on observe l'histogramme des assignations des individus pour $k=22$ qui correspond au saut le plus grand, les données semblent être structurées; cependant la courbe du Delta k ne nous permet pas de statuer sur un nombre fiable de clusters (**Figure 18c**). Toutefois, le dendrogramme des distances génétiques entre popsites, montre que les popsites s'organisent principalement par microbassins nommés de A à K (**Figure 19 et 20**). Le niveau microbassin semble donc correspondre à un niveau de hiérarchisation ayant une réalité biologique. Dans un deuxième temps, pour rechercher des unités panmictiques, les individus ont été regroupés par microbassin afin de rechercher les clusters à l'intérieur de chaque microbassin. Avant l'analyse de « clustering », sur les 11 microbassins (A à K) pour 6 bassins la panmixie ne pouvait pas être rejeté selon l'estimateur du F_{IS} et 5 présentaient un écart significatif (F_{IS} : B = 0,032* ; C = 0,059* , D = 0,116* , E = 0,116* , G = 0,078*), tous localisés dans la région de Jenaro Herrera. Les clusters génétiques les mieux différenciés et au plus proche de la panmixie ont donc été recherchés à l'intérieur de chacun de ces 5 microbassins en utilisant les deux méthodes de « clustering », DAPC et STRUCTURE.

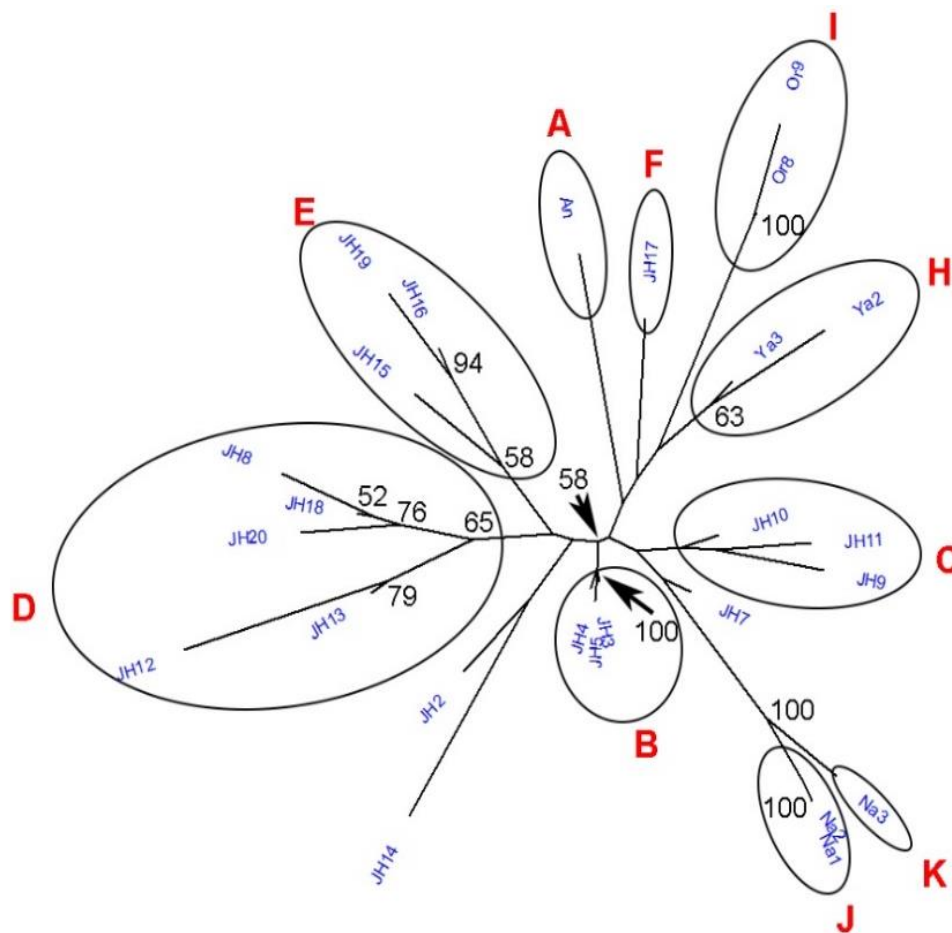


Figure 19 : Dendrogramme non raciné des distances génétiques des 26 popsites (889 individus) de Sp1 géotypés sur 10 locus microsatellites, construit à partir d'un arbre de neighbor joining et d'une distance de Nei (1972). Seules les valeurs de nœuds > à 50 sont indiquées. Les codes en bout de branches correspondent aux popsites et les enveloppes avec les lettres aux micros bassins de la **figure 20**.

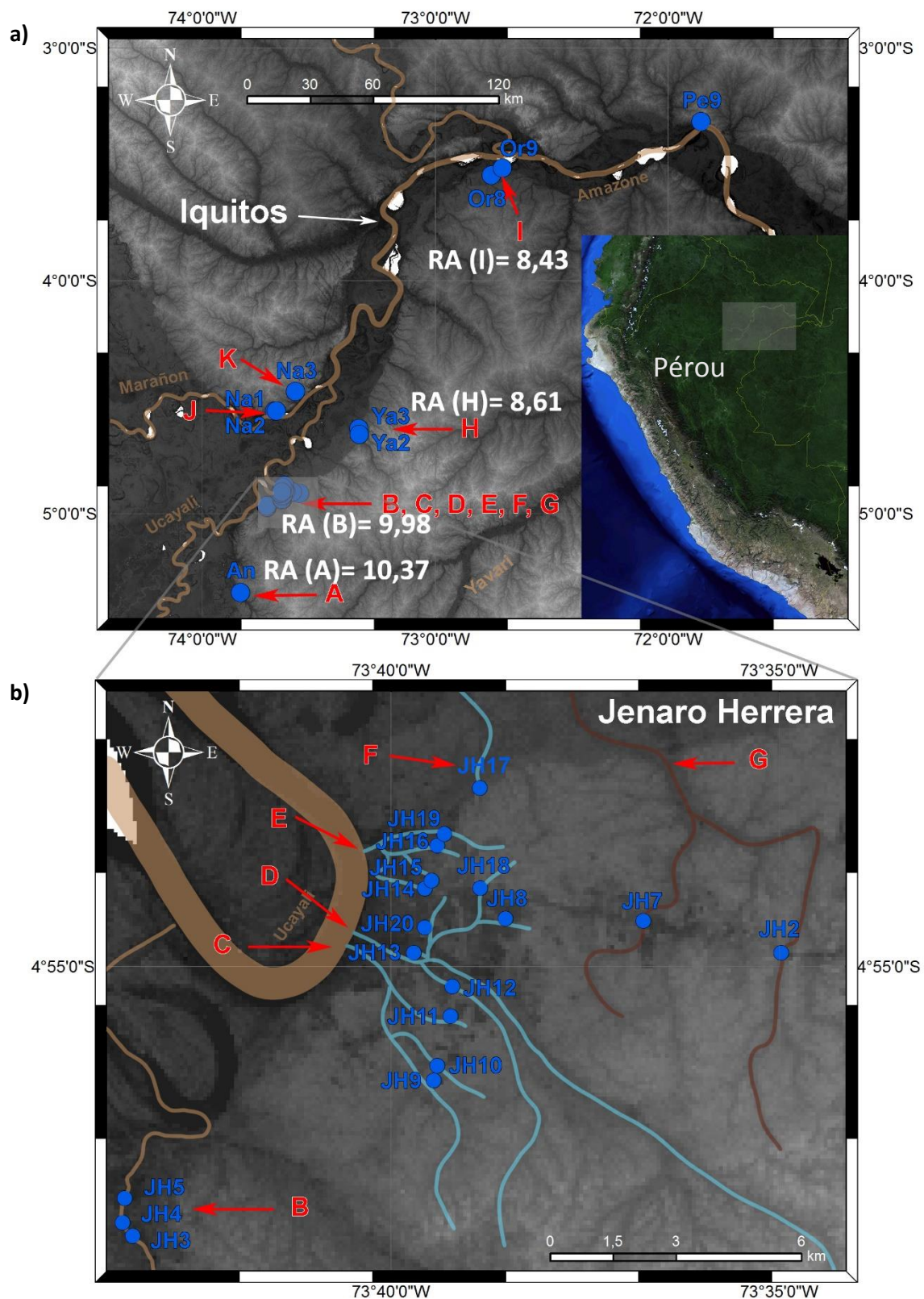


Figure 20 :a) distribution des micros bassins, nommés de A à K, où « l'espèce » Sp1 est présente dans la zone d'étude. Les valeurs de richesses alléliques (RA) sont présentées pour les micros bassins A, B, H et I. **b)** zoom sur la région de Jenaro Herrera. Les dégradés de gris correspondent aux changements d'altitude, les parties claires correspondent aux zones hautes, en foncées aux zones basses. Pour chaque ruisseau un seul popsite a été échantillonné, à l'exception des 3 popsites JH3, 4 et 5 pour un même ruisseau.

Recherche des clusters par DAPC et STRUCTURE à l'intérieur des microbassins

Cinq analyses DAPC ont été réalisées (une pour chacun des microbassins) en tenant compte du nombre de clusters mis en évidence par la méthode de k-mean (**Figure 21**). Pour le microbassin B deux clusters ont été identifiés, les courbes de densités des clusters 1 (B1) et 2 (B2) se chevauchent partiellement (**Figure 22**). Les valeurs de réassignations à chacun des clusters définis *a priori* sont de 0,97 pour B1 et de 0,98 pour B2.

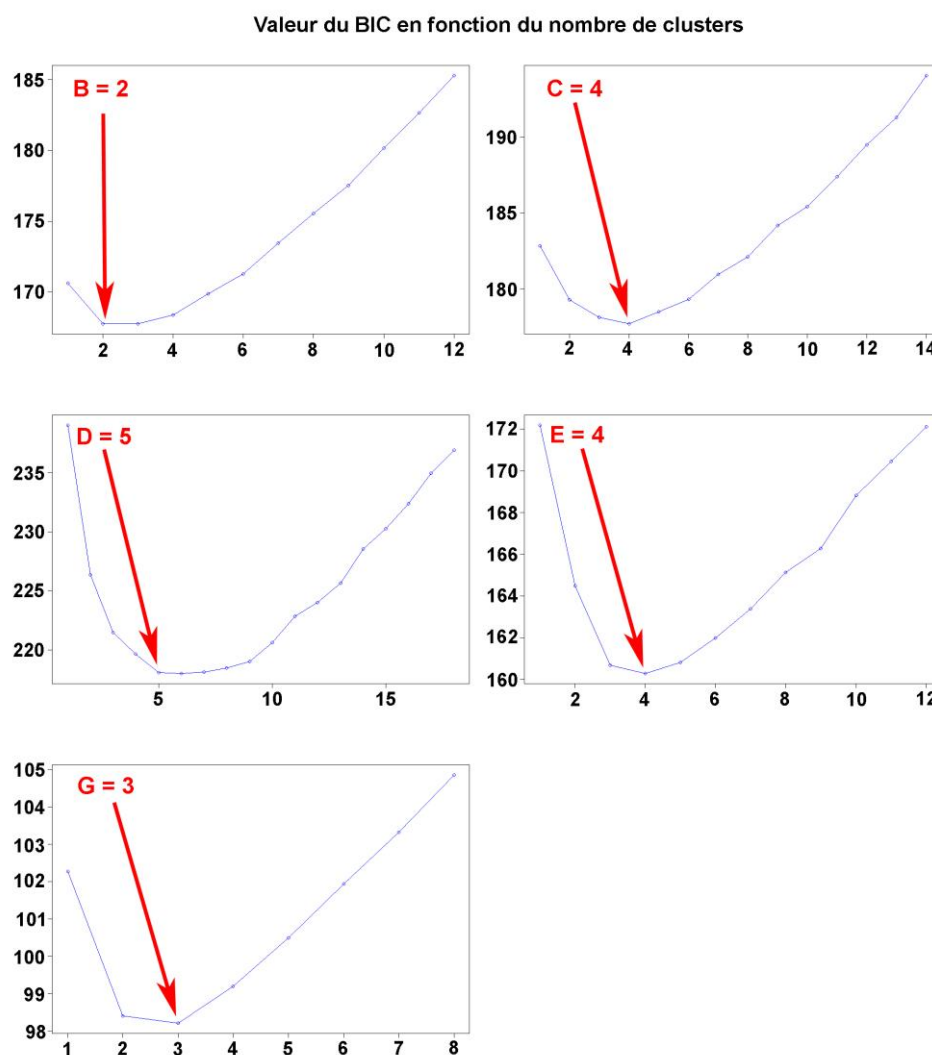


Figure 21. Valeurs du BIC pour chacun des microbassins analysés avec la méthode DAPC.

Pour le microbassin C quatre clusters ont été identifiés (**Figure 22**). Sur le plan factoriel des axes 1 et 2, l'ellipse du cluster 4 (C4) chevauche partiellement celles des clusters 2 (C2) et 3 (C3). Sur le plan factoriel des axes 2 et 3, l'ellipse de C3 chevauche partiellement celles de C1 et C2. Les valeurs de réassignations pour chacun de ces quatre clusters sont de 1,00 pour C1, de 0,97 pour C2, 1,00 pour C3 et de 0,97 pour le C4.

Pour le microbassin D cinq clusters ont été identifiés (**Figure 22**), sur le plan factoriel des axes 1 et 2, l'ellipse du cluster 1 (D1) chevauche partiellement celles des clusters 2 (D2) et 3 (D3). Sur le plan factoriel des axes 2 et 3, d'un côté l'ellipse de D3 chevauche partiellement celles de D1 et D2, de l'autre, les ellipses du cluster 4 (D4) et du cluster 5 (D5) se chevauchent. Les valeurs de réassignations pour

chacun de ces cinq clusters sont de 1,00 pour D1, 1,00 pour D2, 1,00 pour D3, 0,95 pour D4 et 0,96 pour D5.

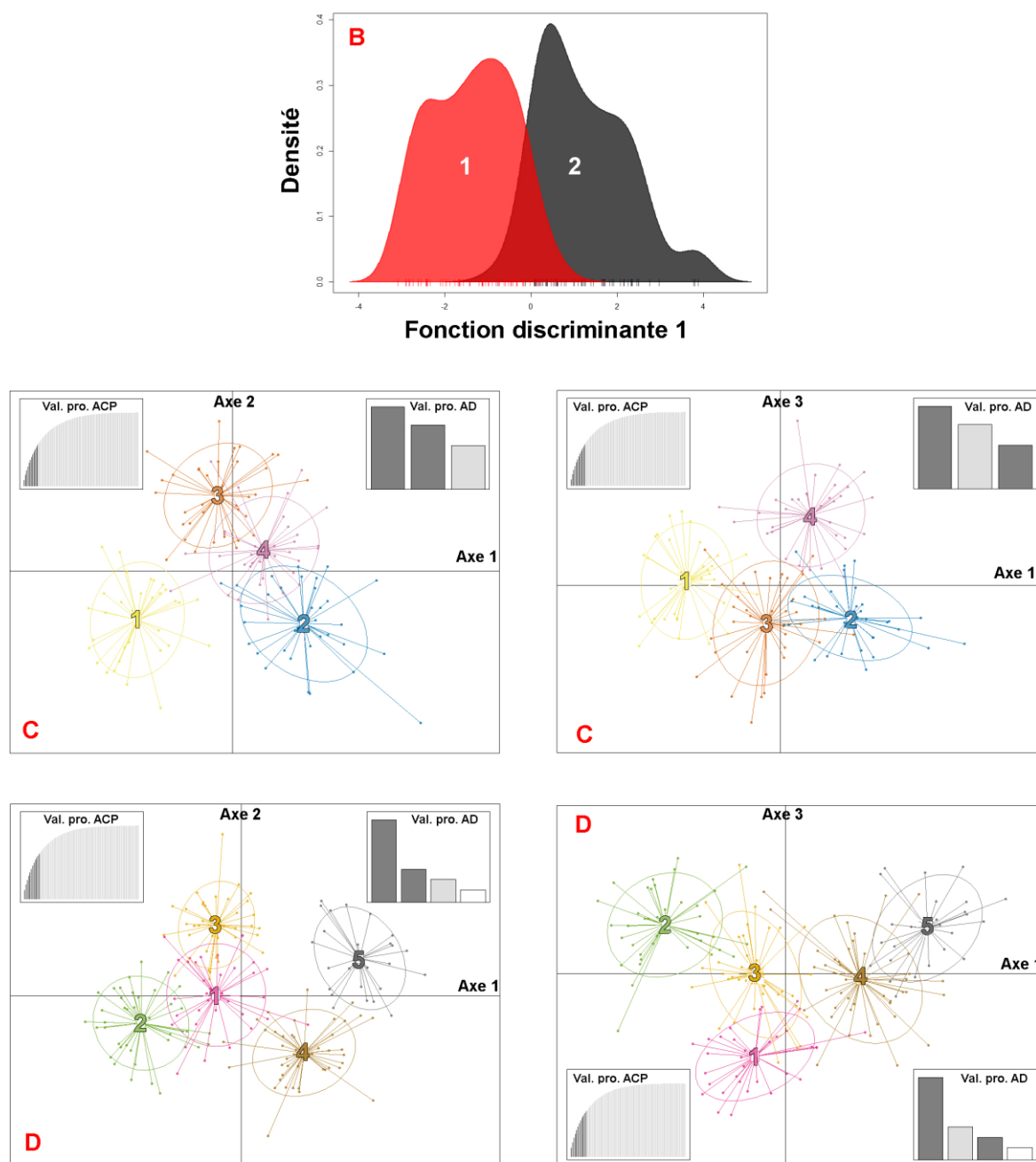


Figure 22. Analyse discriminante en composante principale (ADCP) à partir de la méthode DAPC sur les génotypes des individus provenant de chacun des microbassins (B pour $k = 2$, C pour $k = 4$, D pour $k = 5$) présentant un écart à la panmixie dans « l'espèce » Sp1. Chaque cluster est identifié par un code couleur et une ellipse d'inertie (les points correspondant aux individus).

Pour le microbassin E (**Figure 23**), sur le plan factoriel des axes 1 et 2, l'ellipse du cluster 1 (E1) chevauche partiellement celles des clusters 4 (E4) et 3 (E3). Sur le plan factoriel des axes 2 et 3, l'ellipse d'E3 chevauche partiellement celles de E1 et E4. Les valeurs de réassignations pour chacun de ces quatre clusters sont de 0,95 pour E1, 0,96 pour E2, 0,97 pour E3 et 0,90 pour E4.

Enfin, pour le microbassin G trois clusters ont été identifiés (**Figure 23**), sur le plan factoriel des axes 1 et 2, aucune des trois ellipses ne se chevauchent. Les valeurs de réassignations pour chacun des trois clusters sont de 1,00 pour le cluster 1 (G1), 0,97 pour le cluster 2 (G2) et de 0,94 pour le cluster 3 (G3).

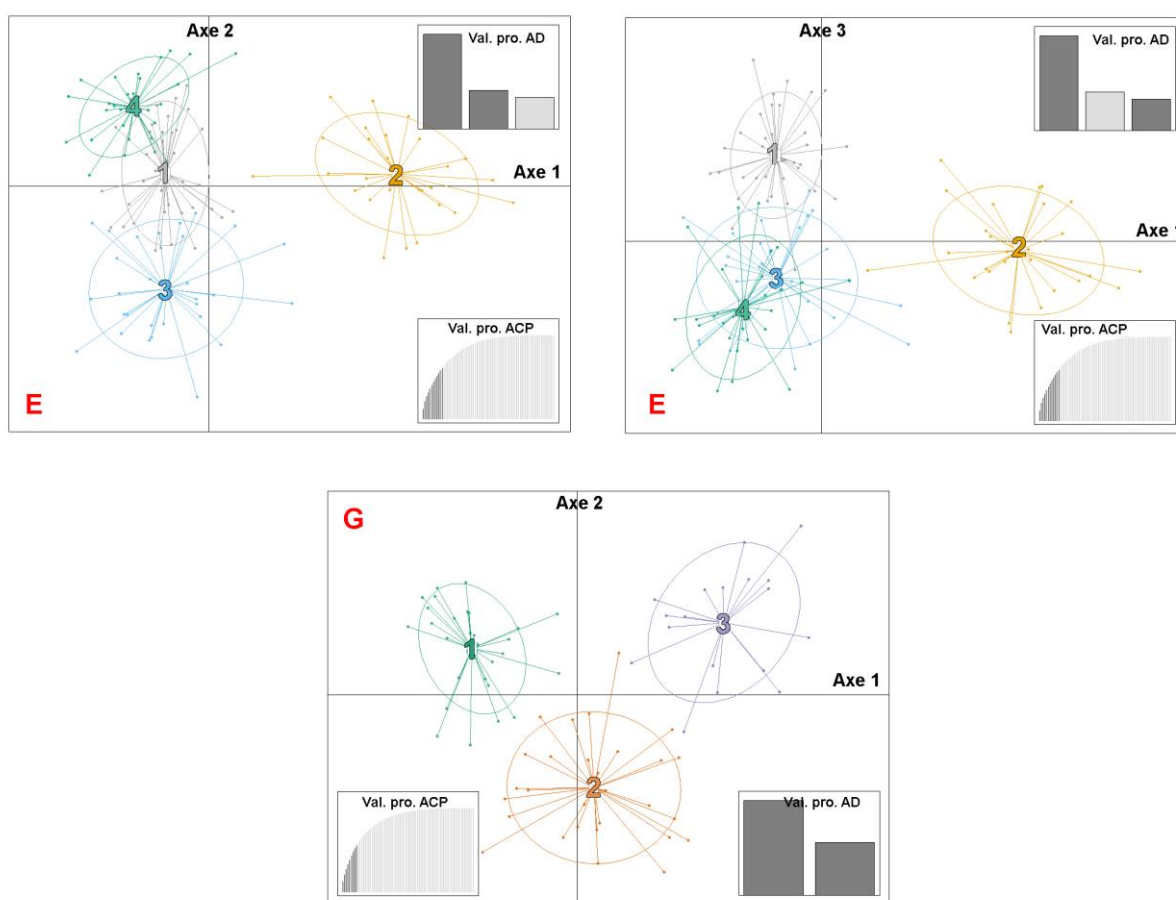


Figure 23. Analyse discriminante en composante principale (ADCP) à partir de la méthode DAPC sur les génotypes des individus provenant des microbassins (E pour $k = 4$ et G pour $k = 3$) présentant un écart à la panmixie dans « l'espèce » Sp1. Chaque cluster est identifié par un code couleur et une ellipse d'inertie (les points correspondent aux individus).

Au total, sur les 18 clusters identifiés par la méthode DAPC, 16 ont des valeurs de réassignations au cluster définis *a priori* compris entre 95% et 100% et deux ont des valeurs comprises entre 90% et 95%. Au regard de ces valeurs de réassignations, nous pouvons considérer que les clusters définis *a priori* par la méthode de K-mean représentent une bonne estimation de la structure génétique à l'intérieur des microbassins.

Sur le même jeu de données, les deux méthodes (DAPC et STRUCTURE) identifient dans les microbassins C, D, E et G de la structuration génétique mais n'indiquent pas le même nombre de clusters par microbassin (**Figure 24**). Pour le microbassin B, malgré un léger saut du Delta k pour $k = 3$ aucune structuration n'est trouvée par STRUCTURE, les histogrammes ($k = 3$ mais aussi $k = 2$) présentent des profils caractéristiques « en drapeaux » témoignant d'une absence de structure génétique. Pour les microbassins C, D, E et G, STRUCTURE identifie deux clusters dans chacun d'eux.

Parmi les 18 clusters identifiés par la méthode DAPC, seul 4 clusters présentent des écarts significatifs à la panmixie ($C1 = -0,066^*$; $G3 = 0,097^*$; $E4 = -0,093^*$; $E2 = 0,143^*$), alors que sur les 9 clusters identifiés par la méthode STRUCTURE, 7 présentent des écarts à la panmixie (**Tableau 7**).

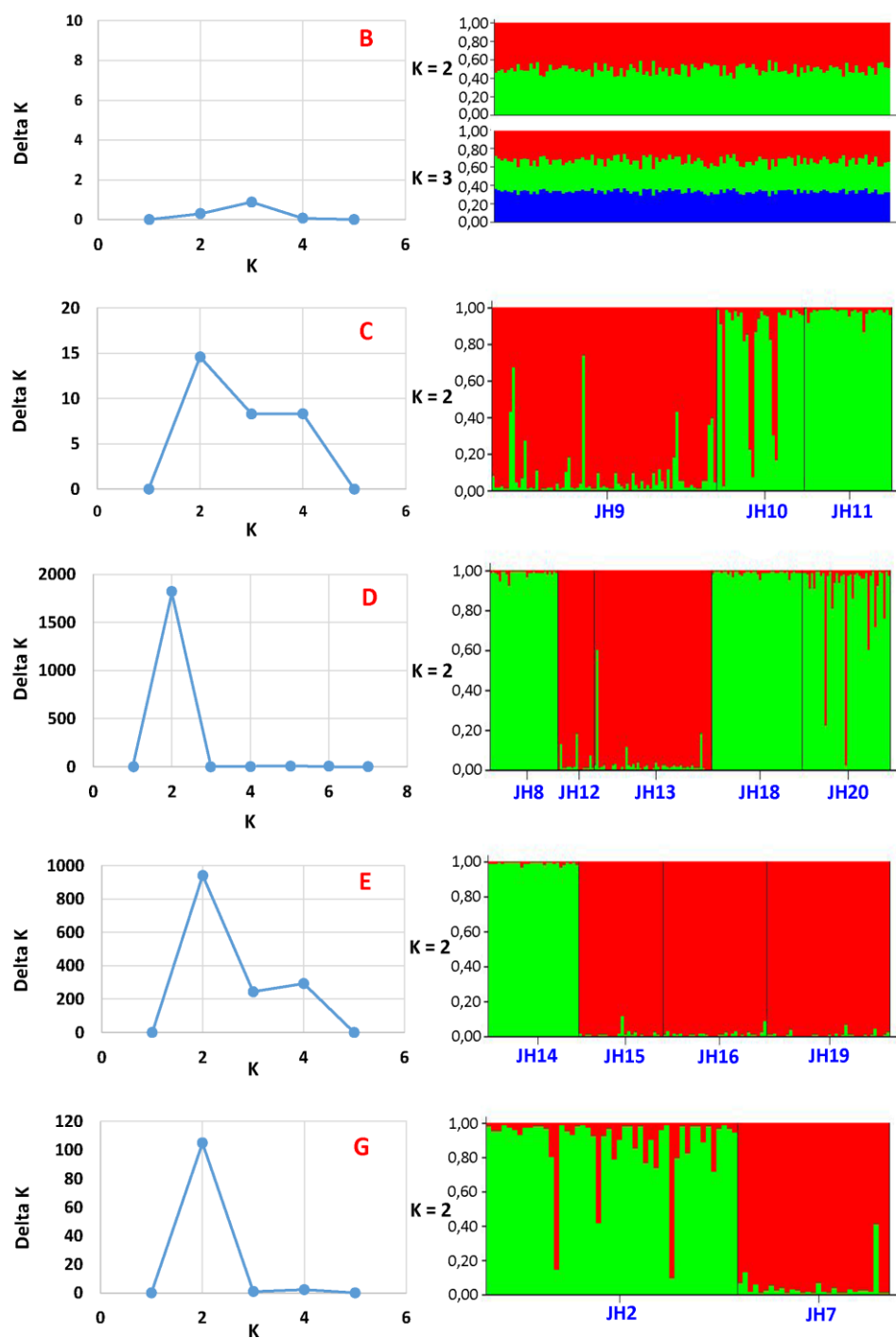


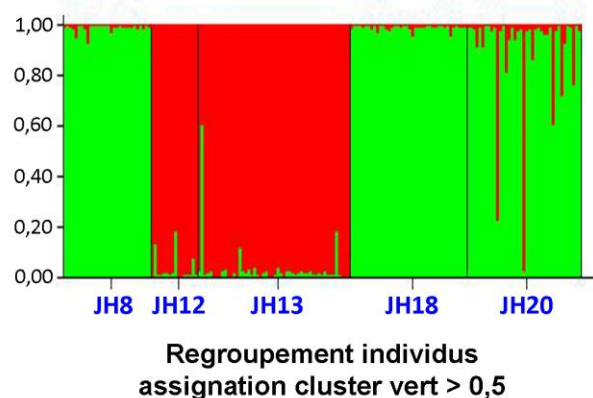
Figure 24. Avec le programme STRUCTURE : à gauche et de haut en bas, mesure de la variation du delta k en fonction du nombre de clusters (k) pour les microbassins B, C, D, E et G et à droite les histogrammes des probabilités des assignations des individus de chacun des microbassins pour le cluster le plus probable à l'exception du microbassin B où les histogrammes « en drapeau » des probabilités d'assignations sont présentés pour k= 2 et k=3.

Tableau 7. Nombre de clusters identifiés par la méthode DAPC et STRUCTURE pour les microbassins B, C, D, E et G. Les valeurs de l'estimateur de F_{IS} sont présentées pour chaque cluster. Les valeurs surlignées en Jaune présentent un écart significatif à la panmixie $p\text{-value} < 0,05$.

Microbassin	<i>N</i>	B	C	D	E	G	
		123	137	177	124	77	
		0,032	0,059	0,116	0,116	0,078	
DAPC (BIC)	<i>N</i>	65	32	34	38	30	
	Cluster1	-0,006	-0,066	-0,049	0,050	-0,003	
	<i>N</i>	58	35	39	27	29	
	Cluster2	0,016	0,021	0,050	0,143	-0,033	
	<i>N</i>	--	36	36	30	18	
	Cluster3	----	0,001	0,011	-0,012	0,097	
	<i>N</i>	--	34	43	29	--	
	Cluster4	----	0,033	0,028	-0,093	----	
	<i>N</i>	--	--	25	--	--	Total
	Cluster5	----	----	0,002	----	----	4/18
Structure	<i>N</i>	123	80	69	28	32	
	Cluster1	0,032	0,011	0,067	0,052	-0,024	
	<i>N</i>		57	108	96	45	Total
	Cluster2	----	0,067	0,075	0,138	0,090	7/9

La méthode DAPC se révèle être plus performante que STRUCTURE pour trouver la plus grande proportion de clusters pour lesquels on ne rejette pas la panmixie. Comme nous l'avons vu précédemment, la méthode STRUCTURE est beaucoup moins performante que DAPC pour démêler les différents niveaux de hiérarchisation de nos données. En effet, si avec le logiciel STRUCTURE on réalise une nouvelle analyse mais cette fois-ci en ne considérant que les individus ayant une valeur d'assignation supérieure à 0,50 au cluster vert identifié pour le microbassin D (**Figure 24**), la méthode STRUCTURE identifie dans ce cluster trois nouveaux clusters (**Figure 25**).

Analyse 1



Analyse 2

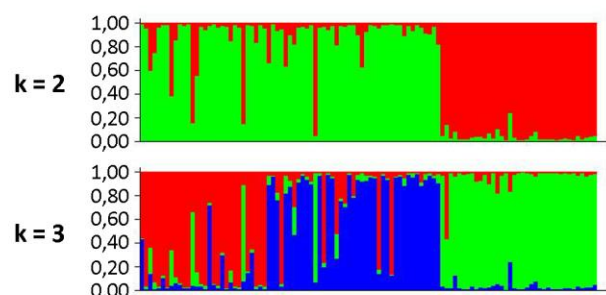
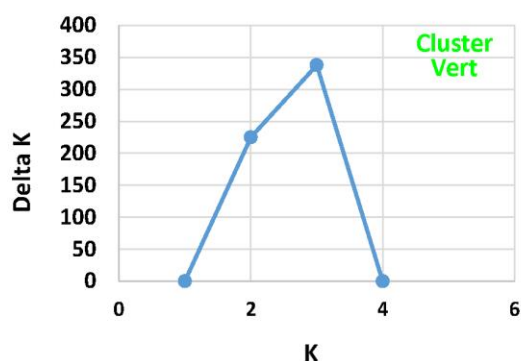


Figure 25. Identification d'une seconde structuration génétique avec le programme STRUCTURE en réalisant une nouvelle analyse sur les individus ayant une probabilité d'assignation > 0,50 au cluster vert du microbassin D identifié dans la **figure 24**.

Ces résultats montrent que la méthode DAPC est dans notre cas plus performante que STRUCTURE pour trouver (1) les différents niveaux de hiérarchisation des données et (2) la plus grande proportion de clusters où l'on ne peut pas rejeter la panmixie. Nous avons donc considéré que la méthode par DAPC était la meilleure des deux.

Variabilité génétique dans les clusters

Les données ont donc été réorganisées selon les clusters mis en évidence par la méthode DAPC. Au total, l'espèce Sp1 est constituée d'au moins 24 clusters, 18 identifiés à partir de la méthode DAPC et 6 qui correspondent aux 6 microbassins (A, F, H, I, J, K) pour lesquels la panmixie n'avait pas été rejetée au préalable. Les effectifs des 24 clusters sont compris entre 65 individus pour B1 et 18 pour G3 (**Tableau 8**). La richesse allélique est comprise entre 10,37 pour le cluster A et 3,31 pour le cluster K (**Tableau 9**).

Tableau 8: Distribution des individus de chacune des popsites de Sp1 dans les 24 clusters identifiés. *N* = effectif.

Clusters	Popsites																										
	JH2	JH3	JH4	JH5	JH7	JH8	JH9	JH10	JH11	JH12	JH13	JH14	JH15	JH16	JH17	JH18	JH19	JH20	An	Ya2	Ya3	Na1	Na2	Na3	Or8	Or9	<i>N</i>
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	-	-	-	-	-	-	-	35
B1	-	24	23	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65
B2	-	24	16	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58
C1	-	-	-	-	-	-	26	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32
C2	-	-	-	-	-	-	5	6	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35
C3	-	-	-	-	-	-	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36
C4	-	-	-	-	-	-	10	21	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34
D1	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	3	-	-	-	-	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34
D2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	4	-	32	-	-	-	-	-	-	-	-	39
D3	-	-	-	-	-	18	-	-	-	-	1	-	-	-	-	13	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	36
D4	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	38	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	43
D5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	25	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38
E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	23	3	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30
E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39
G1	5	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30
G2	27	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29
G3	16	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	24	-	-	-	-	-	47
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	30	60
J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	24	-	-	-	48
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	-	-	22
<i>N</i>	48	48	39	36	29	30	77	30	30	16	52	28	26	32	39	40	38	39	35	23	24	24	24	22	30	30	889

Tableau 9: Indices de diversité génétique dans Sp1 pour chacun des clusters. N = effectif; TNA = nombre total d'allèles; NMA = nombre moyen d'allèles; RA = richesse allélique; NAP = nombre d'allèles privés; Hobs. = hétérozygotie observée; Hexp. = hétérozygotie attendue, Hn.b. = hétérozygotie attendue sans biais; F_{IS} = écarts à la panmixie (* = $p\text{-value} < 0,050$).

Cluster	Diversité allélique					Diversité génétique			
	N	NTA	NMA	RA	NAP	H exp.	H n.b.	H obs.	F_{IS}
A	35	138	13,8	10,37	20	0,754	0,765	0,762	0,003
B1	65	151	15,1	9,79	6	0,725	0,730	0,734	-0,006
B2	58	157	15,7	10,16	6	0,737	0,744	0,732	0,016
C1	32	80	8,0	7,05	0	0,688	0,698	0,744	-0,066*
C2	35	76	7,6	6,50	0	0,642	0,652	0,638	0,021
C3	36	67	6,7	5,97	0	0,592	0,600	0,600	0,001
C4	34	87	8,7	7,40	1	0,676	0,687	0,664	0,033
D1	34	56	5,6	4,91	1	0,591	0,600	0,629	-0,049
D2	39	57	5,7	4,78	3	0,522	0,529	0,503	0,050
D3	36	57	5,7	4,89	0	0,584	0,592	0,586	0,011
D4	43	77	7,7	6,13	1	0,679	0,687	0,667	0,028
D5	25	59	5,9	5,46	0	0,581	0,593	0,592	0,002
E1	38	65	6,5	5,69	0	0,619	0,627	0,596	0,050
E2	27	48	4,8	4,61	0	0,609	0,621	0,533	0,143*
E3	30	70	7,0	6,16	0	0,677	0,688	0,697	-0,012
E4	29	54	5,4	4,91	0	0,584	0,594	0,649	-0,093*
F	39	88	8,8	7,09	3	0,686	0,695	0,690	0,007
G1	30	92	9,2	7,66	4	0,630	0,641	0,643	-0,003
G2	29	67	6,7	5,87	0	0,608	0,618	0,638	-0,033
G3	18	65	6,5	6,50	1	0,591	0,608	0,550	0,097*
H	47	113	11,3	8,61	4	0,725	0,733	0,732	0,001
I	60	125	12,5	8,43	19	0,721	0,727	0,701	0,036
J	48	60	6,0	4,58	2	0,396	0,400	0,417	-0,043
K	22	34	3,4	3,31	0	0,425	0,435	0,436	-0,004

Différenciation génétique entre clusters et microbassins

Les valeurs de différenciations évaluées par l'estimateur du F_{ST} par paires de clusters (**Tableau 10**) sont toutes significatives ($p\text{-value} < 0.01$), elles sont comprises entre 0,04 et 0,37, avec une valeur moyenne de différenciation entre clusters de $0,16 \pm 0,06$ (σ). Les clusters des microbassins J et K sont les plus différenciés à l'intérieur de Sp1, ces deux microbassins sont localisés sur la rive gauche du rio Marañon (**Figure 15**).

Tableau 10. Valeurs des F_{ST} par paires entre les 24 clusters identifiés pour Sp1 selon l'estimateur de Weir et Cockerham (1984). Les valeurs en vert $<0,05$; $0,05 \leq$ jaune $<0,15$; $0,15 \leq$ Orange $<0,25$ et bleu $\geq 0,25$. Toutes les valeurs sont significatives $p\text{-value} < 0,01$.

N	35	65	58	32	35	36	34	34	39	36	43	25	38	27	30	29	39	30	29	18	47	60	48	22
F_{ST}	A	B1	B2	C1	C2	C3	C4	D1	D2	D3	D4	D5	E1	E2	E3	E4	F	G1	G2	G3	H	I	J	K
A	----	0,07	0,09	0,13	0,12	0,16	0,10	0,15	0,19	0,21	0,12	0,19	0,15	0,14	0,12	0,19	0,10	0,10	0,12	0,17	0,09	0,11	0,26	0,20
B1	0,07	----	0,05	0,13	0,11	0,16	0,07	0,11	0,11	0,13	0,10	0,17	0,11	0,11	0,10	0,14	0,08	0,08	0,08	0,12	0,07	0,13	0,24	0,20
B2	0,09	0,05	----	0,08	0,06	0,10	0,04	0,09	0,17	0,13	0,06	0,11	0,10	0,15	0,06	0,13	0,08	0,05	0,11	0,13	0,07	0,07	0,18	0,15
C1	0,13	0,13	0,08	----	0,08	0,08	0,08	0,19	0,24	0,24	0,14	0,23	0,18	0,22	0,14	0,21	0,13	0,10	0,14	0,21	0,12	0,13	0,27	0,23
C2	0,12	0,11	0,06	0,08	----	0,10	0,07	0,14	0,23	0,22	0,12	0,20	0,13	0,20	0,13	0,20	0,14	0,10	0,11	0,17	0,12	0,16	0,23	0,20
C3	0,16	0,16	0,10	0,08	0,10	----	0,07	0,18	0,26	0,25	0,17	0,23	0,19	0,23	0,15	0,22	0,17	0,11	0,18	0,21	0,16	0,16	0,21	0,21
C4	0,10	0,07	0,04	0,08	0,07	0,07	----	0,11	0,16	0,15	0,09	0,15	0,10	0,13	0,09	0,14	0,09	0,07	0,10	0,11	0,10	0,12	0,19	0,18
D1	0,15	0,11	0,09	0,19	0,14	0,18	0,11	----	0,11	0,09	0,10	0,16	0,16	0,18	0,11	0,20	0,14	0,14	0,15	0,15	0,13	0,19	0,27	0,25
D2	0,19	0,11	0,17	0,24	0,23	0,26	0,16	0,11	----	0,12	0,15	0,22	0,22	0,20	0,19	0,25	0,17	0,19	0,18	0,20	0,19	0,25	0,37	0,34
D3	0,21	0,13	0,13	0,24	0,22	0,25	0,15	0,09	0,12	----	0,13	0,15	0,20	0,21	0,16	0,20	0,18	0,21	0,22	0,17	0,17	0,19	0,35	0,34
D4	0,12	0,10	0,06	0,14	0,12	0,17	0,09	0,10	0,15	0,13	----	0,08	0,15	0,18	0,11	0,20	0,13	0,11	0,14	0,16	0,12	0,14	0,28	0,23
D5	0,19	0,17	0,11	0,23	0,20	0,23	0,15	0,16	0,22	0,15	0,08	----	0,18	0,23	0,15	0,21	0,20	0,20	0,24	0,19	0,20	0,20	0,33	0,32
E1	0,15	0,11	0,10	0,18	0,13	0,19	0,10	0,16	0,22	0,20	0,15	0,18	----	0,14	0,09	0,07	0,16	0,13	0,17	0,16	0,15	0,19	0,29	0,27
E2	0,14	0,11	0,15	0,22	0,20	0,23	0,13	0,18	0,20	0,21	0,18	0,23	0,14	----	0,16	0,19	0,15	0,17	0,14	0,13	0,14	0,20	0,32	0,27
E3	0,12	0,10	0,06	0,14	0,13	0,15	0,09	0,11	0,19	0,16	0,11	0,15	0,09	0,16	----	0,12	0,10	0,09	0,15	0,16	0,10	0,13	0,25	0,22
E4	0,19	0,14	0,13	0,21	0,20	0,22	0,14	0,20	0,25	0,20	0,20	0,21	0,07	0,19	0,12	----	0,19	0,20	0,24	0,19	0,17	0,20	0,34	0,33
F	0,10	0,08	0,08	0,13	0,14	0,17	0,09	0,14	0,17	0,18	0,13	0,20	0,16	0,15	0,10	0,19	----	0,11	0,14	0,20	0,07	0,12	0,26	0,22
G1	0,10	0,08	0,05	0,10	0,10	0,11	0,07	0,14	0,19	0,21	0,11	0,20	0,13	0,17	0,09	0,20	0,11	----	0,09	0,14	0,10	0,11	0,19	0,16
G2	0,12	0,08	0,11	0,14	0,11	0,18	0,10	0,15	0,18	0,22	0,14	0,24	0,17	0,14	0,15	0,24	0,14	0,09	----	0,09	0,12	0,18	0,28	0,23
G3	0,17	0,12	0,13	0,21	0,17	0,21	0,11	0,15	0,20	0,17	0,16	0,19	0,16	0,13	0,16	0,19	0,20	0,14	0,09	----	0,17	0,19	0,32	0,29
H	0,09	0,07	0,07	0,12	0,12	0,16	0,10	0,13	0,19	0,17	0,12	0,20	0,15	0,14	0,10	0,17	0,07	0,10	0,12	0,17	----	0,09	0,26	0,21
I	0,11	0,13	0,07	0,13	0,16	0,16	0,12	0,19	0,25	0,19	0,14	0,20	0,19	0,20	0,13	0,20	0,12	0,11	0,18	0,19	0,09	----	0,24	0,22
J	0,26	0,24	0,18	0,27	0,23	0,21	0,19	0,27	0,37	0,35	0,28	0,33	0,29	0,32	0,25	0,34	0,26	0,19	0,28	0,32	0,26	0,24	----	0,16
K	0,20	0,20	0,15	0,23	0,20	0,21	0,18	0,25	0,34	0,34	0,23	0,32	0,27	0,27	0,22	0,33	0,22	0,16	0,23	0,29	0,21	0,22	0,16	----

Les valeurs moyennes de F_{ST} entre microbassins sont soit plus importantes, soit du même ordre de grandeur que les valeurs de F_{ST} à l'intérieur des microbassins (**Tableau 11**). Cependant, certaines valeurs par paires de clusters à l'intérieur d'un même microbassin sont plus importantes que d'autres entre micro bassins. Il existe donc à l'intérieur des micros bassins C, D, E et G une forte différenciation génétique entre clusters parfois de même amplitude que celle entre microbassins.

Tableau 11. Valeurs des F_{ST} par paires de microbassin pour Sp1 selon l'estimateur de Weir et Cockerham (1984). Les valeurs de F_{ST} $0,05 \leq$ jaune $< 0,15$; $0,15 \leq$ Orange $< 0,25$ et $0,25 \geq$ bleu. Les valeurs sous la diagonale correspondent aux écart-types et en gras les moyennes pour les microbassins B, C, D, E et G. Toutes les valeurs sont significatives $p\text{-value} < 0,01$.

Microbassins											Valeurs moyennes dans les microbassins				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	moy,	σ	min.	max.
A	----	0,08	0,13	0,17	0,15	0,10	0,13	0,09	0,11	0,26	0,20	----	----	----	----
B	0,01	----	0,09	0,12	0,11	0,08	0,10	0,07	0,10	0,21	0,17	0,05	----	----	----
C	0,02	0,03	----	0,19	0,17	0,13	0,14	0,12	0,14	0,22	0,21	0,08	0,01	0,07	0,08
D	0,04	0,03	0,05	----	0,18	0,16	0,18	0,16	0,19	0,32	0,30	0,13	0,05	0,08	0,22
E	0,03	0,03	0,05	0,04	----	0,15	0,16	0,14	0,18	0,30	0,27	0,13	0,03	0,09	0,19
F	----	0,00	0,03	0,03	0,04	----	0,15	0,07	0,12	0,26	0,22	----	----	----	----
G	0,04	0,03	0,05	0,04	0,04	0,05	----	0,13	0,16	0,27	0,22	0,11	0,03	0,09	0,14
H	----	0,00	0,02	0,04	0,03	----	0,04	----	0,09	0,26	0,21	----	----	----	----
I	----	0,04	0,02	0,04	0,03	----	0,04	----	----	0,24	0,22	----	----	----	----
J	----	0,04	0,03	0,04	0,04	----	0,07	----	----	----	0,16	----	----	----	----
K	----	0,03	0,02	0,05	0,05	----	0,07	----	----	----	----	----	----	----	----

À l'intérieur de ces microbassins à l'échelle du ruisseau forestier, les clusters ont une distribution marquée par ruisseau (**Figure 26**) et le dendrogramme des distances génétiques entre clusters est très similaire à celui obtenu à partir des popsites (**Figure 27** vs **Figure 19**), avec les clusters formant des ensembles qui correspondent à leur microbassin d'origine. Cela confirme donc que pour Sp1 le niveau microbassin correspond à un niveau de hiérarchisation de l'information génétique.

À l'intérieur de ces microbassins, en sympatrie, cohabitent différentes unités génétiques qui s'organisent dans les ruisseaux. Lorsque l'on considère l'ensemble des clusters de Sp1 aucune relation n'a été trouvée entre la matrice des distances de Roussel (1997) par paire de clusters et leurs distances géographiques ($p\text{-value} = 0,150$). L'absence d'isolement pas la distance pourrait indiquer la présence d'unités évolutives indépendante dont les processus de divergences soient par exemple liés à la sélection. Toutefois, si l'on considère uniquement les clusters présents dans les quatre microbassins les plus importants par leur superficie (A = 893 km², B = 485 km², H = 754 km², I = 360 km², alors que les autres < 100 km²) et *a priori* avec la plus forte démographie en *A. agassizii*, on observe alors une relation entre distance génétique et géographique ($p\text{-value} = 0,016$; **Annexe 8**). Par ailleurs, il est important de noter qu'il existe entre ces 4 microbassins un gradient de richesse allélique en fonction de la distance géographique qui diminue de l'amont (clusters A) vers l'aval (cluster I) ($r = 0,89$) (**Figure 20**). Les clusters A et I sont localisés aux extrêmes de l'aire de distribution connue de Sp1, pourtant, la valeur de F_{ST} entre ces deux clusters est de seulement 0,11, ce qui est plutôt faible en comparaison des F_{ST} entre les autres paires de microbassins de Sp1.

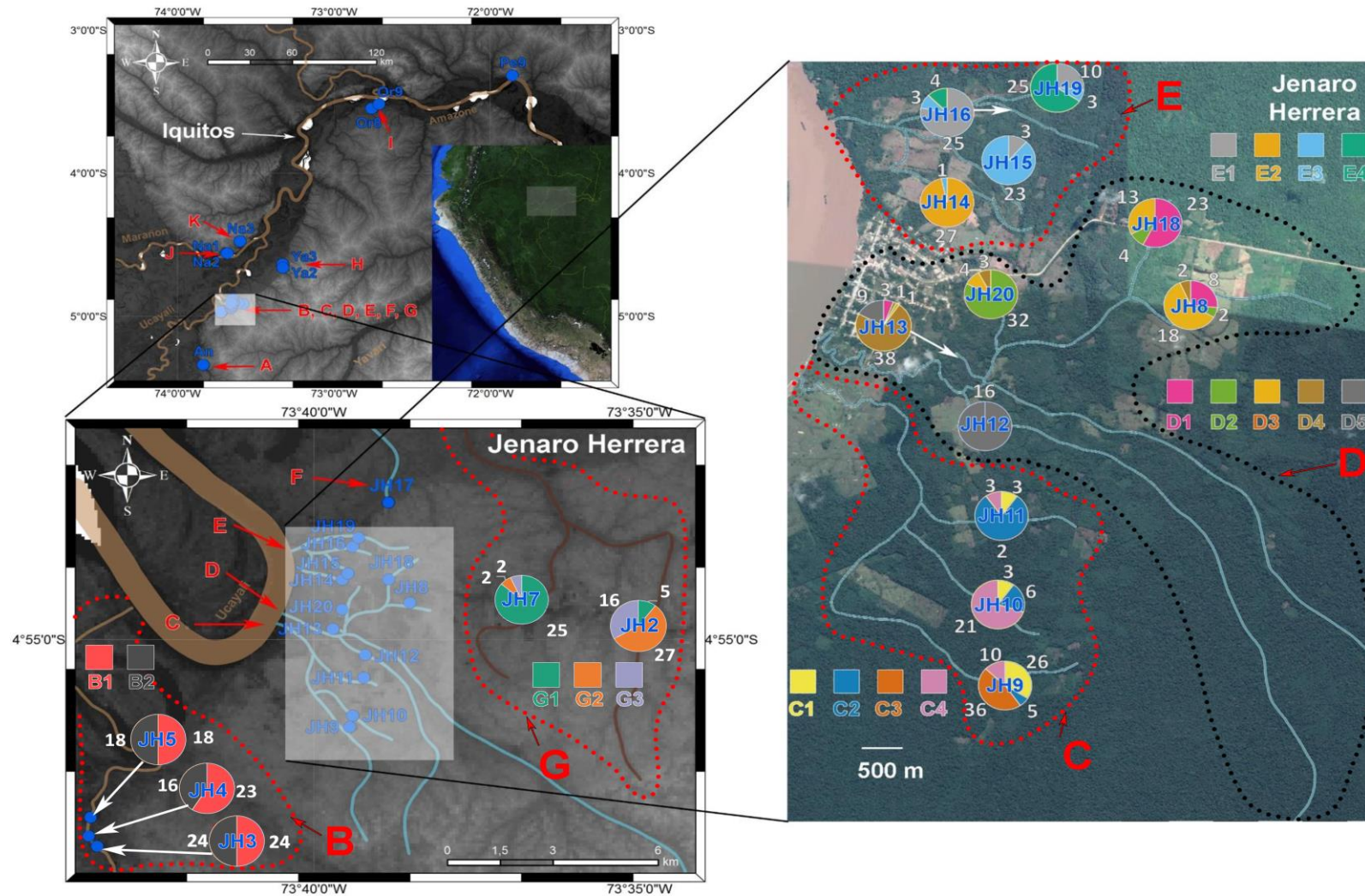


Figure 26 : Proportion des clusters identifiés par méthode DAPC à l'intérieur des microbassins par popsité (ou par ruisseau à l'exception de JH3, 4 et 5) de Sp1 dans la région de Jenaro Herrera pour les micros bassins B, C, D, E et G. Le code couleur utilisé pour chacun des clusters est le même que celui utilisé pour identifier les clusters sur les ADCP (**Figure 22 et 23**). Les zones en pointillé correspondent aux microbassins. Les dégradés de gris correspondent aux changements d'altitude, les parties claires correspondent aux zones hautes, en foncé aux zones basses.

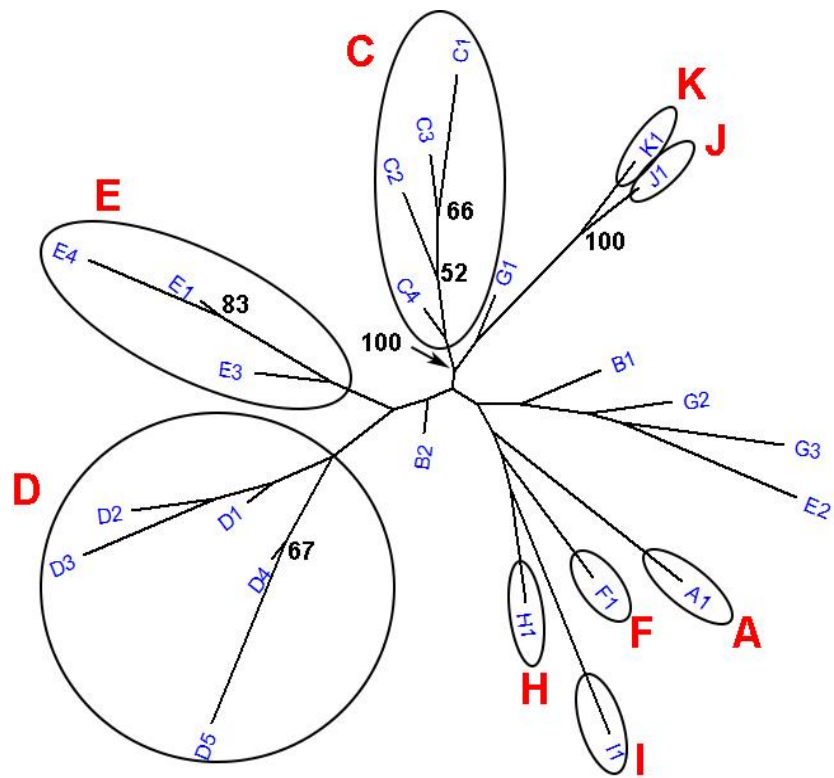


Figure 27 : Dendrogramme non raciné des distances génétiques des 24 clusters (889 individus) de Sp1 génotypés sur 10 locus microsatellites, construit à partir d'un arbre de neighbor joining et d'une distance de Nei (1972). Seules les valeurs de nœuds > à 50 sont indiquées. Les codes en bout de branches correspondent aux clusters et les enveloppes avec les lettres aux microbassins.

C. II. 2 Variation génétique à l'échelle des microbassins et des ruisseaux : mise en évidence de populations dans *Apistogramma* Sp2

Recherche des clusters par DAPC à l'intérieur des microbassins

Pour Sp2 qui comprend 207 individus (7 popsites, **Figure 28**), la méthode DAPC a permis d'identifier 7 clusters (**Figure 29**). Les valeurs moyennes de réassignations des individus dans chacun des sept clusters sont de 1,00 pour le cluster 1 ; de 1,00 pour le cluster 2 ; 0,92 pour le cluster 3 ; 0,97 pour le cluster 4 ; 0,95 pour le cluster 5 ; 1,00 pour le cluster 6 et 0,92 pour le cluster 7 (**Figure 29**).

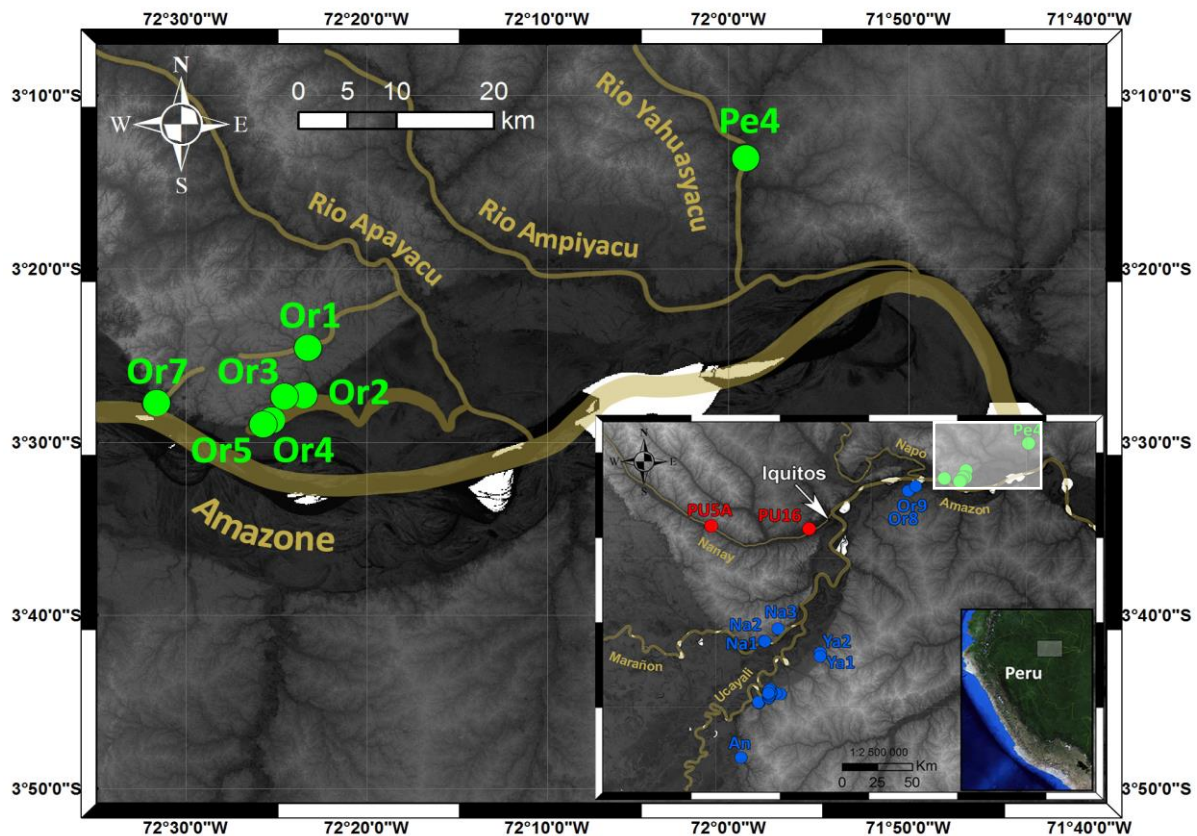


Figure 28 : Carte d'élévation de la zone d'échantillonnage des 7 popsites de Sp2 dans la région de Orán – Pebas, Loreto (Pérou). Les dégradés de gris correspondent aux changements d'altitude, les parties claires correspondent aux zones hautes, en foncé aux zones basses.

Valeur du BIC en fonction du nombre de clusters

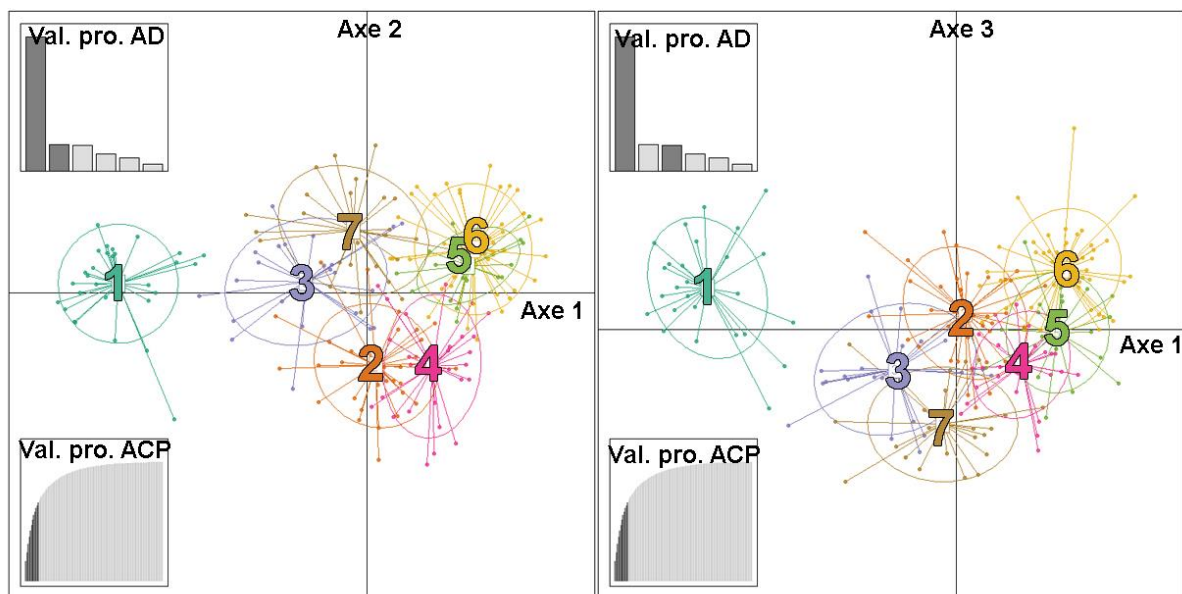
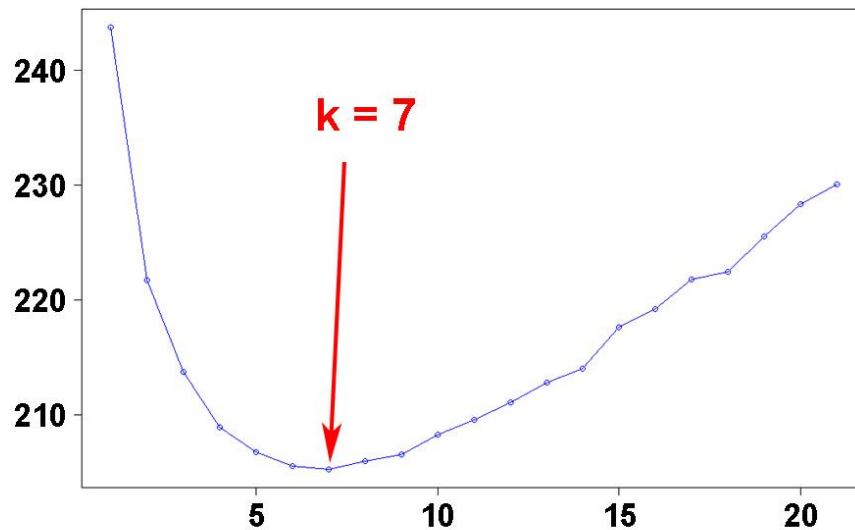


Figure 29. Analyse discriminante en composante principale sur les génotypes de l'ensemble des individus de Sp2 pour k=7 sur les plans 1-2 (à gauche) et 1-3 (à droite). Chaque cluster est identifié par un code couleur et une ellipse d'inertie (les points correspondent aux individus).

Variabilité génétique dans les clusters

Parmi les 7 clusters identifiés, seul le cluster 7 présente un écart significatif à la panmixie. La valeur de réassignation obtenue à partir de l'ADCP au cluster *a priori* était de 0,92, cela pourrait être la conséquence d'échanges géniques avec d'autres clusters (mélanges de génotypes). Les effectifs des clusters sont compris entre 22 pour le cluster 5 et 44 pour le cluster 6 (**Tableau 12**). La richesse allélique est comprise entre 7,6 (Cluster 6) et 2,3 (Cluster 1). Le cluster 6 présente 13 allèles privés (**Tableau 13**).

Tableau 12 : Distribution des individus de chacune des popsites de Sp2 dans les 7 clusters identifiés. N = effectif.

Clusters	Popsites							N
	Pe4	Or1	Or2	Or3	Or4	Or5	Or7	
Cluster 1	-	-	-	-	-	-	29	29
Cluster 2	1	7	8	5	6	7	-	34
Cluster 3	-	17	3	-	2	1	1	24
Cluster 4	-	-	5	12	6	6	-	29
Cluster 5	4	2	7	1	5	3	-	22
Cluster 6	22	3	5	4	2	8	-	44
Cluster 7	-	1	2	8	9	5	-	25
N	27	30	30	30	30	30	30	207

Tableau 13 : Indices de diversité génétique dans Sp2 pour chacun des clusters. N = effectif; TNA = nombre total d'allèles; NMA = nombre moyen d'allèles; RA = richesse allélique; NAP = nombre d'allèles privés; Hobs. = hétérozygotie observée; Hexp. = hétérozygotie attendue, Hn.b. = hétérozygotie attendue sans biais; F_{IS} = écarts à la panmixie (* = p -value < 0,050).

Cluster	N	Diversité allélique				Diversité génétique			
		NTA	NMA	RA	NAP	H exp.	H n.b.	H obs.	Fis
Cluster 6	44	92	9,5	7,56	13	0,524	0,530	0,541	-0,021
Cluster 4	29	82	8,2	7,47	3	0,551	0,560	0,579	-0,035
Cluster 2	34	79	7,9	6,84	4	0,500	0,508	0,525	-0,035
Cluster 7	25	67	6,7	6,44	3	0,532	0,543	0,611	-0,128*
Cluster 3	24	65	6,5	6,36	5	0,494	0,505	0,535	-0,061
Cluster 5	22	55	5,5	5,50	2	0,412	0,421	0,418	0,008
Cluster 1	29	24	2,4	2,348	1	0,344	0,350	0,383	-0,095

Différenciation et distance génétique entre clusters

La valeur moyenne du F_{ST} sur l'ensemble des clusters est de $0,17 \pm 0,09$ (S.D.). Toutes les valeurs sont significatives (p -value < 0,01) et sont comprises entre 0,08 et 0,40 (**Tableau 14**).

Tableau 14. Valeurs des F_{ST} par paires de clusters pour Sp2 selon l'estimateur de Weir & Cockerham (1984). Les valeurs F_{ST} 0,05 ≤ jaune < 0,15 ; 0,15 ≤ Orange < 0,25 et 0,25 ≥ bleu. Toutes les valeurs sont significatives p -value < 0,01.

F_{ST}	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7
Cluster 1	----	0,26	0,20	0,29	0,40	0,32	0,24
Cluster 2	0,26	----	0,10	0,08	0,13	0,11	0,12
Cluster 3	0,20	0,10	----	0,14	0,18	0,16	0,10
Cluster 4	0,29	0,08	0,14	----	0,13	0,10	0,09
Cluster 5	0,40	0,13	0,18	0,13	----	0,08	0,14
Cluster 6	0,32	0,11	0,16	0,10	0,08	----	0,13
Cluster 7	0,24	0,12	0,10	0,09	0,14	0,13	----

Sur le dendrogramme des distances génétiques, les clusters 4, 5 et 6 forment un ensemble soutenu par une valeur de bootstrap de 100 vs un autre ensemble formé par les clusters 1, 2, 3 et 7 (**Figure 30**). Le cluster 1 est le plus distant des autres clusters.

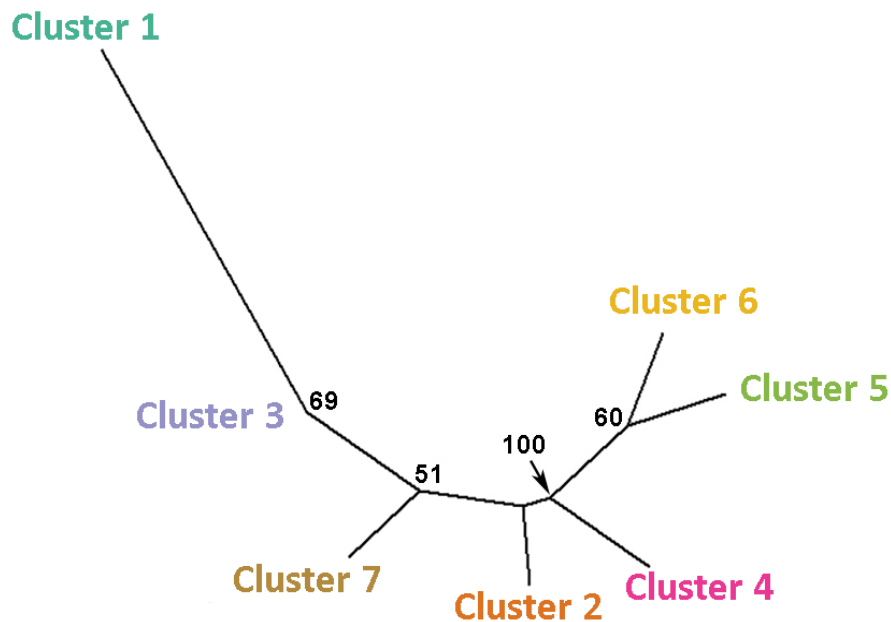


Figure 30 : Dendrogramme non raciné des distances génétiques des 7 clusters (207 individus) de Sp2 génotypés sur 10 locus microsatellites, construit à partir d'un arbre de neighbor joining et d'une distance de Nei (1972). Seules les valeurs de nœuds > à 50 sont indiquées. Le code couleur des clusters en bout de branches correspond au même code couleur de la DAPC de Sp2 (figure 29).

La distribution géographique des clusters de Sp2 donne une toute autre image que celle trouvée pour Sp1. En effet, il est plus difficile d'identifier une organisation géographique des clusters chez Sp2 car sur les sept clusters identifiés, seuls trois clusters (1, 3 et 6) sont majoritaires dans certains ruisseaux (au moins 50% des individus, **Figure 31**). Le cluster 1 est le seul qui est spécifique à la popsité Or7, c'est d'ailleurs la popsité qui semble être la plus isolée géographiquement. Les six autres clusters sont présents en mélange dans les quatre popsités Or2, Or3, Or4 et Or5. La popsité Or4 a été échantillonnée en bordure d'un lac de méandre et les popsités Or2 et Or5 ont été échantillonnées dans deux pièces d'eau, qui de par leur taille (quelques centaines de mètres de long), semblent plutôt correspondre à des ravines. Ces ravines se connectent au lac de méandre de la popsité Or4. Seule la popsité Or3 semble avoir été échantillonnée dans un microbassin qui se déverse dans le même lac de méandre que les popsités Or2, Or4 et Or5. Ces dernières sont à la limite de la plaine d'inondation de l'Amazonie. Comme en témoigne la présence de lacs de méandres, cette zone a connu récemment des remodelassions hydromorphologiques dues à la dynamique fluviale. Ces popsités pourraient avoir été colonisées par des clusters environnants après la mise en place de la structure hydromorphologique actuelle.

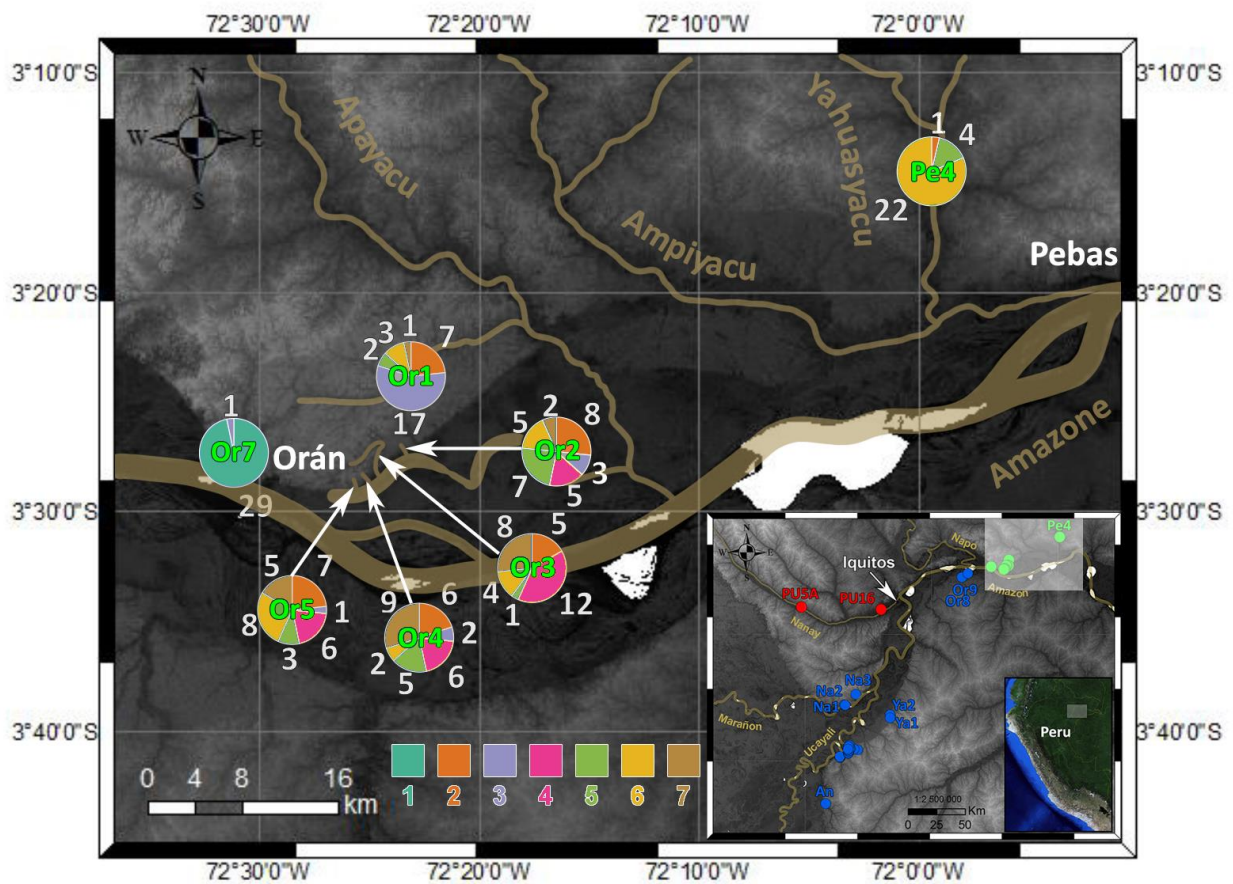


Figure 31 : Proportion des clusters identifiés par analyse en composante principale (DAPC) à l'intérieur des popsites de Sp2. Chaque cluster est identifié par son code couleur. Les dégradés de gris correspondent aux changements d'altitude, les parties claires correspondent aux zones hautes, en foncé aux zones basses.

C. II. 3 Variation génétique à l'échelle des microbassins et des ruisseaux : mise en évidence de populations dans *Apistogramma* Sp3

Sp3 comprend 55 individus répartis en deux popsites (PU16 et PU5A, **Figure 32**) aucune ne présente d'écart à la panmixie (PU16 = - 0,032 et PU5A = 0,003), de même lorsqu'elles ont été regroupées entre-elles (0,035). La structuration génétique en cluster n'a donc pas été recherchée car les 55 individus analysés sembleraient appartenir (d'après la valeur de F_{is}) à une seule population génétique.

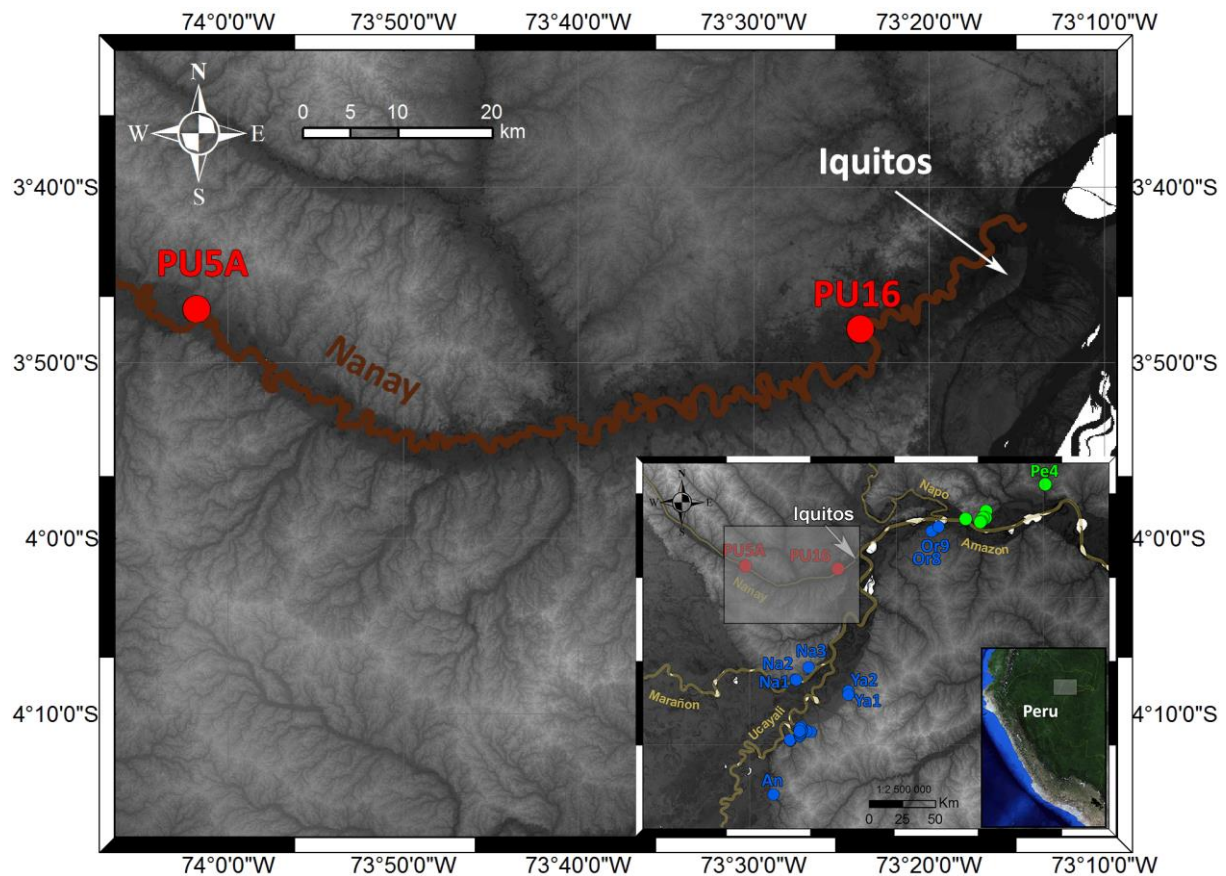


Figure 32 : Carte d'élévation de la zone d'échantillonnage des 2 popsites de Sp3 dans la plaine d'inondation de la rivière Nanay, Loreto (Pérou). Les dégradés de gris correspondent aux changements d'altitude, les parties claires correspondent aux zones hautes, en foncé aux zones basses.

C. II. 4 Test sur la pertinence de la méthode DACP pour mettre en évidence des espèces et des populations par la recherche de clusters

Le test a été réalisé sur le jeu de données du microbassin D, qui est celui où la méthode DAPC a permis d'identifier le plus de clusters ($k=5$). Les valeurs de F_{ST} par paires des 5 clusters (10 combinaisons) sont comprises entre 0,080 et 0,225 ($M = 0,13$; $\sigma = 0,04$). Si sur le jeu de données du microbassin D, soit l'on casse les éventuels déséquilibres de liaisons (permutation des génotypes dans les locus), soit l'on réalise une population panmictique artificielle en brassant les allèles entre les génotypes d'un même locus et sur tous les locus ; alors la méthode DAPC identifie encore 4 clusters (d'après la valeur du BIC la plus basse, non présenté) pour chacune des deux matrices permutées, donc un de moins par rapport aux données réelles. Cependant, la distribution des valeurs de F_{ST} par paires de clusters obtenues sur les matrices permutées est toujours inférieure (sauf dans 1 cas) à la valeur de F_{ST} la plus petite obtenue sur les données observées (permutation génotypes : F_{ST} compris entre 0,07 et 0,09 ; permutation allèles : F_{ST} compris entre 0,06 et 0,09) (**Figure 33 a**).

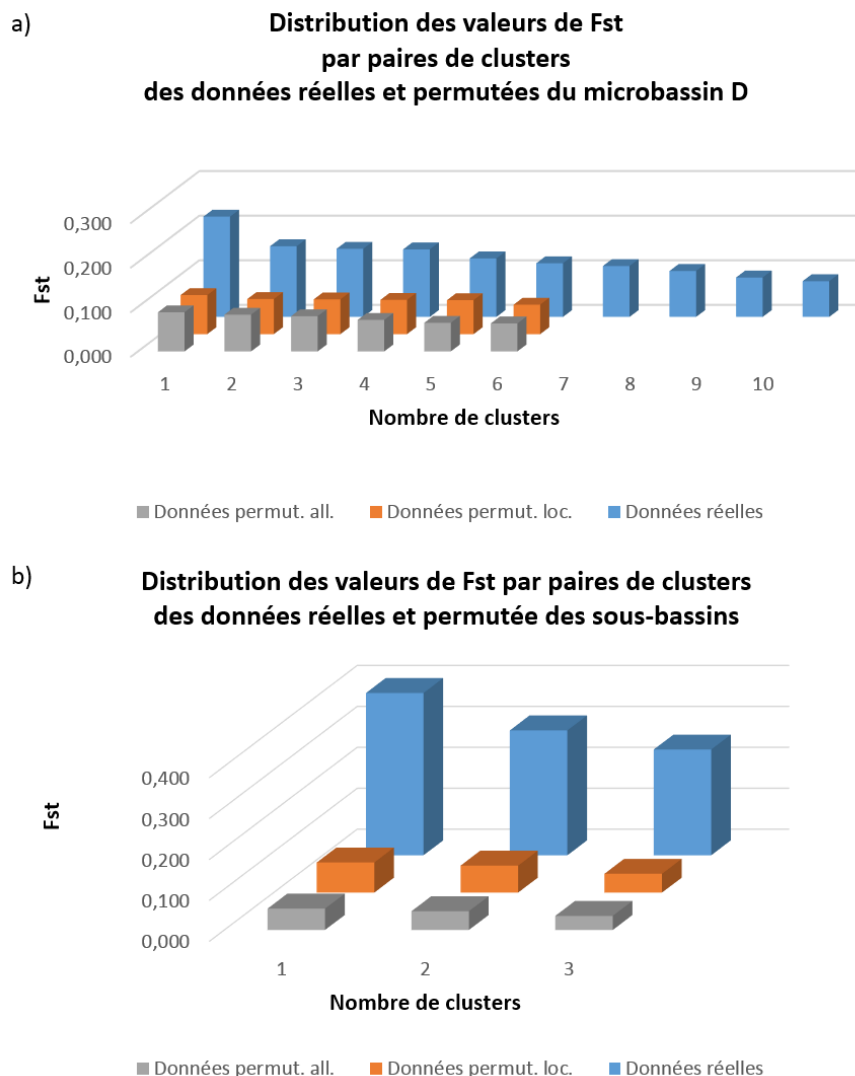


Figure 33 : Test de pertinence de la structure mise en évidence par DAPC. Comparaison des valeurs décroissantes des F_{ST} par paires de clusters obtenus par la méthode DAPC sur les données réelles et permutées **a)** du microbassin D et **b)** des sous bassins. Pour les données du microbassin D, le nombre de clusters (k) optimal a été identifié à partir de la méthode DAPC, pour les données correspondant aux sous-bassins le nombre de k a été imposé pour $k=3$. Perm. Loc. = données permutées sur les locus ; Perm. all. = données permutées sur les allèles

De plus, à l'échelle des sous-bassins versant, nous avons vu précédemment que la méthode DAPC et l'arbre phylogénétique réalisé sur les séquences concaténées (COI et Cyt b) permettaient d'identifier les mêmes unités évolutives Sp1, Sp2 et Sp3. Ces trois unités évolutives sont aussi identifiables sur l'AFC et le dendrogramme des distances génétiques. Nous avons donc considéré que la structure $k = 3$ traduit une réalité biologique et n'est pas un biais de la méthode DAPC. Nous avons cependant effectué sur le jeu de données des sous-bassins (1170 individus) les mêmes opérations de permutations que pour le microbassin D, mais cette fois-ci en imposant le nombre de k pour $k=3$ (que ce soit sur la matrice réelle ou sur les matrices permutées, la méthode DAPC serait capable d'identifier plus de 3 clusters). Les valeurs de F_{ST} par paires de clusters obtenues sur les données permutées sont toujours inférieures à celles obtenues sur les données réelles (**Figure 33 b**). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour le microbassin D.

Sur les matrices réelles, les clusters identifiés ont une cohérence géographique alors que ceux identifiés à partir des matrices permutées ne le sont pas (**Figure 34**). En effet, à partir des matrices permutées, les individus de chaque popsites semblent se répartir à parts grossièrement égales selon le nombre de clusters identifiés (**Figure 34**).

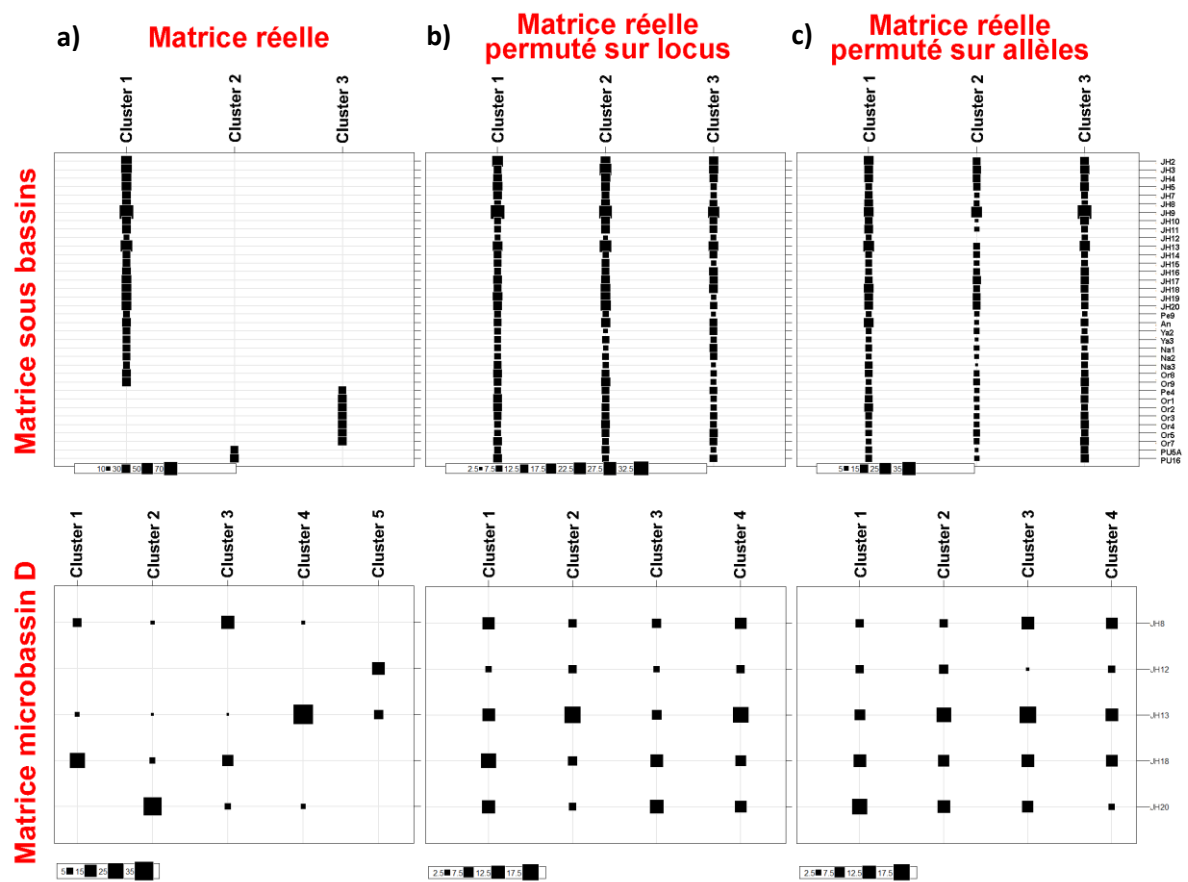


Figure 34. Distribution des individus de chacune des popsites selon les clusters obtenus sur les données : **a)** réelles, **b)** permutées sur les locus, **c)** permutées sur les allèles. En haut sur la matrice des sous bassins (1170 individus, 10 locus microsatellites), en bas sur celle du microbassin D (177 individus, 10 locus microsatellites). La taille des carrés est proportionnelle au nombre d'individus.

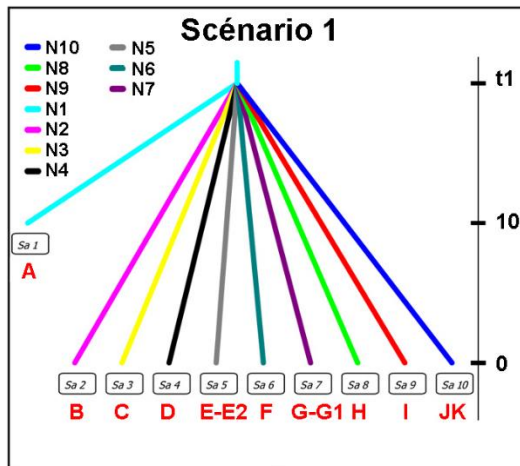
En conclusion de ces tests, nous rejetons l'hypothèse que les clusters identifiés par la méthode DAPC sur les données réelles soient d'origine artificielle et nous acceptons donc ces clusters comme des unités biologiques réelles.

C. II. 5 Scénarios évolutifs de Sp1

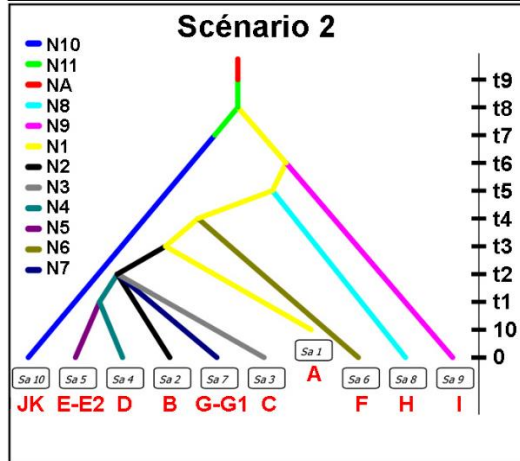
L'histoire évolutive de Sp1 a été testée à partir de différents scénarios réalisés en tenant compte des résultats obtenus sur les données de génétiques, mais aussi de certains événements hydro-géomorphologiques (dynamique fluviale, changements de cours, capture) décrits dans la zone d'étude susceptibles d'avoir favorisé des événements de dispersion et de mélanges entre unités génétiques à l'origine de la structure génétique actuelle observée.

Afin de réduire la complexité des scénarios testés et aussi de diminuer les temps de calculs, nous avons regroupé les individus d'un même microbassin puisque nous avons montré précédemment qu'ils sont en général plus proches génétiquement entre eux qu'ils ne le sont de ceux des autres microbassins. Notre unité taxonomique est donc ici définie par le microbassin et non pas le ruisseau (généralement défini par une seule popsité pour Sp1) ou le cluster. Quelques cas dérogent toutefois à la règle du regroupement en microbassin: les clusters K et J sont soutenus par une valeur de bootstrap de 100 (**Figure 27**), ils sont aussi plus proches génétiquement entre eux qu'ils ne le sont des autres microbassins (**Tableau 11**) et ils sont les seuls de la rivière Marañon (**Figure 20**), ils ont donc été regroupés entre eux et nommés JK; les clusters G1 (N=30) et E2 (N=27) sont les seuls clusters parmi les 24 qui ne se regroupent pas avec ceux de leur propre microbassin, ils pourraient être le produit de contacts secondaires (naturels ou anthropiques), ils ont donc été écartés de l'analyse. Sur le dendrogramme des distances génétiques réalisé entre les clusters, les clusters B1 et B2 sont proches du centre de gravité du dendrogramme (**Figure 27** voir aussi **Figure 19**, B1 et B2 correspondent aux popsites JH3, JH4 et JH5), ils ont donc été regroupés. Finalement, les données ont été réorganisées en 10 entités assimilables à des populations génétiques des microbassins. Elles ont été nommées, A, B, C, D, E-E2 (i.e. microbassin E sans le cluster E2), F, G-G1 (i. e. microbassin G sans le cluster G1), H, I et JK (**Figure 35**).

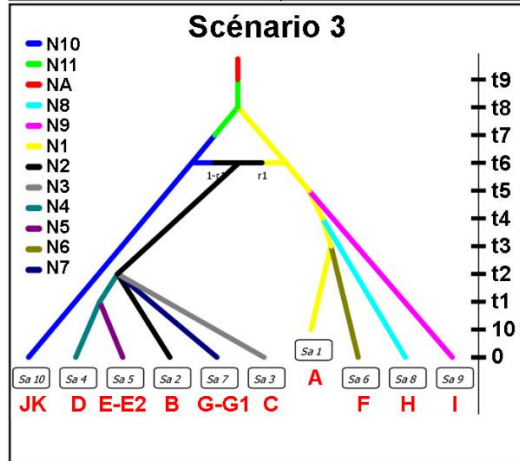
Sept scénarios ont été comparés et testés (**Figure 35**). Selon les estimations directes, les scénarios 1, 5 et 7 sont les meilleurs, cependant à partir de la régression logistique ce sont les scénarios 5 et 7 (**Tableau 15** et **Figure 36**). Pour le scénario 1, la valeur de l'erreur de type I (faux négatif) est de 0,999 et de 0,884 pour la valeur de l'erreur de type II, il est donc hautement probable que ce scénario soit un faux positif. Les valeurs de l'erreur de type I et II pour le scénario 5 sont de 0,180 et 0,160, pour le scénario 7 elles sont respectivement de 0,204 et 0,019. Les scénarios 5 et 7 sont donc les meilleurs des 7 scénarios testés.



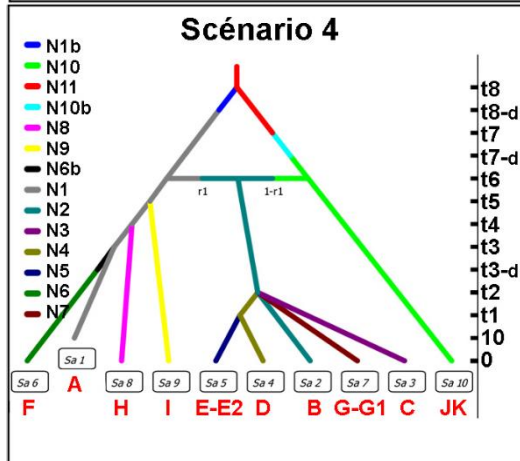
Ce scénario considère que les populations de tous les microbassins auraient radié d'un même ancêtre commun à t1.



Les populations A (Tapiche) et JK (Marañon) auraient commencé à diverger d'un ancêtre commun de taille efficace N11 à t8 (configuration suggérée par la topologie de l'arbre phylogénétique pour JK). Les populations I, H, F et B auraient ensuite commencé à diverger de la population A à t6, t5, t4 et t3, respectivement. Les populations D, G-G1 et C de la région de Jenaro Herrera auraient radié de la population B à t2, puis à t1 la population E-E2 aurait commencé à diverger de la population D. Les événements de divergence à t2 et t1 pourraient être expliqués par la fragmentation d'un microbassin due à la migration de la rivière Ucayali dans la région de Jenaro Herrera.



Les populations A (Tapiche) et JK (Marañon) auraient commencé à diverger d'un ancêtre commun de taille efficace N11 à t8. La population B serait issue du mélange des populations A et JK à t6 (suggéré par la position au centre de la radiation des clusters B1 et B2 sur le dendrogramme des distances génétiques). Les populations I, H, F et B auraient ensuite commencé à diverger de la population A à t5, t4 et t3, respectivement. Les populations D, G-G1 et C de la région de Jenaro Herrera auraient radié de la population B à t2, puis à t1 la population E-E2 aurait commencé à diverger de la population D.



Les populations A (Tapiche) et JK (Marañon) auraient commencé à diverger d'un ancêtre commun de taille efficace N11 à t8. Ces deux populations auraient subi un changement de taille efficace entre t8 et t8-db pour la population A (N1b) et entre t7 et t7-db pour la population JK (N10b). La population B serait issue du mélange des populations A et JK à t6. Les populations I, H et F auraient ensuite commencé à diverger de la population A à t5, t4 et t3, respectivement. La population F aurait subi un changement de taille efficace (N6b) entre t3 et t3-db. Les populations D, G-G1 et C de la région de Jenaro Herrera auraient radié de la population B à t2, puis à t1 la population E-E2 aurait commencé à diverger de la population D.

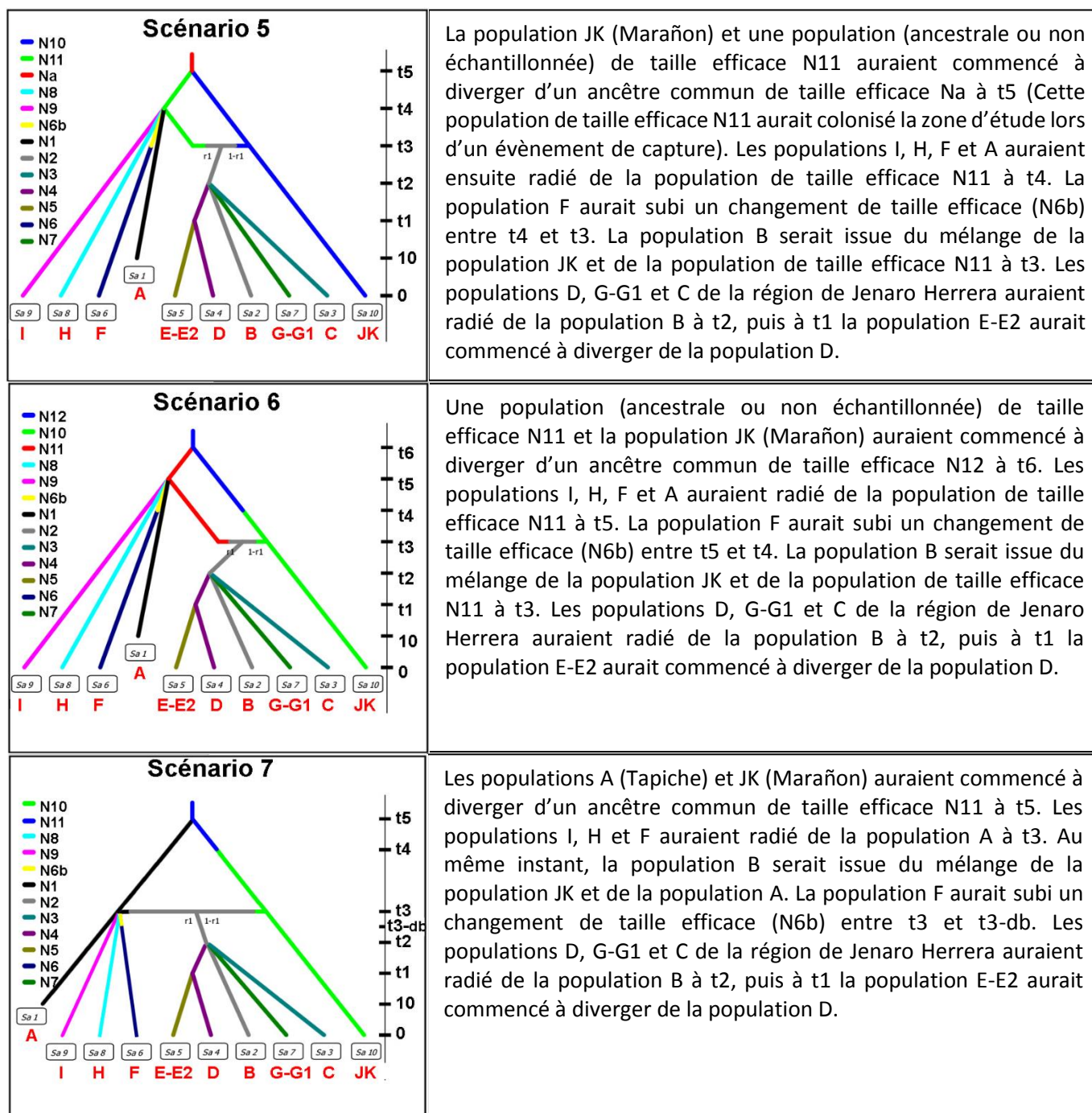


Figure 35. Description des sept scénarios testés par calcul bayésien approché avec le logiciel DIYABC (Cornuet et al. 2015). Les lettres en rouge correspondent aux populations des microbassins de Sp1. La taille efficace de chaque des populations est identifiable par un code couleur

Tableau 15 : Valeurs et intervalle de confiance 95% des probabilités de chacun des scénarios comparés, (1) par estimation directe (2) par régression logistique. Les valeurs en gras sont celles des meilleurs scénarios. Seules les valeurs des erreurs de type I (faux négatif) et de type II (faux positif) sont présentées pour les meilleurs scénarios

	Directe		Régression logistique		Erreur Type I	Erreur Type II
Scénario 1	0,569	[0,136 - 0,989]	0,010	[0,000 - 0,291]	0,999	0,884
Scénario 2	0,000	[0,000 - 0,000]	0,000	[0,000 - 0,000]		
Scénario 3	0,000	[0,000 - 0,000]	0,000	[0,000 - 0,000]		
Scénario 4	0,001	[0,000 - 0,018]	0,000	[0,000 - 0,000]		
Scénario 5	0,122	[0,000 - 0,407]	0,348	[0,283 - 0,413]	0,180	0,016
Scénario 6	0,005	[0,000 - 0,057]	0,053	[0,000 - 0,256]		
Scénario 7	0,304	[0,000 - 0,707]	0,589	[0,530 - 0,649]	0,204	0,019

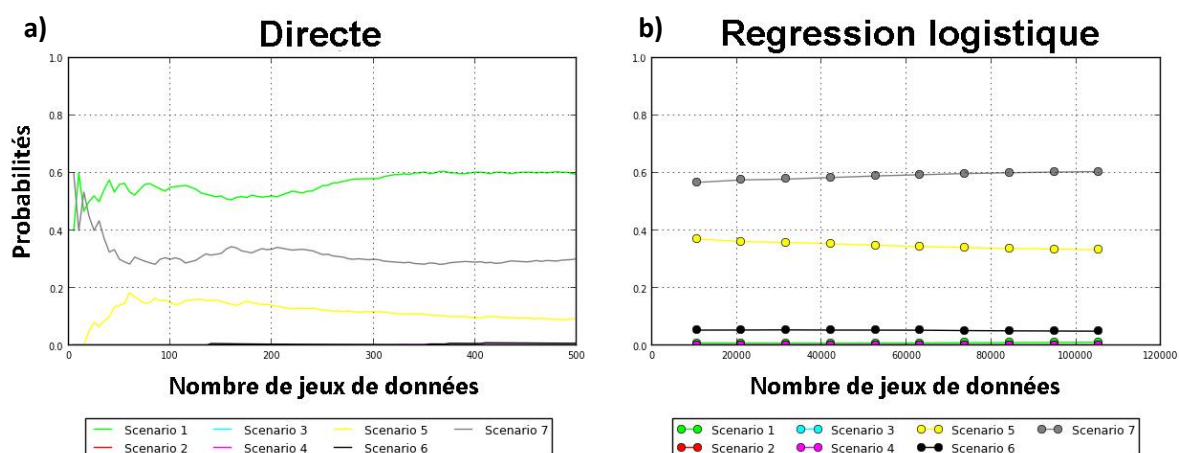


Figure 36. Comparaison des probabilités postérieures des 7 scénarios testés, a) estimées à partir des 500 jeux de données les plus proches des observées, b) estimées à partir d'une régression logistique entre les données simulées et observées sur 1% des jeux de données.

Sur l'ensemble des statistiques résumées utilisés pour tester la qualité du scénario 5, seulement 3 valeurs ($p\text{-value} < 0,05$) sur 400 s'éloignent des observées (**Annexe 9**). Pour le scénario 7, 5 valeurs ($p\text{-value} < 0,05$) sur les 401 statistiques résumées utilisées s'éloignent des observées. À titre de comparaison, pour le scénario 4 le nombre de valeurs s'éloignant des observées est plus élevé (3 valeurs : $p\text{-value} < 0,01$ et 7 valeurs : $p\text{-value} < 0,05$) (**Annexe 9**). Entre les scénarios 5 et 7, le scénario 5 serait donc celui qui explique le mieux les données observées. Pour ce scénario l'ACP montre que les données observées sont incluses dans le nuage de points des données simulées résumées *a posteriori*, ce qui témoigne d'une bonne qualité du modèle (**Figure 37**).

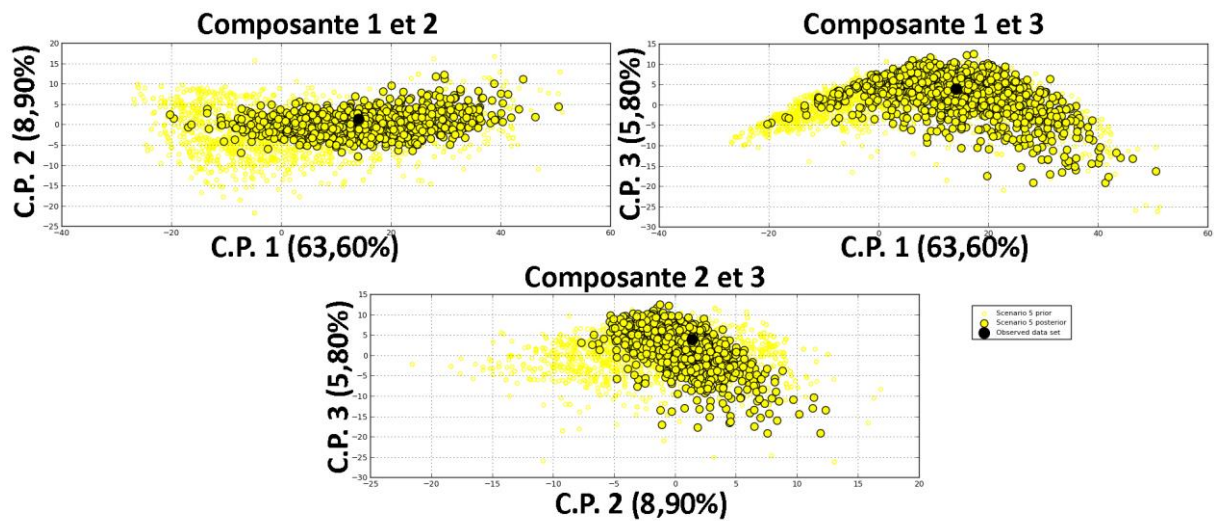


Figure 37. ACP réalisée à partir des jeux de données simulés *a priori* et *a posteriori* en fonction des statistiques résumées pour le scénario 5. Les points jaunes correspondent aux jeux de données *a priori*, les points jaunes cerclés de noir aux jeux de données *a posteriori* et le point noir aux données observées.

D'après les estimations des paramètres pour le scénario 5 les dix populations auraient divergé récemment, la valeur modale de t_5 est de 14 500 générations (IC 95% = [10100 - 87500], **Tableau 16 et Annexe 10**). Les estimateurs de la qualité des estimations des paramètres démographiques (RRMSE et RMedAD) montrent globalement de petites valeurs témoignant d'une bonne précision des paramètres à l'exception de la taille efficace N_a et du taux d'insertion d'un seul nucléotide (snimic) d'après les valeurs du RRMSE (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Valeurs des paramètres démographiques estimés *a posteriori* à partir du scénario évolutif 5 de Sp1. N_1 , N_2 , N_3 , N_4 , N_5 , N_6 , N_6b , N_7 , N_8 , N_9 , N_{10} , N_{11} , N_a correspondent aux tailles efficaces des populations; t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , t_5 correspondent aux temps de divergences en générations et r_1 correspond au taux de mélange. μ_{mic} = taux de mutation des locus microsatellites ; $pmic$ = le taux de répétition des motifs microsatellites et $snimic$ = le taux d'insertion d'un seul nucléotide.

Paramètre	Moyenne	Médiane	Mode	IC 95%	RRMSE	RMedAD
N_1	54700	52900	50200	[24400 - 93600]	0,513 (0,716)	0,288 (0,471)
N_2	50800	51500	53600	[38200 - 59300]	0,190 (0,515)	0,113 (0,400)
N_3	7180	6440	5090	[2970 - 16400]	0,628 (1,405)	0,303 (0,718)
N_4	6830	6880	6950	[3820 - 9590]	0,318 (0,536)	0,182 (0,391)
N_5	4130	3800	3130	[1350 - 8810]	0,664 (1,428)	0,359 (0,657)
N_6	9640	5400	3400	[1510 - 52700]	2,592 (14,497)	0,529 (7,968)
N_{6b}	54800	54700	43700	[8930 - 98000]	4,352 (6,085)	0,591 (0,482)
N_7	6560	5830	4170	[2610 - 15700]	0,713 (1,764)	0,318 (0,822)
N_8	18200	18500	18900	[14900 - 19900]	0,189 (0,492)	0,099 (0,409)
N_9	21400	21600	21300	[12500 - 29100]	0,290 (0,502)	0,173 (0,362)
N_{10}	6330	6310	5930	[3000 - 9570]	0,384 (0,590)	0,236 (0,421)
N_{11}	57500	58400	57700	[10800 - 97500]	1,870 (2,407)	0,448 (0,467)
N_a	22200	13900	1510	[537 - 85400]	49,447 (71,419)	0,850 (2,599)
t_1	1330	1310	1330	[333 - 2510]	0,556 (1,643)	0,337 (0,548)
t_2	1900	1780	1560	[765 - 3640]	0,560 (1,042)	0,298 (0,571)
t_3	5150	4390	3040	[2240 - 12400]	0,955 (1,481)	0,363 (0,809)
t_4	9710	8550	6050	[4410 - 21300]	0,693 (1,404)	0,311 (0,884)
t_5	32300	25600	14500	[10100 - 87500]	1,458 (2,348)	0,469 (1,268)
r_1	0,755	0,782	0,831	[0,377 - 0,96]	0,528 (1,785)	0,141 (0,394)
μ_{mic_1}	5,30E-04	5,19E-04	4,34E-04	[1,56E-04 - 9,28E-04]	1,072 (1,197)	0,400 (0,442)
$pmic_1$	3,46	2,99	2,37	[9,77E-01 - 9]	1,846 (8,205)	0,499 (2,388)
$snimic_1$	7,25E-12	2,33E-13	1,00E-15	[1,00E-15 - 6,69E-11]	9159,530 (8818,680)	0,998 (0,995)

C. III. ISOLEMENT PREZYGOTIQUES À L'ECHELLE DES BASSINS ET DES MICROBASSINS

Au total 157 reproductions ont été obtenues lors des expérimentations sur le choix de partenaire (**Annexe 11**).

Choix de l'environnement lumineux

Le test entre les trois conditions lumineuses (**Figure 10**) a été réalisé pour Sp1 entre les popsites JH13 du microbassin D et JH16 du microbassin E. Dans la condition lumineuse Led, les femelles provenant de la popsite JH13 choisissent préférentiellement des mâles provenant de la popsite JH16 (11 / 13, p -value = 0,001) tandis que celles de la popsite JH16 semblent se reproduire préférentiellement avec des mâles de leur propre origine : 10 femelles ont choisi des mâles de la popsite JH16 et 5 de la popsite JH13 malgré tout le test statistique n'est pas significatif (N= 15, p -value de 0,092).

Dans la condition lumineuse fluo, les femelles JH13 choisissent préférentiellement des mâles JH16 (10 / 13, p -value = 0,035) et les femelles JH16 choisissent préférentiellement des mâles JH16 (12 / 15, p -value = 0,014). Ce choix est encore plus prononcé dans la condition lumineuse Led/UV (JH13 avec JH16 : 10 / 11, p -value = 0,005 et JH16 avec JH16 : 12 / 13 p -value = 0,002).

Les tests de χ^2 réalisés par paire de conditions lumineuses et pour chacune des deux popsites montrent qu'il existe des différences significatives entre les traitements. Cette différence est cependant liée à l'intensité du choix. Celui-ci a tendance à être plus marqué lorsque les conditions de luminosités associent une lumière led et un éclairage fluorescent riche en UV, donc quand elles couvrent une plus grande proportion du spectre lumineux naturel. Nous avons donc choisi ce type d'éclairage pour poursuivre les expérimentations.

Isolement prézygotique entre sous bassins « espèces »

Les femelles Sp1 et Sp2 choisissent préférentiellement des mâles de leur propre « espèce » (Sp1 : 14 / 15, p -value = 0,0005 ; Sp2 : 11 / 12, p -value = 0,0029).

Aucune comparaison n'a pu être effectuée avec Sp3 car les mâles de cette espèce, plus petits au moment de la collecte, n'ont jamais pu rattraper la taille des mâles des deux autres espèces.

Isolement prézygotique dans Sp1 entre microbassins

Dans la configuration JH13 (microbassin D) vs JH4 (microbassin B), les femelles semblent choisir les mâles JH4 et JH13 au hasard (JH4 : N= 11, p -value = 0,2256 ; JH13 : N= 16, p -value = 0,1746). Alors que dans la condition JH13 vs JH16 nous avons vu précédemment que les femelles provenant de la popsites JH13 choisissaient préférentiellement des mâles provenant de la popsite JH16 (10 / 11, p -value = 0,005) tandis que celles de la popsite JH16 se reproduisaient préférentiellement avec des mâles de leur propre origine (12 / 13, p -value = 0,002). Le choix des femelles JH13 change donc en fonction de la configuration testée, cela montre qu'elles sont capables de distinguer des mâles selon leur origine.

Isolement prézygotique dans Sp1 entre ruisseaux du microbassin D

Lors de l'expérimentation JH13 (D) vs JH18 (D), les femelles JH18 ont choisi préférentiellement des mâles provenant de la popsite JH13 (9 / 11, $p\text{-value} = 0,027$) alors que les femelles JH13 semblent avoir choisi les mâles au hasard ($N = 12$, $p\text{-value} = 0,194$).

Il est intéressant de remarquer que quel que soit l'échelle géographique considérée, les femelles d'une popsite semblent être capables de distinguer des mâles de leur popsite d'origine et d'autres popsites.

La bonne méthodologie pour tester le choix de partenaire aurait été de tester la sélection sexuelle entre clusters et non entre popsites, mais la popsite a été considérée comme l'unité de comparaison minimale après les premières analyses génétiques. Ces analyses ont été réalisées sur des individus provenant de la région de Jenaro Herrera en utilisant le programme STRUCTURE. Le programme identifiait sur les données de Jenaro Herrera une unité génétique par réseau de ruisseaux. À l'issue de ces premières analyses, une mission de collecte a été organisée dans la région de Jenaro Herrera pour prélever et faire grandir des individus pour pouvoir réaliser les expérimentations sur le choix de partenaire. C'est par la suite qu'en réalisant des analyses avec la méthode DAPC que nous nous sommes rendu compte qu'il existait de la structure génétique à l'intérieur des microbassins.

D. DISCUSSION

1) À l'échelle des sous bassins versants : spéciation allopatrique

La plupart des descriptions taxinomiques actuelles ont été réalisées à partir de caractères morphométriques. À l'heure de la biologie moléculaire, ce type de description montre des limites et notamment dans les cas d'espèces cryptiques où la différenciation morphologique n'est pas toujours observable. Le risque est que certaines espèces décrites sur ces caractères soient en réalité des complexes d'espèces sous-estimant d'une part la biodiversité (Briscoe et Tait, 1995, Rocha- Olivares et al., 2001 ; Frankham et al., 2002) et d'autre part, biaisant la gestion du statut de protection des espèces (Bowen et Avise, 1996 ; Frankham et al., 2002). Cependant ces deux approches, morphométrique et génétique, devraient être (lorsque c'est possible) complémentaires pour définir au mieux les contours taxinomiques des espèces (Novo et al., 2012). Le genre *Apistogramma* n'échappe pas à ces problèmes d'identifications taxinomiques (Britzke, 2015, Tougard et al., 2017) d'autant plus que certaines descriptions ont été réalisées sur un nombre limité d'individus (Schindler et Staeck, 2013). La large distribution d'*A. agassizii* à l'échelle de l'Amazonie est plutôt atypique pour une espèce de ce genre. Plusieurs auteurs ont avancé qu'il pourrait s'agir d'espèces distinctes (Römer, 2000, 2006 ; Koslowski, 2002 ; Britzke, 2015 ; Tougard et al., 2017). C'est ce que confirme notre étude. Il existe dans la petite portion d'Amazonie péruvienne étudiée, au moins 3 entités qui représenteraient des « espèces » génotypiques, phylogénétiques voire biologiques (Mayr, 1942 ; Hennig, 1966 ; Cracraft, 1989 ; Mayden et Wood, 1995 ; Mallet, 1995), actuellement regroupés sous le nom d'*A. agassizii*. D'après les calibrations réalisées à partir de celles de Genner et al. (2007) ces 3 « espèces » auraient divergé entre 1,83 (fragmentation du Gondwana) et 5,31 Ma (datation fossile). Si l'on considère une autre calibration indépendante réalisée sur des poissons de récif, basée sur la fermeture de l'isthme de Panama (DiBattista et al., 2013), elles auraient divergé entre 1,65 Ma (taux de mutation du gène de la COI et de la Cyt b de 1% par Ma) et 0,82 Ma (taux de mutation du gène de la COI et de la Cyt b de 2% par Ma). Le taux de mutation de 1 % par Ma est donc cohérent avec celui obtenu à partir de la calibration fossile utilisé par Genner et al. (2007) (respectivement, 1,65 Ma et 1,83 Ma). Ces trois « espèces » Sp1, Sp2 et Sp3, sont isolées génétiquement les unes des autres, comme le montre la DAPC et la phylogénie des marqueurs concaténés du gène de la COI et de la Cyt b. Le fait que la DAPC montre 3 clusters totalement disjoints signifie qu'il n'y a pas eu d'introgessions nucléaire récente ni la présence de migrants entre les aires de répartition des trois « espèces ». La phylogénie des séquences concaténées (COI et Cyt b) quant à elles ne montrent pas d'introgessions mitochondriales entre « espèces ». Les résultats étayent l'hypothèse d'une distribution en mosaïque « d'espèces » biologiques formées ou en formation.

La répartition des 3 « espèces » est compatible avec l'effet barrière des grands fleuves (Wallace, 1854), ce qui a déjà été observé dans d'autres groupes de poissons amazoniens (Hubert et Renno, 2006). Les grandes rivières peuvent ainsi limiter le flux génétique entre les populations de différentes régions, favorisant la spéciation allopatrique ou parapatric. Les « espèces » Sp2 et Sp3 sont les plus proches du point de vue phylogénétique. Elles sont distribuées sur la rive gauche du fleuve Amazone et sont séparées l'une de l'autre par la rivière Napo (**Figure 15**, Sp2 en vert, Sp3 en rouge). L'espèce Sp1 est plus largement distribuée que les autres et a été observé principalement sur les rives droites de la rivière Ucayali et de l'Amazone, mais aussi sur la rive gauche de la rivière Marañon (**Figure 15**, Sp1 en bleu). Les populations de la région du Marañon sont les plus différenciées des autres populations de Sp1 et l'on peut émettre l'hypothèse que le fleuve jouant un rôle de barrière accentue la divergence. Il faut ici souligner que les 3 « espèces » n'ont jamais été rencontrées en sympatrie stricte dans la zone

étudiée, c'est-à-dire dans le même microbassin. Les expérimentations sur le choix de partenaire et les données de génétiques confirment l'isolement prézygotique à la reproduction pour Sp1 et 2, il est probable qu'il en soit de même pour Sp3.

La formation du cours moderne de l'Amazone correspond à la transition du système Pebas au système de l'Acre. Auparavant, l'Amazonie était divisée en deux parties : à l'Ouest, elle était recouverte par un vaste système de zones humides, le lac Pebas (Hoorn et al., 2010 ; Latrubesse et al., 2010), et à l'Est un système fluvial « proto-Amazonien » qui fluait vers l'océan atlantique (Shephard et al., 2010). Ces deux paléoenvironnements étaient séparés l'un de l'autre par l'arc du Purus. La datation de la transition entre le système Pebas et le système de l'Acre est très controversée. Certains auteurs datent cette transition aux environs de 10 Ma (Hoorn et al., 2010, 2017 ; Shephard et al., 2010) voire 5 Ma (Latrubesse et al., 2010). Campbell et al. (2006) suggèrent même que le système Pebas se serait maintenu à travers un complexe de méga-lacs interconnectés entre eux jusqu'à 2,5 Ma voire 1 Ma. Ces dernières datations sont cohérentes avec celles obtenues dans la zone d'étude. Selon la synthèse du projet RADAMBRESIL (1977), la région d'étude était couverte par la « formation pebas » entre 7 et 2 Ma. La découverte d'os de vertébrés proche de la ville d'Iquitos suggère un âge du pléistocène inférieur (vers 2 Ma) pour les niveaux les plus hauts de la formation Pebas. La formation Pebas est recouverte, dans la zone d'étude, par la formation Ipururo qui marque le passage d'un environnement lacustre (probablement le lac Pebas) à un système fluvial (probablement le cours moderne de l'Amazone). Ces datations dans la zone d'étude sont cohérentes avec celles de Campbell et al. (2006) à l'échelle de l'Amazonie. Une étude très récente (Oberdorff et al., 2019) réalisée à partir de la base de données la plus complète obtenue pour des espèces de poissons à l'échelle de l'Amazonie, suggère que la formation du cours actuel de l'Amazone est très probablement récente, environs 2,5 Ma. Les auteurs ont montré qu'il existe un gradient de diversité spécifique qui diminue depuis l'amont vers l'aval de l'Amazone. Un patron similaire, avait déjà été observé par Hubert et Renno (2006). Ce patron est atypique puisque l'inverse est généralement observé dans les systèmes fluviaux mondiaux. Cette particularité de l'Amazone serait due à son jeune âge. Lorsque l'Amazonie était divisée en deux parties, la partie ouest était composée d'un paléoenvironnement beaucoup plus stable que la partie Est. En effet, la partie Est aurait connue plusieurs incursions marines qui auraient entraîné l'extinction de nombreuses espèces de poissons d'eau douce. Le cours actuel de l'Amazone serait en cours de colonisation par les espèces qui se sont formées et maintenue dans la partie ouest. Les datations de 2 Ma (RADAMBRESIL, 1977) et 2,5 Ma (Campbell et al., 2006 et Oberdorff et al., 2019) suggérées par les auteurs correspondent approximativement au moment où les trois « espèces », Sp1, Sp2 et Sp3 auraient commencées à diverger de leur MRCA d'après la calibration fossile (1,83 Ma). Le début de la divergence des trois espèces serait donc concomitant à la formation du cours moderne de l'Amazone. Leur spéciation pourrait avoir été initiée lors de la transition du lac Pebas (ou d'un méga lac) à un système fluvial dans la zone d'étude (RADAMBRESIL, 1977). Il est probable que l'ancêtre commun le plus récent (MRCA) aux trois « espèces » était présent dans ce milieu lacustre / marécageux. Les trois « espèces » affectionnent tout particulièrement ce type d'habitat, il en était sans doute de même pour leur MRCA. Lors de la transition du système lacustre au système fluvial, des populations du MRCA se sont probablement isolées dans certains cours d'eaux qui alimentaient le lac. Cette hypothèse est complémentaire avec celle du rôle barrière des grands cours d'eau dans la différenciation des trois « espèces ». En effet, la transition à un système fluvial aurait fragmenté l'aire de distribution du MRCA et aurait maintenu l'isolement génétique entre les populations favorisant leur spéciation allopatrique.

2) À l'échelle des microbassins : spéciation en mosaïque d'espèces d'*A. agassizii*

Pour Sp1, pour les microbassins dans lesquels plusieurs clusters ont été identifiés les clusters sont toujours rencontrés en mélange dans un même ruisseau (de 2 à 5 clusters), à l'exception du ruisseau de la porspité JH12 du microbassin D. Ils sont donc, dans un même microbassin, en sympatrie stricte (**Figure 26**). Ces clusters sont en général plus proches entre eux génétiquement qu'ils ne le sont des autres clusters appartenant à d'autres microbassins et cela même lorsque les embouchures sont proches comme entre celles des microbassins C et D, qui sont situés sur la même rive de l'Ucayali. Ces microbassins sont espacés de seulement 500 m, cela semble confirmer la faible mobilité des individus de *A. agassizii* et le rôle barrière des grandes rivières même quand il n'est pas nécessaire de les traverser. Le fait que des clusters se soient différenciés en sympatrie, de façon indépendante et répété dans différents microbassins rend peu probables de multiples contacts secondaires regroupant des « clusters frères » dans les cinq microbassins (B, C, D, E et G). Il semble aussi très peu probable que la structure trouvée par la méthode DAPC soit artéfactuelle : (1) si les clusters identifiés étaient artéfactuels, alors ils ne devraient pas avoir une cohérence géographique or les clusters sont organisés par ramifications, (2) si dans un même micro bassin il n'y avait pas de structure nous aurions dû obtenir les mêmes niveaux de F_{ST} sur les données réelles et permutées, (3) les valeurs de F_{ST} obtenues après avoir cassé les déséquilibres de liaisons et créé une population panmictique été inférieures à celles obtenues à partir de la matrice réelle, (4) à travers deux analyses indépendantes (pour les microbassins E et G), la méthode DAPC a identifié que le cluster E2 était plus proche génétiquement des clusters G2 et G3 que des clusters E1, E3 et E4 présent dans le même microbassin. Il paraît peu probable que la méthode puisse identifier artéfactuellement des structures génétiques apparentées à partir de deux analyses indépendantes. Pour terminer, il est peu vraisemblable que des artéfacts engendrent des images de distributions des clusters aussi contrastés entre espèces. Alors que les clusters de Sp1 sont principalement organisés dans les ruisseaux des microbassins, pour Sp2 sur 7 porspités échantillonnées 4 (Or2, Or3, Or 4 et Or 5) ne présentent pas de cluster majoritaire.

Les valeurs de différenciations entre les clusters appartenant à un même microbassin sont remarquables et d'autant plus à l'échelle géographique considérée. Dans le microbassin D la valeur de F_{ST} entre les clusters D5 et D2 atteint 0,22. Quels mécanismes engendrent et maintiennent ces clusters en sympatrie ?

La sélection sexuelle pourrait-elle être un de ces mécanismes? Malheureusement les expérimentations réalisées sur le choix de partenaire ne permettent pas encore de répondre à cette question. En effet, elles n'ont pas été réalisées entre clusters présents dans un même microbassin mais entre porspités pouvant intégrer plusieurs clusters. Malgré tout, les résultats obtenus pendant les expérimentations sur le choix de partenaire montrent que les femelles de certaines porspités sont capables de reconnaître un phénotype de mâle particulier en fonction de son origine (même en sympatrie), alors que pour nous les morphotypes de couleurs présentés aux femelles étaient les mêmes. Reconnaisent-elles une couleur particulière, invisible pour l'œil humain ? Une odeur ? Un comportement ? Des signaux acoustiques ? La bonne méthodologie pour tester le choix de partenaire aurait été de tester la sélection sexuelle entre clusters et non entre porspités, mais la porspité a été considérée comme l'unité de comparaison minimale après les premières analyses génétiques et les expérimentations étaient déjà presque terminées quand nous avons réalisé les analyses génétiques intra-ruisseaux. Afin de comprendre les résultats expérimentaux obtenus, il faudrait génotyper chacun des poissons utilisés dans les expériences d'appariement déjà réalisées. Par la suite, pour tester au mieux la sélection sexuelle, il faudrait génotyper les individus avant de les confronter, en se guidant sur leur cluster

d'appartenance. La mise en évidence d'une sélection sexuelle liée aux clusters validerait aussi ces derniers sur un critère biologique et non plus statistique.

À ce stade de notre étude, il apparaît que les « espèces » Sp1, Sp2 et Sp3 découvertes dans l'espèce morphologique *Apistogramma agassizii*, pourraient être des « species flocks » à différents stades de différenciation et dont les limites géographiques sont contenues par des rivières jouant le rôle de barrières à la migration. L'évolution dans le modèle d'étude *A. agassizii* conduirait à des spéciations à divers niveaux d'intensité, avec une différenciation génétique fractale à différentes échelles géographiques : du bassin versant avec la séparation de grands complexes d'espèces, au microbassin avec la différenciation de populations, de proto espèces, parfois d'espèces.

3) Contexte historique : scénario de dispersion dans le « species flock » Sp1 dans la zone d'étude

Selon les résultats obtenus pour le scénario 5 et le contexte historique de la zone d'étude, il y a environ 14 500 générations (IC 95% [10 100 – 87 500]) la lignée de l'actuelle population du Marañon (JK) était probablement déjà distribuée sur la rive gauche de la rivière Marañon et peut-être même le long de l'Amazone (**Figure 38** cf. t5). Si l'on considère, de façon très conservative (en captivité la maturité sexuelle d'*A. agassizii* est généralement atteinte en 6 voire 4 mois ; Römer, pers. com.), que le temps de génération est d'une année, alors la population JK (Marañon) serait présente dans la zone d'étude depuis moins de 87 500 ans. À cette époque, la rivière Ucayali était connectée à la rivière Marañon 75 km en amont de sa position actuelle (Dumont, 1991, **Figure 38** cf. schéma). Les micro bassins de la région de Jenaro Herrera (B, C, D, E, F, G) devaient donc probablement former un seul bassin qui se connectait à l'actuel Marañon (**Figure 38** cf. t5). Ce bassin avait probablement été colonisé par des individus de la lignée de l'actuelle population du Marañon.

À cette époque, la réactivation d'une faille Sud-Est (au niveau du microbassin A) dans la dépression d'Ucamara (délimitée par le Marañon et l'Ucayali), a favorisé des changements rapides (i.e. avulsions) des cours des rivières Ucayali et Marañon (Sébrier et al., 1985 ; RADAMBRASIL, 1977 ; Räsänen et al., 1987). La rivière Ucayali a dans la zone d'étude changé au moins deux fois de cours en se déplaçant successivement vers l'est. D'après Dumont (1991) la plaine de migration fluviale actuelle de la rivière Ucayali dans la région de Jenaro Herrera est postérieure à 13 000 ans. Dans la même région, les terrasses du quaternaire (i.e. anciennes plaines de migrations fluviales) les plus anciennes de la rivière Ucayali auraient approximativement 40 000 ans (Dumont et al., 1988). On peut donc supposer que l'Ucayali est présente dans la région de Jenaro Herrera depuis environ 40 000 ans. Toutes les populations de la zone d'étude (à part JK) seraient issues d'un évènement de dispersion selon un gradient amont aval (**Figure 38** cf. t4 (a)). Cet évènement de dispersion pourrait être le résultat d'un glissement de terrain dans la région du microbassin A. En effet, la partie amont du cours actuel de la rivière Blanco était auparavant connectée à la rivière Gálvez (segment rouge **Figure 38** t4 (b)), lors du glissement de terrain, la partie amont de la rivière Blanco aurait capté celle de la rivière Gálvez et celle-ci se serait littéralement vidée dans la rivière Blanco entraînant avec elle la population de taille efficace N11 (non échantillonnée). Cet évènement de déconnexion a été mentionné dans la littérature (Pitman et al., 2015). Cette partie de l'histoire évolutive de Sp1 est la plus spéculative car la rivière Yavarí n'a pas été échantillonnée dans le cadre de notre étude. Nous savons malgré tout qu'*A. agassizii* y est présent et d'après les photos de mâles prises sur le terrain (proche du rio Gálvez) par Tom Christoffersen (un ichtyologue norvégien) nous avons identifié le phénotype de Sp1 (**Figure 39**).

Cet évènement de glissement de terrain aurait eu lieu il y a 6050 ans (IC 95% [4410 – 21300 ans]). Les individus présents dans l'ancien cours de la rivière Gálvez (N11) se seraient dispersés vers l'aval colonisant : 1) le microbassin A ; 2) un ancien microbassin composé par les microbassins B, C, D, E, F

et G ; 3) le microbassin H ; 4) le microbassin I (**Figure 38**, t4 (a) et t4 (b)). Cet évènement pourrait expliquer le gradient de richesse allélique observé de l'amont vers l'aval.

Lors de la colonisation de l'ancien microbassin de la région de Jenaro Herrera (B, C, D, E, F et G), les individus de la population N11 se seraient mélangés avec la lignée JK déjà présente dans la plupart de ruisseaux du microbassin il y a 3040 ans (IC 95% [2240 - 12400]) (**Figure 38**, t3). Puis, au fur et à mesure de l'érosion par l'Ucayali des terres hautes de la région de Jenaro Herrera l'ancien microbassin se serait fragmenté et les populations isolées auraient divergé (**Figure 38** t2 et t1).

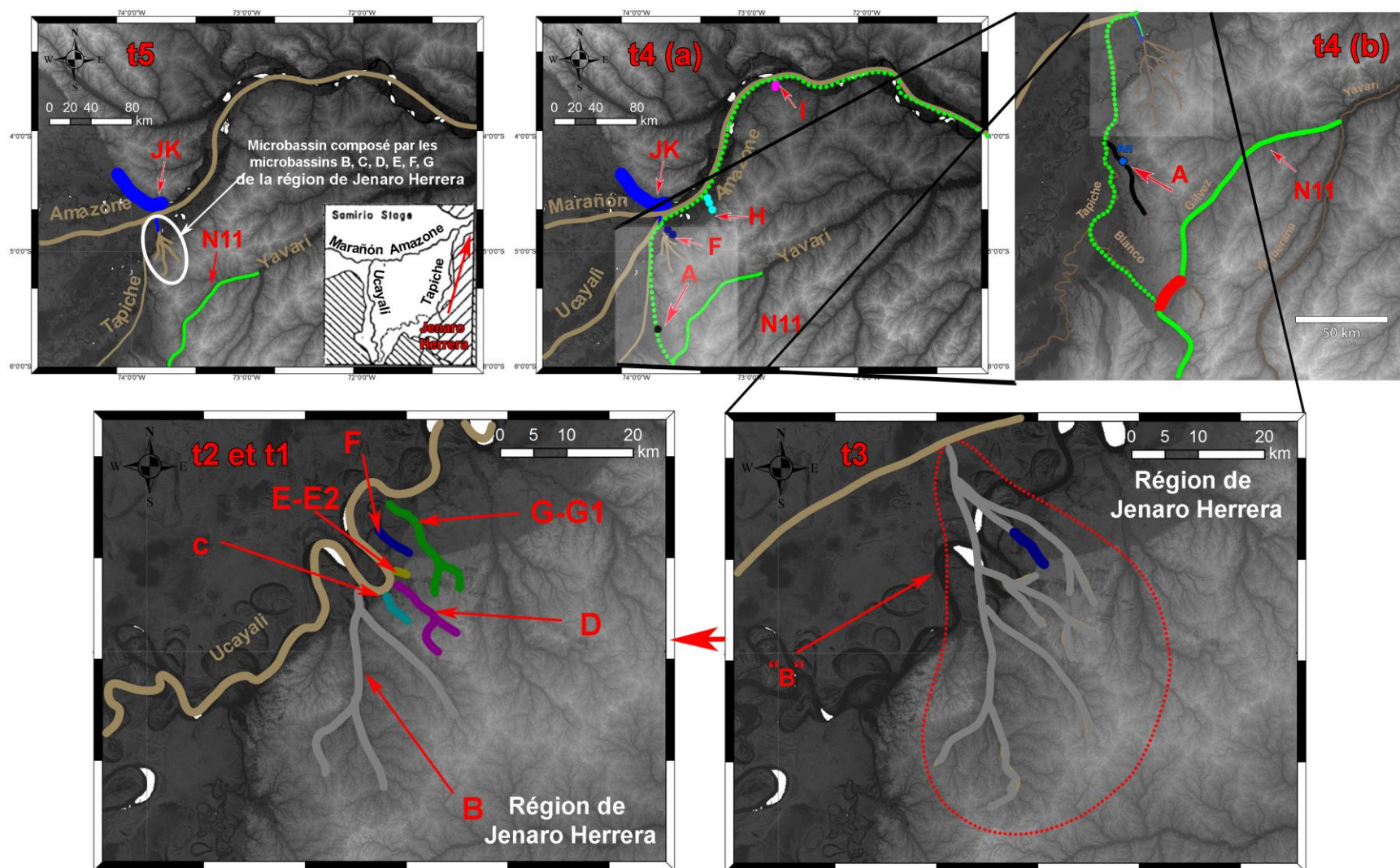


Figure 38. Histoire évolutive de Sp1 dans la zone d'étude en fonction du scénario 5. Le code couleur utilisé est identique à celui utilisé pour identifier les tailles efficaces des unités évolutives (correspond globalement aux microbassins) dans le scénario 5. Pour t5, la flèche sur le schéma indique la position de Jenaro Herrera. Pour t4 (b) les pointillés rouges correspondent à la zone de déconnexion du rio Galvez. Pour t3 l'enveloppe en pointillés rouge délimite grossièrement (non exact) l'ancien microbassin.

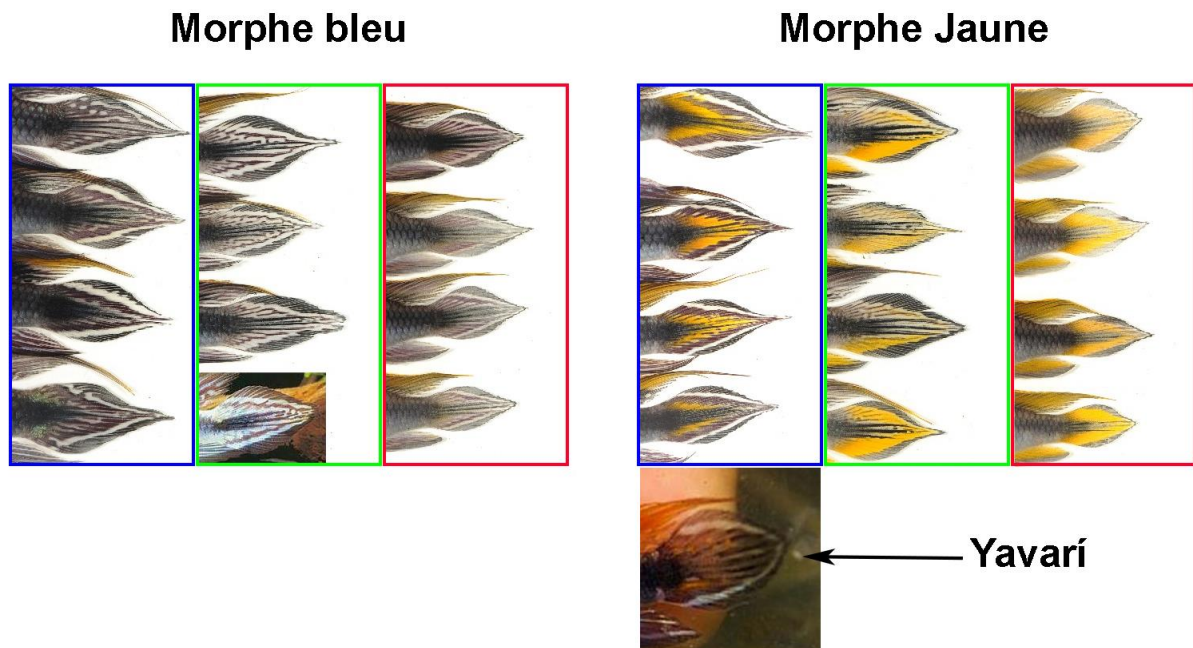


Figure 39. Phénotype de *A. agassizii* du sous bassin du Yavarí (Gálvez) identifié comme appartenant au morphotype de Sp1. La photo a été prise sur le terrain par Tom Christoffersen.

4) Les moteurs de la spéciation chez Sp1

Spéciation allopatrique

La zone d'étude aurait été colonisée par un nombre important d'individus lors de la capture de l'amont de la rivière Gálvez par la rivière Blanco (population N11), l'estimation de sa taille efficace est de 57700 individus [10800 - 97500]. Ces individus se seraient dispersés depuis l'amont (microbassin A) vers l'aval (microbassin I). Les microbassins A, B, H et I ont les plus grandes superficies le long du gradient amont aval ils mesurent 893, 485, 754 et 360 km² respectivement alors que les microbassins C, D, E, F et G mesurent 23, 74, 8, 11 et 93 km², respectivement. Les populations des microbassins A, B, H et I sont aussi celles ayant les plus grandes tailles efficaces (**Tableau 16**). En ce qui concerne les microbassins C, D, E, F et G, plusieurs facteurs auraient pu affecter leur taille efficace. Toutes les populations de Sp1 présentent des valeurs observées de l'indice M_{GW} (indice de Garza et Williamson) inférieures à 0,70 (**Annexe 10**). D'après Garza et Williamson (2001), cela signifie qu'elles ont toutes connue des événements de réduction de tailles efficaces, ce qui est cohérent avec des événements de colonisation récents, d'effets fondateurs mais aussi sous l'effet de la sélection.

Bien qu'il y aurait eu un événement massif de dispersion dans la zone d'étude, il semblerait que cet événement ait été exceptionnel et ne soit pas directement lié aux capacités colonisatrices de Sp1. En effet, la structure génétique observée par microbassin et à l'intérieur des microbassins témoigne d'une faible capacité de colonisation de Sp1. Cependant, due au fait même de la configuration des analyses par microbassin nous ne sommes pas en mesure d'évaluer un taux de migrants entre microbassins. La structure observée pourrait être expliquée par une différenciation en allopatrie ou en parapatricie due au rôle barrière du Marañon, de l'Ucayali et de l'Amazone. Deux mécanismes : 1) lors de la dérive des individus de la population N11 le long du gradient amont-aval, ils se seraient réfugiés dans les microbassins, l'Ucayali et l'Amazone auraient ensuite limité le flux génique entre les microbassins ; 2)

la structure observée entre microbassins dans la région de Jenaro Herrera serait le résultat de la fragmentation d'un ancien microbassin puis à la limitation du flux génique par l'Ucayali.

Spéciation sympatrique

Comment, à l'intérieur des micros bassins, des groupes d'individus auraient divergé en sympatrie. La sélection sexuelle pourrait-elle être impliquée dans le processus de spéciation ?

D'après Servedio et Boughman (2017), même si la sélection sexuelle contribue à la spéciation, il est possible qu'elle ne puisse ni initier le processus ni le finaliser. Plusieurs études réalisées sur des cichlidés des grands lacs africains ont montré que même si du point de vue géographique le processus de spéciation s'est réalisé en sympatrie, elle implique une structuration spatiale à petite échelle comme des micros habitats (Seehausen et Magalhaes, 2010 ; Seehausen 2015). Dans notre cas c'est la structure même des micros bassins qui auraient pu amorcer la différenciation génétique. En effet, un réseau hydrique est un système arborescent qui s'étend dans une direction. Il s'agit d'un système hiérarchisé de nœuds et de branches distribués de l'amont vers l'aval. Des études chez des invertébrés (Elliott, 1971, Vinson et Hawkins, 1998), des amphibiens (Grant et al., 2010) mais aussi des poissons (Hanfling et Weetman, 2006 ; Crispo et al., 2006) ont montré que les flux de migrants étaient asymétriques dans de tels environnements, celui-ci ayant tendance à suivre le sens du courant. L'asymétrie est d'autant plus liée aux capacités de colonisation propre à l'espèce étudiée mais aussi à la topologie du terrain. Le flux de migrants étant asymétrique et le système hiérarchisé, les échanges entre populations ne sont pas aléatoires. Ces caractéristiques sont susceptibles d'avoir une forte influence sur la structure génétique d'une métapopulation (Campbell Grant et al., 2007, Labonne et al., 2008 ; Morrissey et Kerckove, 2009). Muneeppeerakul (2008) et Morrissey et Kerckove (2009) ont montré à partir de modèles prédictifs, que si la migration vers les populations situées dans les ruisseaux (têtes de bassins) est limitée (attendu si la migration est asymétrique), alors ces populations peuvent diverger (par mutation, dérive génétique ou sélection) et constituer dans le bassin des réservoirs d'allèles potentiellement uniques. L'organisation des clusters dans les microbassins pourraient laisser suggérer ce type de phénomène. En effet, tous les ruisseaux échantillonnés appartenant à un même microbassin (C, D, E et G) présentent des clusters majoritaires ($\geq 47\%$, **Figure 26**). Bien qu'il existe dans la plupart des cas plusieurs clusters dans un même ruisseau, les clusters majoritaires y sont toujours différents. Si dans un même microbassin, l'organisation des clusters dans les ruisseaux était aléatoire alors nous devrions rencontrer des cas où un cluster serait majoritaire dans plusieurs ruisseaux, ce n'est pas le cas. Ce type d'organisation pourrait laisser suggérer que les clusters majoritaires pourraient avoir divergé dans les ruisseaux alors que les clusters minoritaires (qui sont majoritaires dans d'autres) auraient colonisé le ruisseau et le nombre de migrants dépendrait de la localisation (mais aussi l'accessibilité, la topologie) de leur ruisseaux « mère » dans le système hiérarchisé. C'est ce que pourrait laisser suggérer les patrons de distributions des individus des clusters dans les microbassins (**Figure 26**). En effet, il semblerait que les ruisseaux les plus proches (liés par un seul nœud) soient susceptibles de présenter une plus grande proportion d'individus du cluster majoritaire de l'autre ruisseau (cf. microbassins C, D et E, **Figure 26**)

Parmi les 24 clusters identifiés pour Sp1 deux clusters ne s'organisaient pas avec les clusters de leur propre micro bassin, les clusters E2 et G1. Il pourrait s'agir de contacts secondaires, en particulier pour le cluster E2. Ce contact secondaire pourrait être d'origine anthropique. En effet, depuis le cas de translocation de la popsité Pe9, nous savons que certains pêcheurs de poissons ornementaux pourraient avoir réalisés des translocations et des introductions dans la zone d'étude. Le cluster E2 est proche génétiquement des clusters G2 et G3. Le réseau G est facilement accessible par la piste, c'est le seul que nous ayons échantillonné dans la zone d'étude en nous y déplaçant en voiture. Il est possible que des poissons de ce réseau aient été collectés (favorisé par leur facilité d'accès) et

introduits dans le ruisseau de la popsité JH14 (qui forme une mare à cet endroit) proche de la ville de Jenaro Herrera. Quant au cluster G1, il semble peu probable qu'il ait été introduit dans le réseau G par l'homme. En revanche, ce cluster pourrait avoir conservé du polymorphisme ancestral de la lignée de la population JK (Marañón).

Les populations auraient divergé en sympatrie en raison de caractéristiques similaires à celles décrites pour les cichlidés des grands lacs africains : (1) caractère philopatrique, (2) discontinuités d'habitats, (3) choix préférentiel de partenaire et (4) particularité des systèmes dendritique hiérarchisé favorisant une migration asymétrique. La sélection sexuelle aurait maintenu voire renforcé le processus de différenciation.

5) Contexte historique de la zone d'étude : scénario de dispersion dans le complexe d'espèces Sp2

Le scénario suivant s'appuie sur des événements liés à la dynamique fluviale identifiés dans la région d'Orán qui pourraient expliquer la structure génétique observée pour les popsités Or2, 3, 4 et 5. Dans la région d'Orán, quatre terrasses du quaternaire ont été identifiées (**figure 40**), elles correspondent à d'anciennes plaines d'inondations de l'Amazone. La terrasse la plus claire (délimitée en vert) est la plus élevée par rapport au niveau actuel de l'Amazone, elle est donc la plus ancienne. D'après Räsänen et al. (1998) les terrasses de l'Amazone seraient corrélées à celles décrites par Dumont et al. (1988) dans la région de Jenaro Herrera, les terrasses situées sur un même niveau auraient donc le même âge. Les datations obtenues par Dumont et al (1988) sur les terrasses au niveau de Jenaro Herrera, nous permettent de déduire des datations approximatives pour les deux les plus récentes dans la région d'Orán. La terrasse la plus récente (délimitée en blanc) serait âgée d'environ 15 000 ans et la seconde (délimitée en bleu) d'environ 40 000 ans. Lorsque l'on observe plus en détail la carte des reliefs de la zone d'étude, on s'aperçoit qu'au niveau des terrasses 2 et 3 il existe une zone sombre (plus basse que les zones environnantes) qui semble connecter les rivières Apayacu et Ampiyacu (en haut à gauche, en pointillés marron). Or actuellement, la rivière Apayacu débouche directement sur l'amazone au Sud-Est. Sur une carte géologique de la région, il apparaît que cette partie sombre correspond à des alluvions. Ce canal est probablement un ancien cours de la rivière Apayacu. Il y a plus de 15 000 ans, lorsque la terrasse 1 n'était pas encore formée, l'amazone était située plus au nord de sa position actuelle. À cette époque la rivière Apayacu était très probablement connectée à la rivière Ampiyacu (figure 28, t = n -3). Pendant cette période, l'Amazone s'est probablement déplacée vers le Nord jusqu'à la limite de la terrasse 1 avec les parties hautes de Orán, elle a déconnecté la rivière Apayacu de l'Ampiyacu (t = n -2). Puis au cours des derniers 15 000 ans, l'amazone a migré vers le sud formant la terrasse 1 (t = n -1). Cet événement de déconnexion de l'Apayacu a probablement permis la colonisation de la partie Sud-Est de la région d'Orán par des individus du système de l'Apayacu. En effet, sur la terrasse 1 sont présents plusieurs lacs de méandres qui ont été abandonnées lors de la migration de l'Amazone vers le sud. Ces lacs de méandres sont connectés entre eux et à la rivière Apayacu. Les popsités Or2, Or3, Or4 et Or5 ont été échantillonnées sur la bordure de la terrasse 1, la popsité Or4 a même été échantillonnée sur la rive d'un des lacs de méandre de la terrasse 1. Les quatre popsités sont reliées au système de l'Apayacu. Les cours d'eau dans lesquels ont été échantillonnées les popsités Or5 et Or2 sont très particuliers puisqu'ils n'appartiennent à aucun microbassin et de par leur taille, ils semblent plutôt correspondre à des ravines. Seul la popsité Or3 a été échantillonnée dans un système qui s'apparente à un petit microbassin et est susceptible d'avoir hébergé des représentants de Sp2 avant la colonisation présumée d'individus provenant de la rivière Apayacu. Lors de l'événement de colonisation, il y a moins de 15 000 ans, les migrants et les individus correspondant au microbassin de la popsité Or3 se seraient alors mélangés et auraient colonisé la partie Sud-Est de Orán. Cet événement pourrait expliquer la structure actuelle de ces quatre popsités

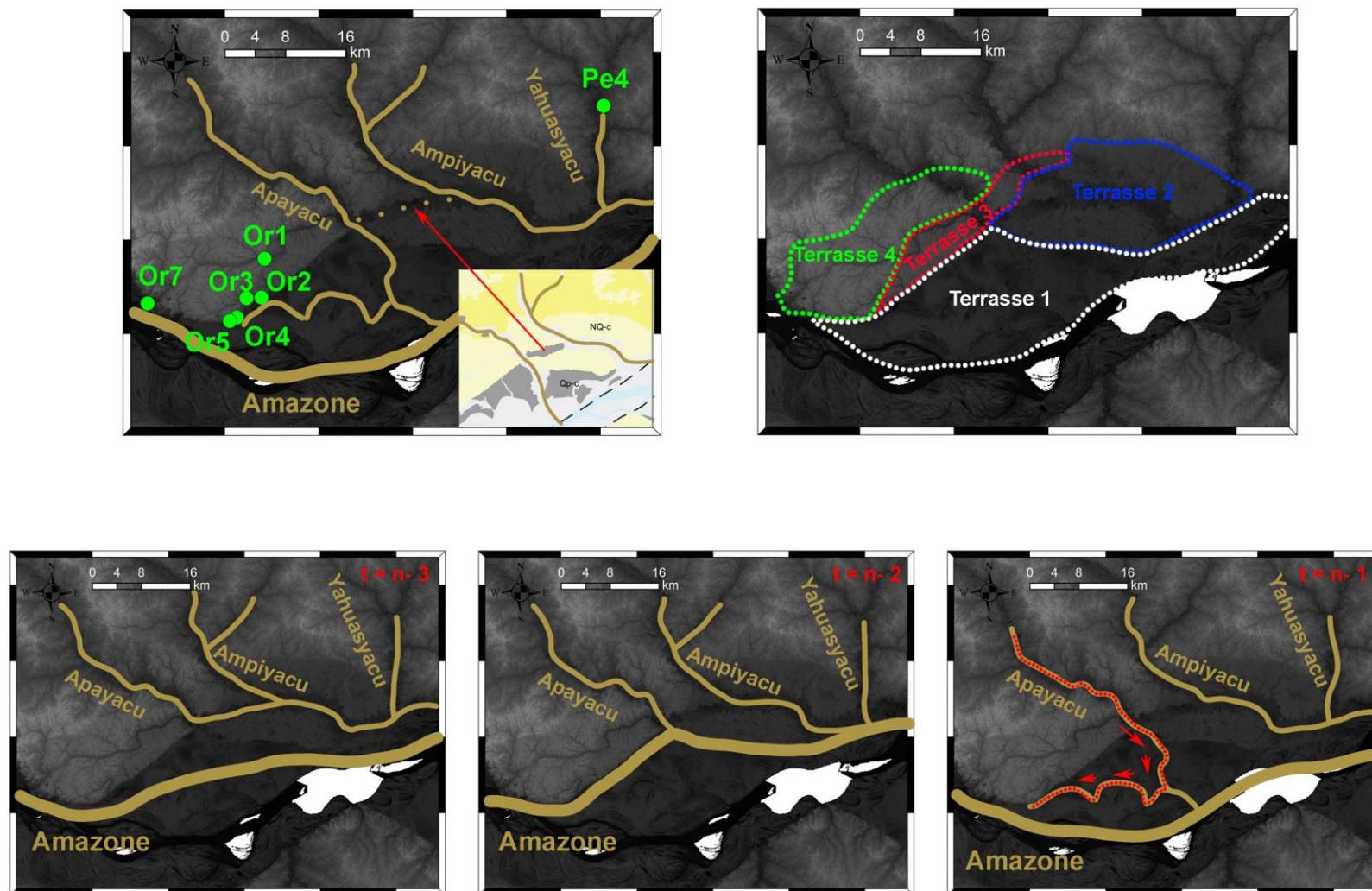


Figure 40. Histoire évolutive de la dynamique fluviale dans la région de Orán pouvant expliquer la structure génétique des popsites Or2, O3, Or4 et Or5. En haut à gauche position actuelle des cours d'eau et des popsites de Sp2. Le schéma correspond à un extrait d'une carte géologique (INGEMMET) de la région montrant que la zone foncée qui « connecte » l'Apayacu à l'Ampiyacu correspond à une zone de dépôts fluviaux alluvionnaires. En haut à droite les terrasses du quaternaire identifiées de 1 à 4 de la plus récente à la plus ancienne. De $t = n-3$ à $t = n-1$ déconnexion de l'Apayacu. Les pointillés rouges et les flèches correspondent au mouvement de colonisation.

6) Arguments en faveur de la spéciation sympatrique en Amazonie

Les niveaux de différenciations observés à l'intérieur des trois « species flocks » Sp1, Sp2 et Sp3, sont exceptionnels. C'est en effet la première fois que de tels niveaux de différenciations ont été observés chez des cichlidés néotropicaux, en sympatrie et sur de si petites échelles géographiques.

Pour Sp1 les popsites JH13 et JH20 du microbassin D sont distantes de moins de 1 km (en suivant les ruisseaux), leur valeur de F_{ST} est de 0,13. Autre exemple, toujours dans le même microbassin, les popsites JH20 et JH 12 distantes de moins de 2 km ont une valeur de F_{ST} de 0,21. Les valeurs de F_{ST} observées dans Sp1 sont du même ordre de grandeur voire supérieures à celles observées entre populations d'*Apistogramma gephyra* ($F_{ST} = 0,128$) et d'*A. pertensis* ($F_{ST} = 0,228$) appartenant à deux bassins versants du rio Negro (Brésil), séparés depuis le Pléistocène moyen ou tardif et ne présentant pratiquement aucun flux génétique (Leitão et al., 2017). Elles sont également similaires à celles observées entre populations de *Cichla temensis* des bassins du Negro et de l'Orénoque (0,2-0,5, Willis et al., 2015). Les valeurs de F_{ST} que nous avons observées sont aussi du même ordre de grandeur, voire supérieures à celles observées entre espèces et genres d'Haplochromines de la région du Lac Victoria (Odhiambo et al., 2011 ; Takeda et al., 2013), référence de radiation spécifique et adaptative chez les vertébrés.

Si l'on compare les valeurs de différenciations que nous observons à l'intérieur des 3 complexes d'espèces avec celles obtenues par Takeda et al. (2013) à partir de 12 marqueurs microsatellites pour 9 espèces d'Haplochromines (2 pélagiques et 7 littorales), alors on se rend compte que les valeurs que nous observons à l'intérieur des 3 complexes correspondent au même ordre de grandeur (voir plus), que celles obtenues entre espèces et genres d'Haplochromines (**Tableau 17**). De plus, les auteurs se sont basés sur des valeurs de R_{ST} et non pas sur des valeurs de F_{ST} pour évaluer la divergence entre les 9 espèces qu'ils ont étudiées. Il a été montré que pour de faibles stades de différenciations les valeurs de F_{ST} et R_{ST} tendait à être similaires mais pour des stades de différenciations élevées le F_{ST} avait tendance à sous-estimer la différenciation génétique par rapport au R_{ST} (Lugon-Moulin et al., 1999; Hardy et al., 2002). Les valeurs de différenciation que nous observons pourraient être encore plus importantes à travers la mesure du R_{ST} , elles pourraient donc être bien supérieures à celles observées par les auteurs précédents.

Tableau 17. Valeurs du R_{ST} par paire d'espèces obtenues à partir de 12 locus microsatellites de 9 espèces d'Haplochromines du lac Victoria (modifié à partir de Takeda et al. (2013). * = p -value < 0,05. ns = non significatif.

	N	<i>H. pyrrhocephalus</i>	<i>H. laparogramma</i>	<i>L. rubripinnis</i>	<i>L. rufus</i>	<i>M. mbipi</i>	<i>N. rufocaudalis</i>	<i>N. greenwoodi</i>	<i>N. omnicaeruleus</i>	<i>H. sauvagei</i>
<i>H. pyrrhocephalus</i>	166	-----	0.012*	0.116*	0.036*	0.170*	0.127*	0.122*	0.157*	0.216*
<i>H. laparogramma</i>	36	0.012*	-----	0.101*	0.036*	0.126*	0.107*	0.119*	0.116*	0.183*
<i>L. rubripinnis</i>	66	0.116*	0.101*	-----	0.035*	0.063ns	0.036*	0.037*	0.086*	0.149*
<i>L. rufus</i>	128	0.036*	0.036*	0.035*	-----	0.029ns	0.027*	0.018ns	0.043*	0.085*
<i>M. mbipi</i>	13	0.170*	0.126*	0.063ns	0.029ns	-----	0.045ns	0.041ns	0.000ns	0.090ns
<i>N. rufocaudalis</i>	81	0.127*	0.107*	0.036*	0.027*	0.045ns	-----	0.039*	0.075*	0.140*
<i>N. greenwoodi</i>	77	0.122*	0.119*	0.037*	0.018ns	0.041ns	0.039*	-----	0.068*	0.110*
<i>N. omnicaeruleus</i>	46	0.157*	0.116*	0.086*	0.043*	0.000ns	0.075*	0.068*	-----	0.110*
<i>H. sauvagei</i>	103	0.216*	0.183*	0.149*	0.085*	0.090ns	0.140*	0.110*	0.110*	-----

Les auteurs ont aussi évalué la différenciation génétique entre populations appartenant à 8 des espèces étudiées, la plupart des valeurs obtenues sont non significatives (non présenté). Sur la base de ces valeurs de différenciations génétiques et de nos autres observations sur la structuration d'*Apistogramma agassizii*, cela renforce l'argument que Sp1, Sp2 et Sp3 soient des « species flock ». En effet, ils sont : (1) situées dans une même zone géographique (sympatrie au sens large), (2) ils ont un niveau d'endémisme important et (3) présentent une étroite relation phylogénétique. De plus, les temps de divergences entre les Haplochromines du lac Victoria et les trois « species flock » Sp1, Sp2 et Sp3, sont similaires. En effet, les Haplochromines du lac Victoria auraient divergé au cours des derniers 15 000 ans (Salzburger et Meyer, 2004 ; Meier et al., 2017). D'après le meilleur scénario obtenu pour Sp1 les unités évolutives correspondant aux microbassins auraient divergé il y a 14 500 ans [10 100 à 87 500]. Cependant, ce temps de divergence pourrait être encore plus récent. Nous avons en effet considéré que le temps de génération pour Sp1 était d'une année. D'après Römer (pers. com.) le temps de génération d'*A. agassizii* est de 6 mois en captivité. Cela signifie que les clusters intra microbassins (population génétiques) de Sp1 pourraient avoir divergés il y a 7 250 ans [5 050 – 43750]. Compte tenu des niveaux élevés de différenciations obtenues entre clusters, cette divergence a été extrêmement rapide. Toujours d'après le meilleur scénario, les unités évolutives de la région de Jenaro Herrera seraient issues d'un événement de mélange entre deux lignées, comme le « species flock » du lac Victoria (Meier et al., 2017). Cet événement de mélange pourrait avoir favorisé le processus de spéciation dans la région de Jenaro Herrera. En effet, d'après Meier et al. (2017) l'hybridation entre lignées divergentes, lorsqu'elle coïncide avec de nouvelles opportunités écologiques (colonisation de rivières dans notre cas), peut favoriser des radiations adaptatives rapides à partir de la recombinaison et le tri du polymorphisme obtenu lors du mélange des lignées à travers la sélection naturelle et sexuelle.

En considérant un temps de génération de 1 an, l'évènement de mélange entre les populations JK et N11 aurait eu lieu il y a 3 040 ans [2240 - 12400], voire 1 520 ans [1120 - 6200] en considérant un temps de génération de 6 mois. Au stade actuel de nos connaissances, la comparaison entre le « species flock » du lac Victoria et les « species flock » Sp1, Sp2 et Sp3, souffre du manque d'information sur les différents types habitat disponibles et sur d'éventuelles adaptations trophiques en relation avec des différenciations morphologiques ou physiologiques. Au-delà des différences évidentes (structuration verticale selon la profondeur dans les grands lacs et structuration horizontale dans les ruisseaux Amazoniens), ces aspects seraient intéressants à explorer pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la formation des species flocks en Amazonie.

7) Perspectives

Même s'il existe des arguments solides pour valider l'hypothèse que les trois complexes d'espèces (Sp1, Sp2 et Sp3) représentent trois « species flocks », il est indispensable de montrer que les clusters mis en évidence dans Sp1 correspondent à des espèces ou des proto espèces. Il est donc nécessaire de génotyper les individus utilisés pendant les expérimentations sur le choix de partenaire afin de pouvoir interpréter nos premiers résultats à la lumière de la variation génétique en les replaçant dans leurs clusters d'origine.

Ensuite, nous devons effectuer de nouvelles expérimentations de sélection sexuelle (ou compléter celles déjà réalisées), mais cette fois-ci, en réalisant les expérimentations entre les clusters présents en sympatrie dans un même microbassin. Ces expérimentations nous permettront de montrer s'il existe un isolement reproducteur entre clusters. Si tel est le cas, ce sera un argument de plus en faveur de l'existence de « specie flocks ». Il serait aussi intéressant de réaliser des mesures morphométriques et d'observer le type de dentition des poissons en fonction des clusters et des résultats obtenus lors des expérimentations sur l'isolement reproducteur afin de déterminer si 1) la structure génétique

observée correspond à un choix préférentiel et 2) si c'est lié à adaptations trophiques ou morphologiques.

Ensuite, il est nécessaire de génotyper des individus provenant de la région du Yavarí (Gálvez) afin de vérifier si la distribution de Sp1 dans la zone d'étude est effectivement liée à un évènement de colonisation engendré par la capture du haut Gálvez par le Blanco.

Nous savons que dans la rivière Tigre (et un de ses affluents la rivière Corrientes) un affluent de la rivière Marañon en amont des popsites Na1, 2 et 3, que l'espèce *A. agassizii* est présente (Koslowski, 2002 ; Britzke, 2015). Il semblerait d'après les phénotypes identifiés sur des photos de Tom Christoffersen qu'il s'agisse de Sp1. Il serait intéressant de génotyper des individus provenant de cet affluent afin de savoir s'ils sont apparentés ou non avec la lignée du bas Marañon afin d'essayer de mieux comprendre son histoire évolutive.

Il est possible que dans la zone étudiée notamment le long de l'amazone, il y ait eu d'autres évènements de mélanges entre la lignée Marañon (qui pourrait être présente le long de l'Amazone) et celle qui proviendrait de la rivière Gálvez (N11). Cela aurait avoir favorisé d'autres évènements de spéciations. Nous savons d'après un compte rendu de mission de collecte de Tom Christoffersen et en particulier grâce à des photos prises sur le terrain qu'*A. agassizii* est aussi présent dans la rivière Manati (sur la rive droite de l'amazone, en aval de la confluence entre le Marañon et l'Ucayali). Nous avons identifié des caractéristiques de Sp1. Néanmoins, certains phénotypes, même s'ils semblent appartenir à Sp1 sont particuliers et pourraient laisser suggérer que plusieurs espèces y soient présentes en sympatrie.

Les échantillonnages de Sp2 et Sp3 nécessitent d'être complétés et plus particulièrement Sp3 pour qui nous avons collectés seulement 55 individus. Ensuite le même travail devrait être réalisé en suivant la même méthodologie utilisée pour Sp1.

En parallèle de ces aspects de spéciations, nos résultats montrent que Sp1 pourrait être un excellent modèle pour étudier les dynamiques des métapopulations ou métacommunautés dans les réseaux dendritiques.

8) Biodiversité et conservation du genre *Apistogramma* dans le bassin Amazonien

La zone que nous avons étudiée est comprise entre la ville de Requena (en amont de Jenaro Herrera) au niveau de la rivière Ucayali et la ville de Pebas sur la rive gauche de l'Amazone. La distance linéaire en suivant les cours de l'Ucayali et de l'Amazone entre ces deux villes est de 450 km environ. L'aire de distribution actuellement connue de *A. cf. agassizii* est comprise entre la ville de Requena et l'embouchure de l'Amazone, soit 3500 km. Si l'on considère seulement le niveau spécifique pour Sp1, Sp2 et Sp3 dans notre zone d'étude alors nous pouvons estimer un nombre potentiel de 23 espèces dans *A. cf. agassizii*. Cela correspond à environ 20% des espèces actuellement décrites pour le genre *Apistogramma*. Cette estimation est très approximative et critiquable puisqu'elle ne tient pas compte, par exemple, de la diversité des habitats au sein de l'aire de répartition de l'espèce, de la présence de rivières pouvant constituer des barrières, de l'histoire géologique des différents bassins versants, et surtout, elle ne considère pas Sp1, Sp2 et Sp3 comme des « species flock ». Malgré tout cette estimation est comparable à celle faite par Römer (2006) sur la base d'analyses réalisées sur 27 morphotypes différents identifiés comme *A. agassizii*, qui ont été collectés sur de nombreux sites le long du fleuve Amazone par des pêcheurs de poissons ornementaux, des aquariophiles itinérants et des scientifiques, et exportés en Europe, au Japon et aux États-Unis (répertoriés dans Römer et Wise

2006). Si nos résultats se conforment, que Sp1, Sp2 et Sp3 correspondent à des « species flocks » alors l'espèce *A. agassizii* pourrait regrouper de dizaines voire des centaines d'espèces.

Nos travaux démontrent clairement qu'*A. agassizii* ne peut plus être considérée comme une espèce à large distribution : ce taxon représente probablement une mosaïque de « species flock » dont les contours précis nécessitent d'être définis. Nos résultats soulignent le besoin urgent de réaliser des études supplémentaires au Pérou et dans différents pays amazoniens pour mieux préciser le nombre d'espèces regroupées dans *A. agassizii* et pour délimiter leurs aires respectives de répartition, qui pourraient être très limitées dans certains cas. Le cas de l'espèce *A. agassizii* n'est probablement pas un cas isolé dans *Apistogramma*. En effet, Ready et al (2006) ont démontré que dans *Apistogramma caetei*, il existe au moins 3 espèces distinctes pourtant *Apistogramma caetei* est seulement distribuée à l'est du bassin Amazonien, dans des microbassins isolés les uns des autres par l'océan Atlantique. Il est vraisemblable que les deux autres (après *A. cf agassizii*) connues pour avoir une répartition très large dans le bassin amazonien, *A. bitaeniata* et *A. cactuoides*, regroupent également de nombreuses espèces, comme le suggèrent Römer (2000, 2006), Römer et al (2015, 2017), et Britzke (2015). Le genre *Apistogramma* pourrait alors être composé de centaines d'espèces ou de proto espèces, si l'on y ajoute les nombreuses espèces dont le statut taxonomique n'a pas encore été évalué moléculairement. Cette estimation n'a pas de valeur de référence, mais peut illustrer les limites de nos connaissances concernant la biodiversité d'*Apistogramma* et des poissons amazoniens en général (Pitman et al., 2011).

La connaissance des modèles de biodiversité aquatique est une condition préalable essentielle à la conservation des écosystèmes d'eau douce, qui sont les plus menacés dans le monde (Abell et al., 2008). Cela vaut également pour le bassin amazonien (Nogueira et al., 2010 ; Castello et al., 2013 ; Castello et Macedo, 2016) et plus encore pour les cours d'eau (Frederico et al., 2018), où vivent la plupart des espèces *Apistogramma* (Römer, 2000, 2006). Les poissons d'eau douce sont parmi les vertébrés les plus menacés au monde (Pimm et al., 2014), ce qui est probablement aussi le cas dans le bassin amazonien en raison de la dégradation ou de la perte d'habitat et des connaissances encore limitées sur l'écologie des poissons (Nogueira et al., 2010 ; Frederico et al., 2018). D'autres études approfondies sont nécessaires de toute urgence pour comprendre l'étendue de la biodiversité dans les nombreux taxons amazoniens de petite taille, riches en espèces mais peu étudiés (Barletta et al., 2010), comme les *Apistogramma* ou d'autres genres de cichlidés très diversifiés comme *Crenicichla* (Piálek et al., 2012 ; Říčan et al., 2016 ; Burrell et al., 2018). Ces informations sont essentielles pour clarifier notre connaissance sur la diversité ichtyologique amazonienne et des taux d'endémisme, afin de développer des stratégies de conservation et de gestion appropriées (Nogueira et al., 2010). Sans ces informations, il sera impossible de contrôler leur extraction par le marché ornemental et d'éviter les disparitions locales et la perte de la variabilité génétique.

Bien que le commerce ornemental ait l'avantage d'attirer l'attention du grand public sur ces espèces qui habitent souvent des milieux presque invisibles pour le public comparativement aux grandes rivières (Olden et al., 2007 ; Frederico et al., 2018), il peut aussi mettre en péril leur survie à cause de la surexploitation lorsque leur répartition ou la taille des populations est limitée. Certaines espèces sont déjà victimes de leur surexploitation, c'est notamment le cas pour *Apistogramma cinilabra* (Römer et al, 2011, préalablement connue sous le nom de *A. 'Roterpunkt'* sur le marché ornemental), qui vit dans un petit lac proche de la ville de Nauta (Pérou). En 2014, elle a été ajoutée à la liste rouge de l'IUCN et évaluée comme vulnérable. Aujourd'hui, elle est probablement en danger critique d'extinction du fait de son exploitation, de la pêche chimique opérée dans son habitat (au barbasco, qui est un ichtyotoxique) et de la déforestation. Selon le commentaire d'un pêcheur ornemental, elle est devenue si peu abondante qu'elle n'est plus intéressante à pêcher. D'autres exemples dans la

région de Pebas où les morphotypes d'*Apistogramma* sp. morado, pebas, papagayo (*Apistogramma* cf. *ortegai*) sont présents, il est de plus en plus difficile d'en capturer. Au cours de nos missions sur le terrain, nous avons souvent observé des culs de bouteilles plastiques utilisés par les pêcheurs pour transporter du barbasco, cette substance compétitrice de l'oxygène, qui est naturellement présente dans les plantes des genres *Lonchocarpus*, *Paraderris* et *Tephrosia* (Andel, 2000). Le barbasco est traditionnellement utilisé en Amazonie par les communautés rurales pour pêcher en asphyxiant les poissons, rapidement et sans matériel spécifique, dans de petits ruisseaux. Le problème, c'est qu'il tue presque tous les poissons et autres animaux à sang froid dans la zone d'influence. Son utilisation semble répandue en Amazonie péruvienne et ses conséquences sur les communautés aquatiques n'ont pas été évaluées.

D'après nos résultats, Sp3 est endémique de la rivière Nanay, la plus grande rivière d'eau noire de l'Amazonie péruvienne (Roldán, 1992 ; Sioli, 1984 ; Ortega et Castro, 1998). Le Nanay est la rivière la plus exploitée pour le commerce des poissons d'ornement en raison de sa proximité de la ville d'Iquitos, où opèrent la plupart des exportateurs de poissons (Tello et Cánepa, 1991 ; Souza et al., 2004 ; Gerstner et al., 2006). Cette situation exerce une pression supplémentaire sur le possible « specie flock » Sp3, qui supporte actuellement la plupart de la pêche ornementale locale pour *A. agassizii*. Nos résultats pourraient favoriser la mise en place d'actions de gestion adaptées pour tenir compte de cette situation, telles que la fixation éventuelle de quotas ou de licences spécifiques d'extraction/exportation.

Le commerce ornemental affecte probablement moins les « species flock » Sp1 et Sp2. Cependant, ils semblent encore plus vulnérables car les espèces formées ou proto espèces ont des aires de distribution extrêmement réduites, leur exploitation pour le marché ornemental pourrait les mettre en danger. De plus ces deux complexes semblent vivre préférentiellement dans de petits ruisseaux forestiers particulièrement sensibles aux effets de la déforestation. Nous avons pu observer les conséquences de la déforestation sur le ruisseau dans lequel a été échantillonné la popsité JH12 (Sp1, microbassin D) de la région de Jenaro Herrera. Cette popsité a été échantillonnée en novembre 2016, l'année suivante à la même époque (octobre), nous voulions compléter l'échantillonnage de cette popsité mais le ruisseau était complètement asséché. Entre ces deux années, une parcelle de forêt de plusieurs hectares avait été déboisée autour du ruisseau. C'est toute la zone aux environs de la ville de Jenaro Herrera qui est touchée par l'intense déforestation pour l'élevage du bétail et les cultures vivrières. Les microbassins C, D et E situés dans cette zone semblent être actuellement particulièrement vulnérables.

Ces différentes menaces auront probablement un impact supplémentaire sur la capacité des espèces d'*Apistogramma* à supporter les changements climatiques prévus sur la qualité et la quantité de l'eau (Freitas et al., 2013 ; Frederico et al., 2016). Par ailleurs, la déforestation résulte en une élévation de la température de l'eau dans les ruisseaux impactés, ce qui pourrait avoir des conséquences importantes pour les sex-ratios chez cette espèce dont la détermination du sexe est thermosensible (Römer et Beisenherz 1996).

Finalement, la pêche ornementale et loin d'être la seule menace sur le genre *Apistogramma*. C'est la totalité de son habitat qui est menacé. La déforestation en Amazonie ne cesse de gagner du terrain avec l'augmentation des surfaces agricoles pour la culture du soja, de la canne à sucre et de l'élevage bovin qui se réalise au détriment de la couverture forestière (Morton et al., 2006 ; Peres et Schneider, 2012). Le développement de grands axes routiers qui accélèrent les processus de déforestation en rendant accessibles des zones auparavant isolées (Souza et Lemos, 2014 ; Fraser, 2014 ; Sanchez, 2015). Selon Barber et al. (2014) 95% de la déforestation s'est produite dans un rayon de 5,5 km des routes ou 1 km des rivières. La construction de la transamazonienne ou plus récemment en 2010

« l'interocéánica Sur » Brésil-Pérou ou IIRSA-Sur, créée sur fond de corruption (Chirif, 2017), a augmenté le taux de déforestation dans la région ainsi que l'exploitation minière illégale (Fraser, 2014 ; Chirif, 2017). La raison officielle de la construction de l'IIRSA-Sur était de lier les deux océans (pacifique et atlantique) pour dynamiser le commerce entre le Pérou et le Brésil mais surtout pour faciliter les échanges commerciaux entre le Brésil et la Chine. En réalité cela n'a eu que peu d'effets sur les échanges commerciaux. Seul 2% du commerce est réalisé à travers le réseau routier IIRSA, par contre ses effets sur la dégradation de l'environnement sont bien visibles.

La déforestation a un effet direct sur le climat local, régional et global (D'Almeida et al., 2007 ; Nepstad et al., 2008 ; Davidson et al., 2012 ; Mahmood et al., 2013 ; Lawrence et Vandecar, 2015). La déforestation et l'agriculture ont aussi un impact sur la qualité des cours d'eau : sans couvert végétal, les sols sont lessivés, les produits chimiques toxiques comme les désherbants, les herbicides, les fongicides, les insecticides, ainsi que les fertilisants ruissellent vers les cours d'eau, source de pollution qui menacent les écosystèmes aquatiques (Williams et al., 1997). Un autre effet du lessivage des sols est la libération du mercure natif vers les cours d'eau qui, dans les sédiments, en condition anaérobie, se transforme en méthylmercure, bioaccumulé et concentré dans les maillons supérieurs de la chaîne trophique (Mergler et al., 2007). Une autre source de contamination au mercure provient de l'extraction d'or (Lacerda et Pfeiffer, 1992). L'exploitation minière illégale est un véritable fléau dans certaines régions comme celle de Madre de Dios au Pérou (Swenson et al., 2011 ; Gardner, 2012 ; Brac et al., 2011) et au Brésil (Beltran-Pedreiros et al., 2011). À cela s'ajoute la pollution des cours d'eau due aux activités pétrolières, pas moins de 70 fuites de pétrole ont été recensées depuis 2015 dans le secteur 192 au Pérou (Sierra Praeli, 2019 ; dernier en date 23 novembre 2019 (**Figure 41**) et plus largement dans les têtes de bassin (Azevedo-Santos et al., 2016). Ces fuites ont des répercussions dramatiques sur les écosystèmes (Steen et al., 1999 ; Lytle et al., 2001 ; Couceiro et al., 2006 ; Fraser, 2014 ; Kingston, 2002). Les grandes villes amazoniennes génèrent une forte pollution en déchets plastiques et en eaux résiduelles qui sont directement rejetés dans les cours d'eau. Lebreton et al. (2017) estiment que l'Amazone charrie annuellement 38900 (range 32,200–63,800) tonnes de déchets plastiques vers l'océan, ce qui fait de l'Amazone le 7^{ème} fleuve charriant le plus de déchets plastique vers l'océan. Le développement de barrage sur différents affluents de l'Amazonie impacte directement



Figure 41. Fuite de pétrole le 23 novembre 2019 dans le sous bassin du Marañon (rivière Corrientes).

les écosystèmes (Castello et al., 2013 ; Lees et al., 2016; Val et al., 2016; Winemiller et al., 2016) et la migration de certains poissons migrateurs (Agostinho et al., 2008 ; Barthem et al., 2016 ; Duponchelle et al., 2016 ; Hauser, 2018). Le dernier en date est celui de Belomonte sur le rio Xingu. La région du Xingu est pourtant considérée comme un hot spot de biodiversité avec un fort taux d'endémisme (Camargo et al., 2004 ; Fitzgerald et al., 2018). D'après Castello et Macedo (2016), le Xingu et d'autres affluents drainant la même zone géographique (ancien bouclier granitique) contiendrait plus de deux fois plus d'espèces endémiques que les régions andines plus jeunes.

L'introduction d'espèces invasives constituent une menace de plus (Latini et Petrere, 2004; Vitule et al., 2009, 2017). Pour terminer, une autre menace pèse sur le bassin amazonien, celle du changement climatique (Marengo et al., 2011 ; Betts et al., 2008 ; Exbrayat et al., 2017). D'après Cox et al. (2004), une teneur élevée en CO₂ conduit à un schéma de réchauffement de la température de la mer, semblable à El-Niño, qui supprime les précipitations dans le nord de l'Amazonie. Même si c'est encore débattu, certains auteurs estiment que le changement climatique et la déforestation pourraient conduire à un changement de type de végétation, de la forêt tropicale humide à une végétation semi-aride de type savane (Nobre et al., 1991, Cox et al., 2000; Oyama et Nobre, 2003 ; Cox et al., 2004). Le contexte dans lequel évolue notre modèle d'étude semble donc assez délétère. D'autant plus que d'après Bulter (2013) les écosystèmes amazoniens sont négligés par les efforts de conservation et les écosystèmes aquatiques plus encore (Castello et al., 2013). Il semble que les facteurs qui maintenaient l'Amazonie relativement bien conservée, sa superficie, la difficulté d'accès de certaines de ses régions et sa faible densité Humaine (Myers et al., 2000 ; Reis et al., 2016), ne soient plus suffisants pour garantir son intégrité. L'Amazonie est désormais considérée en transition vers un régime dominé par les perturbations (Davidson et al., 2012).

E. CONCLUSION

Apistogramma agassizii a été utilisé comme modèle dans cette étude en raison de ses caractéristiques biologiques et comportementales qui le rapprochent des espèces d'Haplochromines des grands lacs africains : polymorphisme de couleur, soins parentaux, choix préférentiel des partenaires, sédentarité, possible radiations récentes de populations. Nos résultats montrent qu'*Apistogramma agassizii* ne peut plus être considérée comme une unique espèce, mais comme une mosaïque de « species flocks » dans la petite zone étudiée, qui correspond à une fraction de son aire de répartition. Ces trois « species flocks » s'organiseraient de façon fractale selon la hiérarchisation du réseau hydrographique, avec des degrés de différenciation variables selon les niveaux. (**Figure 42**). Les grands cours d'eau, comme le Marañon, l'Ucayali et l'Amazone, seraient dans la zone d'étude le niveau hiérarchique de rang 1, constituant des barrières aux flux de gènes à l'origine de la spéciation et du maintien des 3 « species flocks » Sp1, Sp2, Sp3. Les microbassins constitueraient le niveau de hiérarchisation inférieur de rang 2 : en sympatrie au sens large car ils sont connectés par la rivière principale qui les relie ; du fait de cette configuration ils sont partiellement disjoints, cela limiterait le flux génique entre microbassins et favoriserait la divergence génétique entre populations à l'intérieur des complexes d'espèces. Puis, à l'intérieur des microbassins, les ruisseaux seraient le niveau hiérarchique de rang 3 : les proto-espèces divergeraient en sympatrie stricte, entre ruisseaux connectés, voire à l'intérieur d'un même ruisseau (dans une même popsité, unité de collecte la plus petite). Le processus de divergence en sympatrie stricte à l'intérieur des ruisseaux, pourrait être la conséquence du caractère philopatryque d'*A. agassizii*, avec des déplacements asymétriques des reproducteurs limitant les échanges de gènes entre l'aval et l'amont (Muneepeerakul, 2008 ; Morrissey et Kerckove 2009), et de la sélection sexuelle qui maintiendrait voire renforcerait le processus de divergence entre les proto-espèces.

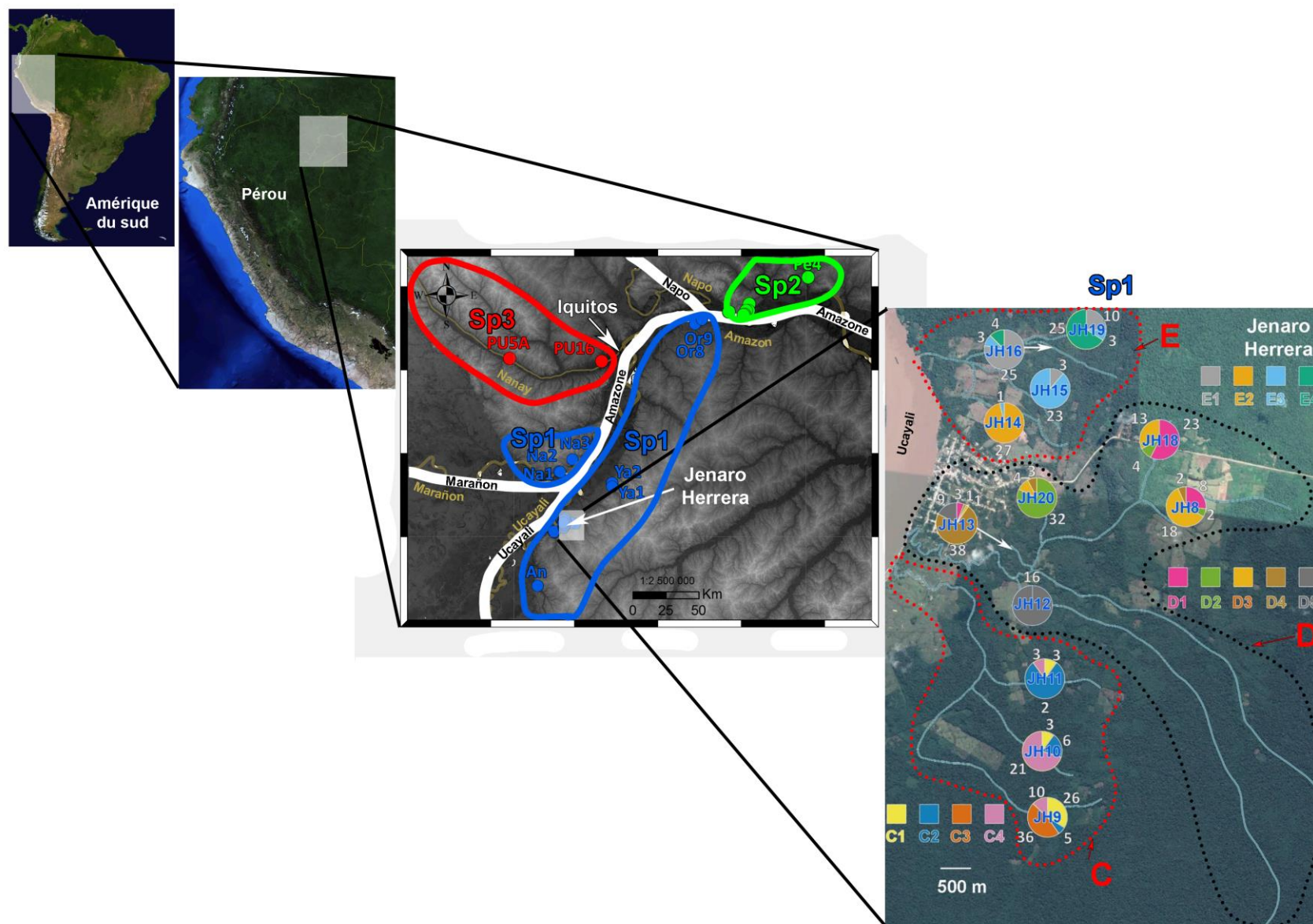


Figure 42. Schémas synthétiques de la distribution fractale dans la zone d'étude des « species flocks » selon la hiérarchisation du réseau hydrographique en prenant pour exemple le « species flocks » Sp1.

Les mécanismes à l'œuvre chez *A. agassizii*, ont pu opérer chez d'autres espèces d'*Apistogramma* comme *A. bitaeniata* et *A. cacaotoides*, par exemple. Ces dernières ont comme *A. agassizii* une grande aire de distribution (Römer, 2000 ; Britzke, 2015), elles présentent du polymorphisme de couleur, un choix préférentiel de partenaire à différentes échelles géographiques (Römer et Beisenherz, 2005 ; Engelking et al., 2010) et certains auteurs ont suggéré qu'elles pourraient regrouper des espèces distinctes (Britzke, 2015 et Tougard et al., 2017).

Le genre *Apistogramma* est particulièrement intéressant pour étudier ces événements récents de spéciations qui pourraient avoir eu lieu, en partie, en sympatrie. Cependant, d'autres genres de cichlidés présentent des caractéristiques similaires aux Haplochromines et seraient susceptibles de présenter les mêmes schémas évolutifs qu'*A. agassizii*. Le genre *Crenicichla* est un bon candidat. En effet, Piálek et al. (2012), ont montré l'existence probable d'au moins deux « species flocks » dans le groupe *Crenicichla lacustris*, *Crenicichla missioneira* et *Crenicichla mandelburgeri* dans les bassins Uruguay et Paraná/Iguazú au niveau de la tri-frontière entre l'Argentine, le Brésil et l'Uruguay. Ils ont montré que dans ces deux « species flocks » étaient apparus de façon indépendante des adaptations trophiques et morphologiques similaire à celles des cichlidés des grands lacs africains et centraméricains. Ce genre étant aussi présent en Amazonie, il pourrait être susceptible de présenter ce type de spéciation et héberger des « species flocks » dans ce bassin.

Le genre *Geophagus* (28 espèces valides, source fishbase) présent en Amazonie et notamment l'espèce *G. brasiliensis* pourrait en réalité représenter des complexes d'espèces voire des « species flocks » (Souza et al., 2017). Les genres *Bujurquina* et *Aequidens*, qui regroupent eux aussi de nombreuses espèces (18 et 16 respectivement (source fishbase), semblent aussi être de bons candidats mais d'après nos connaissances aucune étude ne s'est intéressée à l'identification d'événements récents de spéciations et à leurs mécanismes dans ces genres. La spéciation sympatrique ne pouvant pas être rejetée pour la mosaïque de « species flocks » d'*A. agassizii* il est alors possible que la remarquable diversité spécifique de l'ichtyofaune Amazonienne puisse reposer, en partie, sur un tel mécanisme de spéciation en particulier chez les Cichlidés. La richesse spécifique des cichlidés serait en conséquence très sous-estimée en Amazonie.

La dynamique fluviale favorise, dans toute la plaine inondable de l'Amazone et de ses affluents, l'abandon de lacs de méandres ou leur capture. Certains lacs de méandres peuvent avoir été déconnectés du chenal principal plusieurs milliers d'années avant leur capture (Quintana-Cobo et al., 2018). Il n'est pas rare que la dynamique fluviale aboutisse à la fragmentation de microbassins comme nous l'avons observé dans la région d'Orán où l'Amazone a déconnecté la rivière Apayacu du système Ampyacu/ Yahuasyacu. Parfois les événements géologiques favorisent les événements d'avulsions et de capture. Ces événements hydrogéomorphologiques favorisent les phases de fragmentations, d'isolations, de dispersions et de colonisations. L'aptitude des Cichlidés à évoluer rapidement et à s'adapter à de nouveaux habitats, pourrait avoir conduit à la formation de centaines de « species flocks » en Amazonie, similaire à ceux de notre modèle *A. agassizii*. En effet, nous avons souvent rencontré en sympatrie avec *Apistogramma agassizii* des espèces de cichlidés appartenant aux genres *Crenicichla*, *Aequidens* et *Bujurquina*. Les espèces de ces genres affectionnent souvent les mêmes habitats qu'*Apistogramma*. Dans la région de Jenaro Herrera nous avons surtout rencontré avec Sp1 l'espèce *Aequidens diadema*. Il est vraisemblable que les événements d'avulsions, de dynamique fluviale et de connexion (capture) que nous avons identifiés comme ayant pu conditionner l'histoire évolutive de Sp1 (racontée par le scénario 5), aient aussi participé à l'histoire évolutive d'autres espèces fréquentant les mêmes habitats que ceux d'*A. agassizii*. Les années à venir avec les nouveaux outils de recherche qui s'offrent à la génétique évolutive, notamment les approches « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique) devraient nous éclairer davantage sur la biologie

adaptative de ces « species flock » et nous aider à mieux comprendre l'évolution de la biodiversité en Amazonie. En espérant que la cupidité de la plupart des classes politiques, la corruption, l'extractivisme, ne réduisent pas la biodiversité amazonienne à peau de chagrin, relayant nos travaux, ceux des collègues et ceux qui suivront, à des études réalisées à titres posthume.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abell, R., Thieme, M., Revenga, C. Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, ...Petry, P. (2008) Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience* 58, 403-414
- Agostinho, A. A., Pelicice, F. M., & Gomes, L. C. (2008). Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Braz J Biol*, 68(4 Suppl), 1119-1132.
- Albert JS, Carvalho TP, Petry P, et al. (2011) Aquatic Biodiversity in the Amazon: Habitat Specialization and Geographic Isolation Promote Species Richness. *Animals (Basel)*. 1(2):205–241. Published 2011 Apr 29. doi:10.3390/ani1020205
- Alves-Silva, A., & Dergam, J. (2014). Cryptic Speciation Within the Neotropical Cichlid *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Teleostei Cichlidae): A New Paradigm in Karyotypical and Molecular Evolution. *Zebrafish*, 12. doi:10.1089/zeb.2014.0999
- Amado, M., Farias, I., & Hrbek, T. (2011). A Molecular Perspective on Systematics, Taxonomy and Classification Amazonian Discus Fishes of the Genus *Symphysodon*. *International journal of evolutionary biology*, 2011, 360654. doi:10.4061/2011/360654
- Andel, T. (2000). The diverse uses of fish-poison plants in Northwest Guyana. *Economic Botany*, 54(4), 500-512.
- Anderson, E.P., Jenkins, C.N., Heilpern, S., Maldonado-Ocampo, J.A., Carvajal-Vallejos, F.M., Encalada, A.C., et Tedesco, P.A. (2018). Fragmentation of Andes-to-Amazon connectivity by hydropower dams. *Science Advances*, 4.
- Arbour, J. H., et Lopez-Fernandez, H. (2016). Continental cichlid radiations: functional diversity reveals the role of changing ecological opportunity in the Neotropics. *Proc Biol Sci*, 283(1836). doi:10.1098/rspb.2016.0556
- Arnegard ME, Markert JA, Danley PD, Stauffer JR, Ambali AJ, Kocher TD (1999) Population structure and colour variation of the cichlid fish *Labeotropheus fuelleborni* Ahl along a recently formed archipelago of rocky habitat patches in southern Lake Malawi. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 266:119–130
- Azevedo-Santos, V. M., Garcia-Ayala, J. R., Fearnside, P. M., Esteves, F. A., Pelicice, F. M., Laurance, W. F., & Benine, R. C. (2016). Amazon aquatic biodiversity imperiled by oil spills. *Biodiversity and Conservation*, 25(13), 2831-2834. doi:10.1007/s10531-016-1192-9
- Baker, P. A., et Fritz, S. C. (2015). Nature and causes of Quaternary climate variation of tropical South America. *Quaternary Science Reviews*, 124, 31-47. doi:10.1016/j.quascirev.2015.06.011.
- Barber, C. P., Cochrane, M. A., Souza, C. M., et Laurance, W. F. (2014). Roads, deforestation, and the mitigating effect of protected areas in the Amazon. *Biological Conservation*, 177, 203-209. doi:10.1016/j.biocon.2014.07.004
- Baric S, Salzburger W, Sturmbauer C. (2003). Phylogeography and evolution of the Tanganyikan cichlid genus *Tropheus* based upon mitochondrial DNA sequences. *J Mol Evol* 56:54–68
- Barletta, M., Jaureguizar, A.J., Baigun, C., Fontoura, N.F., Agostinho, A.A., Almeida-Val, V.M.F. et Corrêa, M.F.M. (2010). Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of Fish Biology*, 76, 2118-2176.
- Barlow GW (1976) The Midas cichlid in Nicaragua. In: *Investigations of the Ichthyology of Nicaraguan Lakes* (ed. Thorson TB), pp. 359–369. University of Nebraska Press, Lincoln, Nebraska.
- Barlow GW, Munsey JW (1976) The red devil-Midas-arrow cichlid species. In: *Investigations of the Ichthyology of Nicaraguan Lakes* (ed. Thorson TB), pp. 359–369. University of Nebraska Press, Lincoln, Nebraska.
- Barlow, G. W. et Rogers, W. (1978). Female Midas cichlids' choice of mate in relation to parents' and to own color. *Biol. Behav.*, 3, 137-145.
- Barlow GW. (2000). *The cichlid fishes: Nature's grand experiment in evolution*. Perseus, Cambridge, Mass.
- Barluenga, M., et Meyer, A. (2004). The Midas cichlid species complex: incipient sympatric speciation in Nicaraguan cichlid fishes? *Mol Ecol*, 13(7), 2061-2076. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02211.x
- Barluenga, M., Stolting, K. N., Salzburger, W., Muschick, M., et Meyer, A. (2006). Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. *Nature*, 439 (7077), 719-723. doi:10.1038/nature04325
- Barthem, R. et Goulding, M. (2007) Un ecosistema inesperado: la Amazonía revelada por la pesca, Lima, Peru: Museu Paraense Emilio Goeldi, Amazon Conservation Association (ACA).
- Barthem, R. B., Goulding, M., Leite, R. G., Canas, C., Forsberg, B., Venticinque, E., . . . Mercado, A. (2017). Goliath catfish spawning in the far western Amazon confirmed by the distribution of mature adults, drifting larvae and migrating juveniles. *Sci Rep*, 7, 41784. doi:10.1038/srep41784
- Beadle L (1974) *The Inland waters of tropical Africa*. Longman, London
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. et Bonhomme F. (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Beltran-Pedreiros, S., Zuanon, J., Leite, R.G., Peleja, J.R.P., Mendonça, A.B. et Forsberg, B.R. (2011). Mercury bioaccumulation in fish of commercial importance from different trophic categories in an Amazon floodplain lake. *Neotrop. Ichthyol.* 9, 901-908.
- Betts, R. A., Malhi, Y., et Roberts, J. T. (2008). The future of the Amazon: new perspectives from climate, ecosystem and social sciences. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363(1498), 1729-1735. doi:10.1098/rstb.2008.0011
- Boulenger G (1898) *Catalogue of the fresh-water fishes of Africa in the British Museum (Natural History)*. British Museum for Natural History, London

- Bowen, B. W., et J. C. Avise. (1996). Conservation genetics of marine turtles. In *Conservation genetics: Case histories from nature*, J. C. Avise, and J. L. Hamrick (eds), Chap. 7. New York: Chapman and Hall.
- Briscoe D. A. et Tait N. N. (1995). Allozyme evidence for extensive and ancient radiations in Australian Onychophora. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 7 (14), 91-102.
- Britzke, R., Oliveira, C. et Kullander, S.O. (2014). *Apistogramma ortegai* (Teleostei: Cichlidae), a new species of cichlid fish from the Ampyacu River in the Peruvian Amazon basin. *Zootaxa*, 3869, 409-419.
- Britzke, R. (2015) *Relações filogenéticas do gênero Apistogramma (Teleostei, Cichlidae) e filogeografia da espécie Apistogramma agassizi*. 187 f. (PhD thesis). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu.
- Brooks JL (1950) Speciation in ancient lakes. *Q Rev Biol* 25:30–176
- Brooks, D.R. et Van Veller, M.G.P. (2003) Critique of parsimony analysis of endemism as a method of historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 30, 819-825
- Burnham, K.P. et Anderson, D.R. (2004) Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection. *Sociological Methods and Research*, 33, 261-304.
- <http://dx.doi.org/10.1177/0049124104268644>Burruss, E. D., et Tan, M. (2017). Ecological opportunity alters the timing and shape of adaptive radiation. *Evolution*, 71(11), 2650-2660. doi:10.1111/evo.13362
- Burruss, E.D., Piálek, L., Casciotta, J.R., Almirón, A., Tan, M., Armbruster, J.W. et Říčan, O. (2018). Island- and lake-like parallel adaptive radiations replicated in rivers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285.
- Bussing, W. A. (1976). Geographic distribution of the San Juan Ichthyofauna of Central America with remarks on its origin and ecology. *Invest. Ichthyofauna Nicaraguan Lakes* 11:157–175.
- Butler, Rhett A. (2013). Amazon river ecosystems being rapidly degraded, but remain neglected by conservation efforts. Mongabay. <https://news.mongabay.com/2013/02/amazon-river-ecosystems-being-rapidly-degraded-but-remain-neglected-by-conservation-efforts/>
- Camargo, M.L., Giarrizzo, T., et Isaac, V.J. (2005). REVIEW OF THE GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF FISH FAUNA OF THE XINGU RIVER BASIN, BRAZIL.
- Campbell, K. E., Frailey, C. D., et Romero-Pittman, L. (2006). The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 239(1-2), 166-219. doi:10.1016/j.palaeo.2006.01.020
- Campbell Grant, E. H., Lowe, W. H., et Fagan, W. F. (2007). Living in the branches: population dynamics and ecological processes in dendritic networks. *Ecol Lett*, 10(2), 165-175. doi:10.1111/j.1461-0248.2006.01007.x
- Campbell Grant, E. H., Nichols, J. D., Lowe, W. H., et Fagan, W. F. (2010). Use of multiple dispersal pathways facilitates amphibian persistence in stream networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(15), 6936-6940. doi:10.1073/pnas.1000266107
- Carleton, K. L. H., F.; Kocher, T. (1999). Visual pigments of African cichlid fishes: evidence for ultraviolet vision from microspectrophotometry and DNA sequences. *Elsevier*, 879–890.
- Castello, L., McGrath, D.G., Hess, L.L., Coe, M.T., Lefebvre, P.A., Petry, P., ... Arantes, C.C. (2013). The vulnerability of Amazon freshwater ecosystems. *Conservation Letters*, 6, 217-229.
- Castello, L. et Macedo, M.N. (2016). Large-scale degradation of Amazonian freshwater ecosystems. *Global Change Biology*, 22, 990-1007.
- Chanseau, M., Bosc, S., Galiay, E., et Oules, G. (2002). L'utilisation De L'huile De Clou De Girofle Comme Anesthésique Pour Les Smolts De Saumon Atlantique (*Salmo Salar* L.) Et Comparaison De Ses Effets Avec Ceux Du 2-Phenoxyethanol. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* (pp. 365-366), 579-589. DOI:10.1051/kmae:2002054.
- Chirif, A. (2017). IRSA Sur corrupción comenzó antes del contrato. Servindi - Servicios de Comunicación Intercultural.
- Clapperton, Chalmers M. (1993). Nature of environmental changes in South America at the Last Glacial Maximum, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, Volume 101, Issues 3–4, Pages 189-208, ISSN 0031-0182, [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(93\)90012-8](https://doi.org/10.1016/0031-0182(93)90012-8).
- Cohen AS, Soreghan M, Scholz CA. (1993). Estimating the age of formation of lakes: an example from Lake Tanganyika, East African Rift system. *Geology* 21:511–514
- Cohen AS, Lezzar KE, Tiercelin JJ, Soreghan M. (1997). New paleogeographic and lake-level reconstructions of Lake Tanganyika: implications for tectonic, climatic and biological evolution in a rift lake. *Basin Res* 7:107–132
- Colinvaux, P. A. (1987). Amazon diversity in the light of the paleoecological record. *Quat. Sci. Rev.*, 6, 93-114.
- Colinvaux, P. A. (1993). Pleistocene biogeography and diversity in tropical forests of South America. in *Biological relationships between Africa and South America*, ed. P. Goldblatt. Yale University Press, New Haven, CT, pp. 473-99.
- Colinvaux, P. A.; Moreno, J. E., Miller, M. C., Bush, M. B. (1996). A long pollen record from lowland Amazonia forest and cooling in glacial times.
- Cornuet J-M., V. Ravigné et A. Estoup (2010). Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *BMC Bioinformatics* 11, 401.
- Cornuet, J-M., Pudlo, P., Veyssier, J., Dehne-Garcia A., Gautier M., Leblois R., Marin J-M, and A. Estoup. (2014). DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*. Vol. 30, no. 8, p1187-1189, doi: 10.1093/bioinformatics/btt763.

- Couceiro, S. R., Forsberg, B. R., Hamada, N., & Ferreira, R. L. (2006). Effects of an oil spill and discharge of domestic sewage on the insect fauna of Cururu stream, Manaus, AM, Brazil. *Braz J Biol*, 66(1A), 35-44. doi:/S1519-69842006000100006
- Couldridge, V.C.K. et Alexander, G.J. (2001). Does the time spent near a male predict female mate choice in a Malawian Cichlid? *Journal of Fish Biology*, 59, 667-672.
- Couldridge, V.C.K. et Alexander, G.J. (2002). Color patterns and species recognition in four closely related species of Lake Malawi. *Behavioral Ecology*, 13, 59-64.
- Coulter GW. (1991). *Lake Tanganyika and its life*. Oxford University Press, Oxford
- Cox, P. M., Betts, R. A., Collins, M., Harris, P. P., Huntingford, C., et Jones, C. D. (2004). Amazonian forest dieback under climate-carbon cycle projections for the 21st century. *Theoretical and Applied Climatology*, 78(1-3). doi:10.1007/s00704-004-0049-4
- Cracraft, J. (1989) Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: Otte, D. and Endler, J.A. (Eds.). *Speciation and Its Consequences* (pp. 25-59). Sinauer, Sunderland.
- Crampton, W. G. R. (1999). Plano de manejo para o uso sustentável de peixes ornamentais na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. In: Queiroz, H. L. et W. G. R. Crampton (Eds.). *Estratégias para Manejo de Recursos Pesqueiros em Mamirauá* (pp. 208). Brasília. Sociedade Civil Mamirauá/MCT, CNPq.
- Crispo, E., P. Bentzen, D. N. Reznick, M. T. Kinnison, and A. P. Hendry. (2006). The relative influence of natural selection and geography on gene flow in guppies. *Molecular Ecology* 15:49–62.
- D'Almeida, C., Vörösmarty, C. J., Hurtt, G. C., Marengo, J. A., Dingman, S. L., et Keim, B. D. (2007). The effects of deforestation on the hydrological cycle in Amazonia: a review on scale and resolution. *International Journal of Climatology*, 27(5), 633-647. doi:10.1002/joc.1475
- Dagosta, F., & de pinna, M. (2019). The Fishes of the Amazon: Distribution and Biogeographical Patterns, with a Comprehensive List of Species. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 431, 1. doi:10.1206/0003-0090.431.1.1
- Danley PD, Markert JA, Arnegard ME, Kocher TD (2000) Divergence with gene flow in the rock-dwelling cichlids of Lake Malawi. *Evolution* 54:1725–1737
- Danley PD, Kocher TD (2001) Speciation in rapidly diverging systems: lessons from Lake Malawi. *Mol Ecol* 10:1075–1086
- Danley, P. D., Husemann, M., Ding, B., Dipietro, L. M., Beverly, E. J., et Peppe, D. J. (2012). The impact of the geologic history and paleoclimate on the diversification of East african cichlids. *Int J Evol Biol*, 2012, 574851. doi:10.1155/2012/574851
- Davidson, E. A., de Araujo, A. C., Artaxo, P., Balch, J. K., Brown, I. F., MM, C. B., . . . Wofsy, S. C. (2012). The Amazon basin in transition. *Nature*, 481(7381), 321-328. doi:10.1038/nature10717
- Delvaux D (1995) Age of Lake Malawi (Nyasa) and water level fluctuations. *Mus R Afr Centr Tervuren (Belg.) Dept Geol Min Rapp Ann* 1995–1996:99–108
- Deutsch JC (1997) Colour diversification in Malawi cichlids: evidence for adaptation, reinforcement or sexual selection? *Biol J Linn Soc* 62:1–14
- Dobzhansky T (1937) *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York
- Dominey WJ (1984) Effects of sexual selection and life history on speciation: species flocks in African cichlids and Hawaiian *Drosophila*. In: Echelle AA, Kornfield I (eds) *Evolution of fish species flocks*. University of Maine at Orono Press, Orono, Me., pp 231–250
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolement procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- DiBattista, J. D., Berumen, M. L., Gaither, M. R., Rocha, L. A., Eble, J. A., Choat, J. H. et McClain, C. (2013). After continents divide: comparative phylogeography of reef fishes from the Red Sea and Indian Ocean. *Journal of Biogeography*, 40, 1170-1181. DOI:10.1111/jbi.12068.
- Dumont, J.F., Lamotte, S. et Fournier, M. (1988). Neotectonica del arco de Iquitos (Jenaro Herrera, Peru). *Boletin de la Sociedad Geológica del Perú*, 7-17.
- Dumont, J.-F. et García, F. (1989). Pleistocene deposits in Amazonian Peru: are lithological characteristics related to glacial interstages? *Proceeding of the IGCP meeting*, La Paz.
- Dumont, J. F., Lamotte, S. et Kahn, F., (1990). Wetland and upland forest ecosystems in Peruvian Amazonia_ plant species diversity in the light of some geological and botanical evidence. *Elsevier Science*, 125-139.
- Dumont, J. F. (1991). Cambio del curso de los ríos Maraón et Ucayali en la depresión Ucayali durante el cuaternario reciente. VII Congreso Peruano de Geología, Lima 1991.
- Dumont, J. F. (1992). Rasgos morfoestructurales de la llanura amazónica del Perú _efecto de la neotectónica sobre los cambios fluviales y la delimitación de las provincias morfológicas. *Bulletin de l'Institut français d'études andines*, 21, 801-833.
- Dumont, J. F., et Fournier, M. (1994). Geodynamics environment of quaternary morphostructures of the subandean foreland basins of Peru and Bolivia: characteristics and study methods. *Quaternary International*, 21, 129-142.
- Duponchelle, F., Pouilly, M., Pécheyran, C., Hauser, M., Renno, J.-F., Panfili, J., . . . Heino, J. (2016). Trans-Amazonian natal homing in giant catfish. *Journal of Applied Ecology*, 53(5), 1511-1520. doi:10.1111/1365-2664.12665
- Elliott JM (1971) The distances travelled by drifting invertebrates in a Lake District stream. *Oecologia* 6:350–379

- Elmer, K. R., Reggio, C., Wirth, T., Verheyen, E., Salzburger, W., et Meyer, A. (2009). Pleistocene desiccation in East Africa bottlenecked but did not extirpate the adaptive radiation of Lake Victoria haplochromine cichlid fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(32), 13404-13409. doi:10.1073/pnas.0902299106
- Elmer, K. R., S. Fan, H. M. Gunter, J. C. Jones, S. Boekhoff, S. Kuraku, et A. Meyer. (2010a). Rapid evolution and selection inferred from the transcriptomes of sympatric crater lake cichlid fishes. *Mol. Ecol.* 19 (Suppl. 1):197–211.
- Elmer, K. R., H. Kusche, T. K. Lehtonen, et A. Meyer. (2010b). Local variation and parallel evolution: morphological and genetic diversity across a species complex of Neotropical crater lake cichlid fishes. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 365:1769–1782.
- Elmer, K. R., T. K. Lehtonen, A. Kautt, C. Harrod, et A. Meyer. (2010c). Rapid sympatric ecological differentiation of crater lake cichlid fishes in historic times. *BMC Biol.* 8:60.
- Elmer, K. R., Lehtonen, T. K., Fan, S. et Meyer, A. (2013). CRATER LAKE COLONIZATION BY NEOTROPICAL CICHLID FISHES. *Evolution*, 67: 281-288. doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01755.x
- Elmer, K., Fan, S., Kusche, H. et al. (2014). Parallel evolution of Nicaraguan crater lake cichlid fishes via non-parallel routes. *Nat Commun* 5, 5168. doi:10.1038/ncomms6168
- Engelking B, Römer U, Beisenherz W. (2010). Intraspecific colour preference in mate choice by female *Apistogramma cacatuoides* HOEDEMAN, 1951 (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Vertebr Zool.* 60:199–208.
- Evanno, G., Regnaut, S., et Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*, 14(8), 2611-2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Exbrayat, J. F., Liu, Y. Y., et Williams, M. (2017). Impact of deforestation and climate on the Amazon Basin's above-ground biomass during 1993-2012. *Sci Rep*, 7(1), 15615. doi:10.1038/s41598-017-15788-6
- Farias IP, Ortí G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A (1999) Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage. *J Mol Evol* 48
- Farias, I. P. O. G. M., A. (2000). Total Evidence Molecules, Morphology, and the Phylogenetics of Cichlid Fishes. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY (MOL DEV EVOL)*(288), 76–92.
- Fernandes, Rodrigo; Gomes, Luiz; Pelicice, Fernando; Agostinho, Angelo. (2009). Temporal organization of fish assemblages in floodplain lagoons: The role of hydrological connectivity. *Environmental Biology of Fishes.* 85. 99-108. doi:10.1007/s10641-009-9466-7.
- Finer, M., Jenkins, C. N., Pimm, S. L., Keane, B., et Ross, C. (2008). Oil and gas projects in the Western Amazon: threats to wilderness, biodiversity, and indigenous peoples. *PLOS ONE*, 3(8), e2932. DOI:10.1371/journal.pone.0002932.
- Finer, M. et Jenkins, C.N. (2012). Proliferation of hydroelectric dams in the Andean Amazon and implications for Andes-Amazon connectivity. *PLOS ONE*, 7, e35126.
- Fitzgerald, D. B., Sabaj Perez, M. H., Sousa, L. M., Gonçalves, A. P., Rapp Py-Daniel, L., Lujan, N. K., . . . Lundberg, J. G. (2018). Diversity and community structure of rapids-dwelling fishes of the Xingu River: Implications for conservation amid large-scale hydroelectric development. *Biological Conservation*, 222, 104-112. doi:10.1016/j.biocon.2018.04.002
- Fitzpatrick, B. M., Fordyce, J. A., et Gavrillets, S. (2008). What, if anything, is sympatric speciation? *J Evol Biol*, 21(6), 1452-1459. doi:10.1111/j.1420-9101.2008.01611.x
- Fontes, D., Cordeiro, R. C., Martins, G. S., Behling, H., Turcq, B., Sifeddine, A., . . . Rodrigues, R. A. (2017). Paleoenvironmental dynamics in South Amazonia, Brazil, during the last 35,000 years inferred from pollen and geochemical records of Lago do Saci. *Quaternary Science Reviews*, 173, 161-180. doi:10.1016/j.quascirev.2017.08.021
- Forsberg, B.R., Melack, J.M., Dunne, T., Barthem, R.B., Goulding, M., Paiva, R.C.D., ... Weisser, S. (2017). The potential impact of new Andean dams on Amazon fluvial ecosystems. *PLOS ONE*, 12, e0182254.
- Frankham, R., Ballou, J. D. et Briscoe, D.A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Fraser, B. (2014). A rash of road construction is causing widespread change in the world's largest tropical forest — with potentially global consequences. *Nature* 509, 418–419 doi:10.1038/509418a
- Frederico, R. G., Olden, J.D. et Zuanon, J. (2016). Climate change sensitivity of threatened, and largely unprotected, Amazonian fishes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26, 91-102.
- Frederico, R. G., Zuanon, J. et De Marco Júnior, P. (2018) Amazon protected areas and its ability to protect stream-dwelling fish fauna. *Biological Conservation*, 219, DOI: 10.1016/j.biocon.2017.12.032.
- Freitas, C.E.C., Siqueira-Souza, F.K., Humston, R. et Hurd, L.E. (2013). An initial assessment of drought sensitivity in Amazonian fish communities. *Hydrobiologia*, 705, 159-171.
- Friedman, M., Keck, B. P., Dornburg, A., Eytan, R. I., Martin, C. H., Hulse, C. D., . . . Near, T. J. (2013). Molecular and fossil evidence place the origin of cichlid fishes long after Gondwanan rifting. *Proc Biol Sci*, 280(1770), 20131733. doi:10.1098/rspb.2013.1733
- Fryer G, Iles TD. (1972). *The cichlid fishes of the Great Lakes of Africa: their biology and evolution*. Edinburgh (UK): Oliver and Boyd.
- García-Dávila, C., Castro-Ruiz, D., Renno, J. F., Chota-Macuyama, W., Carvajal-Vallejos, F. M., Sanchez, H., . . . Duponchelle, F. (2015). Using barcoding of larvae for investigating the breeding seasons of pimelodid catfishes from the Marañón, Napo and Ucayali rivers in the Peruvian Amazon. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 40-51. doi:10.1111/jai.12987
- Gardner, E. (2012). Peru battles the golden curse of Madre de Dios. *Nature*, 486.
- Garza, J. C., et Williamson, E. G. (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol*, 10(2), 305-318. doi:10.1046/j.1365-294x.2001.01190.x
- Gavrillets S. (2004). *Fitness landscapes and the origin of species*. Princeton, NJ, USA: Princeton University Press.

- Genner, M. J., Seehausen, O., Lunt, D. H., Joyce, D. A., Shaw, P. W., Carvalho, G. R., et Turner, G. F. (2007). Age of cichlids: new dates for ancient lake fish radiations. *Molecular Biology and Evolution*, 24(5), 1269-1282. DOI:10.1093/molbev/msm050.
- Gerstner, C. L. O., H.; Sanchez, H., et Graham D. L. (2006). Effects of the freshwater aquarium trade on wild fish populations in differentially-fished areas of the Peruvian Amazon. *Journal of Fish Biology*, 68, 862–875. DOI:10.1111/j.1095-649.2006.00978.x.
- Greenwood PH (1984a). What is a species flock. In: Echelle AA, Kornfield I (eds) *Evolution of fish species flocks*. University of Maine at Orono Press, Orono, Me., pp 13–20
- Goudet, J., (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *The Journal of Heredity*, 485-486.
- Häggi, C., Chiessi, C. M., Merkel, U., Mulitza, S., Prange, M., Schulz, M., et Schefuß, E. (2017). Response of the Amazon rainforest to late Pleistocene climate variability. *Earth and Planetary Science Letters*, 479, 50-59. doi:10.1016/j.epsl.2017.09.013
- Hammen, T. v. d. (1974). The Pleistocene Changes of Vegetation and Climate in Tropical South America. *Journal of Biogeography*, 1(1), 3-26.
- Hammen, van der T., et Absy, M. L. (1994). Amazonia during the last glacial. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 109(2-4), 247-261. doi:10.1016/0031-0182(94)90178-3
- Hanfling, B., and D. Weetman. (2006). Concordant genetic estimators of migration reveal anthropogenetically enhanced source-sink population structure in the river sculpin, *Cottus gobio* Genetics 173: 1487–1501.
- Hardy, O. J., Charbonnel, N., Fréville, v., et Heuertz, M. (2003). Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. *the Genetics Society of America*, 163, 1467–1482.
- Hauser, M. (2018) Migração dos grandes bagres Amazônicos pela perspectiva dos isótopos de Estrôncio em otólitos. PhD, Programa de Pós Graduação da rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia legal Porto Velho, Brazil: Universidade Federal do Rondônia (UNIR).Hennig, W. (1966). *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
- Hofmann, C. M., O'Quin, K. E., Justin Marshall, N., et Carleton, K. L. (2010). The relationship between lens transmission and opsin gene expression in cichlids from Lake Malawi. *Vision Res*, 50(3), 357-363. doi:10.1016/j.visres.2009.12.004
- Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G.A. et Lorente, M.A. (1995). Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology*, 23: 237-240.
- Hoorn C., G. R. Bogotá-A, M. Romero-Baez, E. I. Lammertsma, S. G. A. Flantua, E. L. Dantas, R. Dino, D. A. do Carmo, F. Chemale Jr. (2017). The Amazon at sea: Onset and stages of the Amazon River from a marine record, with special reference to Neogene plant turnover in the drainage basin. *Global Planet. Change* 153, 51–65.
- Hubert, N., et Renno, J.-F. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33(8), 1414-1436. DOI:10.1111/j.1365-2699.2006.01518.x
- Hurd, L. E., Sousa, R. G. C., Siqueira-Souza, F. K., Cooper, G. J., Kahn, J. R., et Freitas, C. E. C. (2016). Amazon floodplain fish communities: Habitat connectivity and conservation in a rapidly deteriorating environment. *Biological Conservation*, 195, 118-127. doi:10.1016/j.biocon.2016.01.005
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2017) normativa interministerial n°01/2012, <https://www.ibama.gov.br/component/phocadownload/file/2331-instrucao-normativa-interministerial-n-01-2012>.
- Ito, P. M. M., Py-Daniel, L. H. R., (2015), A small species of *Crenicichla* Heckel, 1840 from middle rio Xingu, Brazil (Teleostei: Cichlidae), *Neotropical Ichthyology* 13, No. 3, pp. 471-478: 472
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405. DOI:10.1093/bioinformatics/btn129
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11, 94. doi:10.1186/1471-2156-11-94.
- Johnson, T. C., Scholz, C. A., Talbot, M. R., Kelts, K., Ricketts, R. D., Ngobi, G., . . . McGill, J. W. (1996). Late Pleistocene Desiccation of Lake Victoria and Rapid Evolution of Cichlid Fishes. *SCIENCE*, 273(5278), 1091-1093. doi:10.1126/science.273.5278.1091
- Joyce, D. A., Lunt, D. H., Genner, M. J., Turner, G. F., Bills, R., et Seehausen, O. (2011). Repeated colonization and hybridization in Lake Malawi cichlids. *Curr Biol*, 21(3), R108-109. doi:10.1016/j.cub.2010.11.029
- Junk, W. J. (1985). Temporary fat storage, an adaptation of some fish species to the waterlevel fluctuations and related environmental changes of the Amazon river. *Limnologie*, 315-351.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S. et Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649. DOI:10.1093/bioinformatics/bts199.
- Kingston, P. F. (2002). Long-term Environmental Impact of oil spills. *Spill Science & Technology Bulletin*, 7, 53-61.
- Kocher TD, Conroy JA, McKaye KR, Stauffer JR (1993). Similar morphologies of cichlid fish in lakes Tanganyika and Malawi are due to convergence. *Mol Phylogenet Evol* 2:158–165
- Kocher, T. D. (2004). Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nat Rev Genet*, 5(4), 288-298. doi:10.1038/nrg1316
- Konings, A. (1988). *Tanganyika Cichlids*. Verduijn Cichlids, Netherlands
- Konings, A. (1995). *Malawi Cichlids in Their Natural Habitat*, 2nd edn. Cichlid Press, St. Leon-Rot, Germany.. Verduijn Cichlids, Netherlands

- Kornfield I, Smith PF (2000) African cichlid fishes: model systems for evolutionary biology. *Annu Rev Ecol Syst* 31:163–196
- Koslowski, I. (2002). Die Buntbarsche Amerikas Band 2 Apistogramma & Co. Ulmer, Stuttgart.
- Kosswig C (1947) Selective mating as a factor speciation in cichlid fish of East African lakes. *Nature* 159:604
- Kullander, S.O. (1986). Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru. Swedish Museum of Natural History, Stockholm.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., et Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. DOI:10.1093/molbev/msy096
- Labonne, J., V. Ravigne', B. Parisi, et C. Gaucherel. 2008. Linking dendritic network structures to population demographics: the downside of connectivity. *Oikos* 117:1479–1490.
- Lacerda, L. D., et Pfeiffer, W. C. (1992). Mercury from Gold Mining in the Amazon Environment - an Overview. *Química Nova*, 155-160.
- Lopez-Fernandez, H., Winemiller, K. O., et Honeycutt, R. L. (2010). Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Mol Phylogenet Evol*, 55(3), 1070-1086. doi:10.1016/j.ympev.2010.02.020
- Latini, A.O. et Petrer, M.J. (2004). Reduction of native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. *Fisheries Management and Ecology*, 11, 71-79.
- Latrubesse, E. M., Cozzuol, M., da Silva-Caminha, S. A. F., Rigsby, C. A., Absy, M. L., et Jaramillo, C. (2010). The Late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. *Earth-Science Reviews*, 99(3-4), 99-124. doi:10.1016/j.earscirev.2010.02.005
- Lawrence, D., et Vandecar, K. (2015). Effects of tropical deforestation on climate and agriculture. *Nature Climate Change*, 5(1), 27-36. doi:10.1038/nclimate2430
- Lebreton, L. C. M., van der Zwet, J., Damsteeg, J. W., Slat, B., Andrady, A., et Reisser, J. (2017). River plastic emissions to the world's oceans. *Nat Commun*, 8, 15611. doi:10.1038/ncomms15611
- Lees, Alexander; Peres, Carlos; Fearnside, Philip; Schneider, Maurício; Zuanon, Jansen. (2016). Hydropower and the future of Amazonian biodiversity. *Biodiversity and Conservation*. 25. 466. 10.1007/s10531-016-1072-3.
- Leitão, C. S. S., Santos, C. H. A., Souza, É. M. S., Vilarinho, G. C. C., Paula-Silva, M. N., Val, P., . . . de Almeida-Val, V. M. F. (2017). Development and characterization of microsatellite loci in Amazonian dwarf cichlids *Apistogramma* spp. (Perciformes: Cichlidae): Uncovering geological influence on Amazonian fish population. *Journal of Applied Ichthyology*, 33(6), 1196-1199. doi:10.1111/jai.13490
- Lezzar KE, Tiercelin JJ, De Batist M, Cohen AS, Bandora T, Van Regensbergen P, Le Turdu C, Mifundu W, Klerkx J (1996) New seismic stratigraphy and Late Tertiary history of the North Tanganyika Basin, East African Rift system, deduced from multichannel and high-resolution reflection seismic data and piston core evidence. *Basin Res* 8:1–28
- Losey, G. S., McFarland, W. N., Loew, E. R., Zamzow, J. P., Nelson, P. A., Marshall, N. J., et Montgomery, W. L. (2003). Visual Biology of Hawaiian Coral Reef Fishes. I. Ocular Transmission and Visual Pigments. *Copeia*, 2003(3), 433-454. doi:10.1643/01-053
- Lugon-Moulin, N., Brunner, H., Balloux, F., Hausser, J., et Goudet, J. (1999). Do riverine barriers, history or introgression shape the genetic structuring of a common shrew (*Sorex araneus*) population? *Heredity* (Edinb), 83 (Pt 2), 155-161. doi:10.1046/j.1365-2540.1999.00567.x
- Lundberg, G. M., Marshall, L. G., Guerrero, J., Horton, B. K., Malabarba, M. C., et Wesselingh, F. (1998). The stage for neotropical fish diversification A history of tropical South American rivers.
- Lyons, R. P., Scholz, C. A., Cohen, A. S., King, J. W., Brown, E. T., Ivory, S. J., . . . Blome, M. W. (2015). Continuous 1.3-million-year record of East African hydroclimate, and implications for patterns of evolution and biodiversity. *PNAS*, 112, 15568-15573.
- Lytle, D. A., & Peckarsky, B. L. (2001). Spatial and temporal impacts of a diesel fuel spill on stream invertebrates. *Freshwater Biology*, 46, 693-704.
- Maan, M. E., Haesler, M. P., Seehausen, O., et Van Alphen, J. J. (2006). Heritability and heterochrony of polychromatism in a Lake Victoria Cichlid fish: Stepping stones for speciation? *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 306(2), 168-176. doi:10.1002/jez.b.21083
- Machado-Schiaffino, G., Henning, F., et Meyer, A. (2014). Species-specific differences in adaptive phenotypic plasticity in an ecologically relevant trophic trait: hypertrophic lips in Midas cichlid fishes. *Evolution*, 68(7), 2086-2091. doi:10.1111/evo.12367
- Machado-Schiaffino, G., Kautt, A. F., Torres-Dowdall, J., Baumgarten, L., Henning, F., et Meyer, A. (2017). Incipient speciation driven by hypertrophied lips in Midas cichlid fishes? *Mol Ecol*, 26(8), 2348-2362. doi:10.1111/mec.14029
- Mahmood, R., Pielke, R. A., Hubbard, S. K. G., Niyogi, D., Dirmeyer, P. A., McAlpine, C., . . . Fall, S. (2013). Land cover changes and their biogeophysical effects on climate. *Royal Meteorological Society*.
- Malabarba, M. C., Zuleta, O., et Papa, C. D. (2006). *Proterocara argentina*, a new fossil cichlid from the Lumbra Formation, Eocene of Argentina. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 26(2), 267-275. doi:10.1671/0272-4634(2006)26[267:paanfc]2.0.co;2
- Malhi, Y., Aragão, L.E.O.C., Galbraith, D., Huntingford, C., Fisher, R., Zelazowski, P., et Meir, P. (2009). Exploring the likelihood and mechanism of a climate-change-induced dieback of the Amazon rainforest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 20610-20615.
- Malhi, Y., Roberts, J.T., Betts, R.A., Killeen, T.J., Li, W. et Nobre, C.A. (2008). Climate Change, Deforestation, and the Fate of the Amazon. *Science*, 319, 169-172.
- Mallet, J. (1995) A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology et Evolution*. 10, 294-299.

- Manousaki, T., Hull, P. M., Kusche, H., Machado-Schiaffino, G., Franchini, P., Harrod, C., . . . Meyer, A. (2013). Parsing parallel evolution: ecological divergence and differential gene expression in the adaptive radiations of thick-lipped Midas cichlid fishes from Nicaragua. *Mol Ecol*, 22(3), 650-669. doi:10.1111/mec.12034
- Marengo, J. A., Nobre, C. A., Sampaio, G., Salazar, L. F., et Borma, L. S. (2011). Climate change in the Amazon Basin: Tipping points, changes in extremes, and impacts on natural and human systems. 259-283. doi:10.1007/978-3-642-05383-2_9
- Markert JA, Arnegard ME, Danley PD, Kocher TD (1999) Biogeography and population genetics of the Lake Malawi cichlid *Melanochromis auratus*: habitat transience, philopatry and speciation. *Mol Ecol* 8:1013–1026
- Mayden, R.L. et Wood, R.M. (1995) Systematics, species concepts and the evolutionarily significant unit in biodiversity and conservation biology. *American Fisheries Society Symposium*. 17, 58-113.
- Mayr, E. (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Mbomba, N. B. (1983). Comparative morphology of the feeding apparatus in cichlidian algal feeders of lake Tanganyika. *African Study Monographs*, 1-23.
- McKaye, K.R. et G.W. Barlow, (1976). Chemical recognition of young by the midas cichlid, *Cichlasoma citrinellum*. *Copeia* 1976(2):276-277.
- McKaye K. R. (1980) Seasonality in habitat selection by the gold color morph of *Cichlasoma citrinellum* and its relevance to sympatric speciation in the family Cichlidae. *Environ. Biol. Fish.* 5, 75–78.
- McKaye, K. R., et Marsh, A. (1983). Food switching by two specialized algae-scraping cichlid fishes in Lake Malawi, Africa. *Oecologia*, 56(2-3), 245-248. doi:10.1007/bf00379697
- McKaye KR, Gray WN (1984) Extrinsic barriers to gene flow in rock dwelling cichlids of Lake Malawi: microhabitat heterogeneity and reef colonisation. In: *Evolution of Fish Species Flocks* (eds Echelle AA, Kornfield I), pp. 169-184. University of Maine at Orono Press, Orono, Maine.
- McLennan, D.A. et Brooks, D.R. (2002) Complex histories of speciation and dispersal in communities: a re-analysis of some Australian bird data using BPA. *Journal of Biogeography*, 29, 1055–1066.
- Meier, J. I., Marques, D. A., Mwaiko, S., Wagner, C. E., Excoffier, L., et Seehausen, O. (2017). Ancient hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations. *Nat Commun*, 8, 14363. doi:10.1038/ncomms14363
- Mergler, D., Anderson, H. A., Chan, L. H., Mahaffey, K. R., Murray, M., Sakamoto, M., . . . Toxicological Effects of, M. (2007). Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio*, 36(1), 3-11. doi:10.1579/0044-7447(2007)36[3:meahei]2.0.co;2
- Mesa, S. L. M. et Lasso, C. A. (2011). Revisión del género *Apistogramma* Regan, 1913 (Perciformes, Cichlidae) en la cuenca del río Orinoco (Eds.). *Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia III* (pp.194). Instituto Humboldt. Bogotá, Colombia.
- Meyer, A. (1987). PHENOTYPIC PLASTICITY AND HETEROCHRONY IN *CICHLASOMA MANAGUENSE* (PISCES, CICHLIDAE) AND THEIR IMPLICATIONS FOR SPECIATION IN CICHLID FISHES. *Evolution*, 41(6), 1357-1369. doi:10.1111/j.1558-5646.1987.tb02473.x
- Meyer, A. (1989) Costs and benefits of morphological specialization: feeding performance in the trophically polymorphic Neotropical cichlid fish *Cichlasoma citrinellum*. *Oecologia* 80, 431–436. (doi:10.1007/BF00379047)
- Meyer, A. (1990a) Ecological and evolutionary consequences of the trophic polymorphism in *Cichlasoma citrinellum* (Pisces: Cichlidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 39, 279–299. (doi:10.1111/j.1095-8312.1990.tb00517.x)
- Meyer, A. (1990b) Morphometrics and allometry in the trophically polymorphic cichlid fish, *Cichlasoma citrinellum*: alternative adaptations and ontogenetic changes in shape. *J. Zool.* 221, 237–260. (doi:10.1111/j.1469-7798.1990.tb03994.x)
- Meyer A, Kocher TD, Basasibwaki P, Wilson AC (1990) Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* 347:550–553
- Meyer, A. (1993). Phylogenetic relationships and evolutionary processes in East African cichlid fishes. *Trends Ecol. Evol.* 8, 279–284.
- Mix, S. E. H. e. A. C. (1998). Pleistocene Precipitation Balance in the Amazon Basin Recorded in Deep Sea Sediments. *Quaternary Research*, 14-26.
- Miya, M., et Nishida, M. (2000). Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17(3), 437-455. DOI:10.1006/mpev.2000.0839.
- Miyagi, R., Terai, Y., Aibara, M., Sugawara, T., Imai, H., Tachida, H., . . . Okada, N. (2012). Correlation between nuptial colors and visual sensitivities tuned by opsins leads to species richness in sympatric Lake Victoria cichlid fishes. *Mol Biol Evol*, 29(11), 3281-3296. doi:10.1093/molbev/mss139
- Morrissey, M. B., et de Kerckhove, D. T. (2009). The maintenance of genetic variation due to asymmetric gene flow in dendritic metapopulations. *Am Nat*, 174(6), 875-889. doi:10.1086/648311
- Morton, D. C., DeFries, R. S., Shimabukuro, Y. E., Anderson, L. O., Arai, E., del Bon Espirito-Santo, F. et Morissette, J. (2006). Cropland expansion changes deforestation dynamics in the southern Brazilian Amazon. *PNAS*, 103(39), 14637-14641. DOI:10.1073/pnas.0606377103.
- Muneepeerakul, R., E. Bertuzzo, H. J. Lynch, W. F. Fagan, A. Rinaldo, et I. Rodriguez-Iturbe. (2008). Neutral metacommunity models predict fish diversity patterns in Mississippi-Missouri basin. *Nature* 453:220–223.

- Musilová, Z., Oldřich Říčan, Karel Janko, Jindřich Novák. (2008) Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Volume 46, Issue 2, Pages 659-672, ISSN 1055-7903
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A., et Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858. doi:10.1038/35002501
- Nagl S, Tichy H, Mayer WE, Takezaki N, Takahata N, Klein J (2000) The origin and age of haplochromine fishes in Lake Victoria, East Africa. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267:1049–1061
- Nei, M. et Chesser, R. K. (1983). Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics*, 47, 253-259. DOI:10.1111/j.1469-1809.1983.tb00993.x
- Nepstad, D. C., Stickler, C. M., Filho, B. S., et Merry, F. (2008). Interactions among Amazon land use, forests and climate: prospects for a near-term forest tipping point. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363(1498), 1737-1746. doi:10.1098/rstb.2007.0036
- Nishida M (1991) Lake Tanganyika as an evolutionary reservoir of old lineages of East African cichlid fishes: inferences from allozyme data. *Experientia* 47:974–979
- Nogueira, C., Buckup, P.A., Menezes, N.A., Oyakawa, O.T., Kasecker, T.P., Ramos Neto, M.B. et da Silva, J.M.C. (2010). Restricted-range fishes and the conservation of Brazilian freshwaters. *PLOS ONE*, 5, e11390.
- Novo, M., Fernandez, R., Marchan, D. F., Monica, G., et Cosin, D. J. (2012). Compilation of morphological and molecular data, a necessity for taxonomy: The case of *Hormogaster abbatissae* sp. n. (Annelida, Clitellata, Hormogastridae). *Zookeys*(242), 1-16. doi:10.3897/zookeys.242.3996
- Oberdorff, T., Dias, M. S., Jezequel, C., Albert, J. S., Arantes, C. C., Bigorne, R., . . . Zuanon, J. (2019). Unexpected fish diversity gradients in the Amazon basin. *Sci Adv*, 5(9), eaav8681. doi:10.1126/sciadv.aav8681
- Odhambo, E. A., Mautner, S. I., Bock, O., et Sturmbauer, C. (2012). Genetic distinction of four haplochromine cichlid fish species in a satellite lake of Lake Victoria, East Africa. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 50(1), 51-58. DOI:10.1111/j.1439-0469.2011.00641.x
- Olden, J.D., Hogan, Z.S. et Zanden, M.J.V. (2007). Small fish, big fish, red fish, blue fish: size-biased extinction risk of the world's freshwater and marine fishes. *Global Ecology and Biogeography*, 16, 694-701.
- Olsen, Jesse; Castello, Leandro; Jiao, Yan; Batista, Vandick; Fabré, Nidia. (2019). Evaluating flood pulse relationships with fish catch in river-floodplains of the central Amazon: Flood pulse relationships with fish catch in the Amazon. *Ecohydrology*. e2067. 10.1002/eco.2067.
- Oosterhout, C. , Hutchinson, W. F., Wills, D. P. et Shipley, P. (2004), micro - checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Ortega H. et Castro, E., (1998). Hidrobiología de la Cuenca del Río Nanay. Evaluación de la Ictiofauna, Diagnostico de la Pesquería y Propuesta de Manejo de los Recursos Hidrobiológicos (pp 60). CEDIA. Lima, Perú.
- Owen RB, Crossley R, Johnson TC, Tweddle D, Kornfield I, Davison S, Eccles DH, Engstrom DE (1990) Major low levels 288 of Lake Malawi and implications for evolution rates in cichlid fishes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 240:519–553
- Patton, T. L., Moustafa, A. R., Nelson, R. A., and Abdine, S. A., (1994), Tectonic evolution and structural setting of the Suez Rift, in Landon, S. M., ed., *Interior rift basins: American Association of Petroleum Geologists Memoir* 59, p. 9–55.
- Peres, C. A., et Schneider, M. (2012). Subsidized agricultural resettlements as drivers of tropical deforestation. *Biological Conservation*, 151(1), 65-68. doi:10.1016/j.biocon.2011.11.011
- Piálek, L., Říčan, O., Casciotta, J., Almirón, A. et Zrzavý, J. (2012). Multilocus phylogeny of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae), with biogeography of the C. lacustris group: Species flocks as a model for sympatric speciation in rivers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 46-61.
- Piálek, L., Dragová, K., Casciotta, J., Almirón, A., et Říčan, O. (2015). Description of two new species of *Crenicichla* (Teleostei Cichlidae) from the lower Iguazú River with a taxonomic reappraisal of *C. iguassuensis*, *C. tesay* and *C. yaha*. *HISTORIA NATURAL*, 5 (2), 5-27.
- Pimm, S.L., Jenkins, C.N., Abell, R., Brooks, T.M., Gittleman, J.L., Joppa, L.N., ... Sexton, J.O. (2014). The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science*, 344, 1246752.
- Pitman, N. C. A., Widmer, J., Jenkins, C. N., Stocks, G., Seales, L., Paniagua, F., et Bruna, E. M. (2011). Volume and Geographical Distribution of Ecological Research in the Andes and the Amazon, 1995–2008. *Tropical Conservation Science*, 4(1), 64-81. DOI:10.1177/194008291100400107.
- Pitman, N., Vriesendorp, C., Rivera Chávez, L., Wachter, T., Alvira Reyes, D., Del Campo, Á., . . . Heilpern, S. (2015). Perú: Tapiche-Blanco Fiel Museum Publications, 27, 256.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2): 945-959.
- Quéroutil, S., Vela Diaz, A., García-Dávila, C., Römer, U., et Renno, J. F. (2015). Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in neotropical fish of the genus *Apistogramma* (Perciformes: Labroidae: Cichlidae). *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 52-56. DOI:10.1111/jai.12975.
- Quintana-Cobo, I., Moreira-Turcq, P., C. Cordeiro, R., Aniceto, K., Crave, A., Fraizy, P., S. Moreira, L., de Aguiar Duarte Contrera, J. M., Turcq, B. (2018) Dynamics of floodplain lakes in the Upper Amazon Basin during the late Holocene, *Comptes Rendus Geoscience*, Volume 350, Issues 1–2. Pages 55-64, ISSN 1631-0713
- RADAMBRESIL (1977)- Levantamento de recursos naturais. Folha SB.19 JURUA,. Ministerio das Minas e Energia, Projeto Radambresil.

- Ramos Sato, L. R. (2007). Estudo das relações filogenéticas de Trichomycteridae (Teleostei, Siluriformes) com base em evidências cromossômicas e moleculares (PhD thesis). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Brazil.
- Räsänen, M. E., Salo, J. S. et Kalliola, R. J., (1987). Fluvial Perturbance in the Western Amazon Basin Regulation by Long-Term Sub-Andean Tectonics. *Science*, 238.
- Räsänen, M.E., Salo, J.S., Jungner, H. and Romero Pittman, L. (1990). Evolution of the Western Amazon Lowland Relief: Impact of Andean foreland dynamics. *Terra Nova*, 2, 320-332.
- Räsänen, M.E., Neller, R., Salo, J., Jungner, H., (1992). Recent and ancient fluvial deposition systems in the Amazonian foreland basin, Peru. *Geological Magazine* 129, 293– 306.
- Räsänen, M., Linna, A., Irion, G., Rebata Hernani, L., Vargas Huaman, R., et Wesselingh, F. (1998) Geología y geoformas de la zona de Iquitos. En: Kalliola, R. & Flores, S. (eds.), *Geoecología y desarrollo amazónico: estudio integrado en la zona de Iquitos* (pp. 59-137), Perú. Turun, Turku, Annales Universitatis Turkuensis.
- Ready JS, Sampaio I, Schneider H, Vinson C et Dos Santos T.(2006). Colour forms of Amazonian cichlid fish represent reproductively isolated species. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 1139 -1148. DOI:10.1111/j. 1420-9101.2006.01088.x.
- Recknagel H, Elmer KR, Meyer A (2013). A hybrid genetic linkage map of two ecologically and morphologically divergent Midas cichlid fishes (*Amphilophus* spp.) obtained by massively parallel DNA sequencing (ddRADSeq). *G3-Genes Genomes Genetics*, 3, 65–74.
- Reinthal PN, Meyer A (1997). Molecular phylogenetic tests of speciation models in Lake Malawi cichlid fishes. In: Givnish TJ, Sytsma KJ (eds) *Evolution and adaptive radiations*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 189–224
- Reis, R. E., Albert, J. S., Di Dario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., et Rocha, L. A. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, 89(1), 12-47. DOI:10.1111/jfb.13016.
- Rensch B (1933) Zoologische Systematik und Artbildungsproblem. *Verh Dtsch Zool Ges* 1933:19–83
- Říčan, O., Plálek, L., Dragová, K. et Novák, J. (2016). Diversity and evolution of the Middle American cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) with revised classification. *Vertebrate Zoology*, 66, 1-102.
- Rico C, Turner GF (2002) Extreme microallopatric divergence in a cichlid species from Lake Malawi. *Mol Ecol* 11:1585–1590
- Riedel, D. 1972. Die Genesis der nicaraguenischen Grabenseen (Teil I) und des mesoamerikanischen Isthmus (Teil II) aus der Sicht des Fischereibiologen. *Arch. Hydrobiol.* 70(1):82-107.
- Ríos-Villamizar, E.; Piedade, Maria Teresa; Costa, J.; Adeney, J.; Junk, W.. (2013). Chemistry of different Amazonian water types for river classification: A preliminary review. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*. 178. 17-28. 10.2495/WS130021.
- Rocha-Olivares, A., Fleeger, J. W., et Foltz, D. W. (2001). Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic harpacticoid copepod. *Molecular Biology and Evolution*, 18(6), 1088-1102. DOI:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003880.
- Roldán G. (1992). *Fundamentos de Limnología Neotropical* (pp. 529). Editorial Universidad de Antioquía, Colombia.
- Römer, U. (1992). Weitere Beobachtungen zur Verbreitung, Ökologie und Aquarienbiologie von *Laetacara spec.* "Orangeflossen". *DCG-Informationen*, 23, 74-83.
- Römer, U. (1993). Freilandbeobachtungen an *Apistogramma diplotaenia* Kullander, 1987. *Buntbarschjahrbuch* (pp. 58-71), bede, Kollnburg.
- Römer U. (1995). Kritische Bemerkungen über Angaben zu Beständen und Bestandsentwicklungen von neotropischen Kleinfischen am Beispiel von *Apistogramma mendezi* und *Paracheirodon*. In Sioli H, editor. *Reports of the Workshop and Exhibition "Gefährdete Süßwasserfische tropischer Ökosysteme"*, Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Bonn, Germany.
- Römer, U. et Beisenherz, W. (1996). Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology*, 48, 714-725.
- Römer U., (2000) *Cichlid Atlas*. Volume 1. Melle: Mergus Verlag.
- Römer U. et Beisenherz W., (2005), Intra- and inter-specific mate choice of female *Apistogramma cacatoides* (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 16:339-347.
- Römer U. et Wise, M. (2006). Nominal list of known species and local morphs of the genus *Apistogramma* (Regan) imported until August 2005. in Römer, (Eds.). *Cichlid Atlas*. Volume 2 (pp. 378-390). Mergus publishers, Melle.
- Römer, U. et Hahn, I., (2008). *Apistogramma barlowi* sp. n.: Description of a new facultative mouth-breeding cichlid species (Teleostei: Perciformes: Geophaginae) from Northern Peru. *Vertebrate Zoology*, 58(1), 49-66.
- Römer, U., Duponchelle, F., Vela Díaz, A., García Davilla, C. R., Sirvas, S., Díaz Catchay, C., et Renno, J. F., (2011). *Apistogramma cinilabra* sp. n. Description of a potentially endangered endemic cichlid species (Teleostei Perciformes Cichlidae) from the Departamento Loreto, Peru. *Vertebrate Zoology*, 61 (1), 3-23.
- Römer, U., Beninde, J., Duponchelle, F., Vela Díaz, A., Ortega, H., Hahn, I., Soares, D. P., Díaz Cachay, C., García Dávila, C. R., Sirvas Cornejo, S. et Renno, J. F. (2012). Description of *Apistogramma allpahuayo* sp. n., a new dwarf cichlid species from in and around the Reserva Nacional Allpahuayo Mishana, Loreto, Peru. *Vertebrate Zoology*, 62 (2), 189-212.
- Römer, U. et Hahn, I., (2013). *Apistogramma aguarico* sp. n.: A new species of geophagine cichlid fish (Teleostei: Perciformes) from the Ecuadorian and Peruvian río Napo system. *Vertebrate Zoology*, 63(1), 171-181.
- Römer, U., Engelking, B. et Beisenherz, W. (2014). Genetically determined mate choice can be influenced by learning in *Apistogramma cacatuoides* Hoedeman, 1951 (Teleostei, Cichlidae). *Vertebrate Zoology*, 64(2), 199-206.

- Römer, U., Soares, D. P., García Dávila, C. R., Duponchelle, F., Renno, J. F. et Hahn, I., (2015). Re-description of *Apistogramma payaminonis* Kullander, 1986, with descriptions of two new cichlid species of the genus *Apistogramma*. *Vertebrate Zoology*, 65(3), 287-314.
- Römer, U., Römer, C. I., Estivals, G., Vela Díaz, A., Duponchelle, F., García Dávila, C. R., Hahn, I. et Renno, J. F., (2017). Description of a new maternal larvophilic mouth-brooding cichlid species, *Apistogramma megastoma* sp. n. (Teleostei Perciformes Geophaginae), from Loreto, Peru. *Vertebrate Zoology*, 67(2), 151-171.
- Rousset, F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145(4), 1219-1228.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., et Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302. DOI:10.1093/molbev/msx248.
- Rüber L, Verheyen E, Sturmbauer C, Meyer A (1998). Lake level fluctuations and speciation in rock-dwelling cichlid fish in Lake Tanganyika, East Africa. In: Grant PR (ed) *Evolution on islands*. Oxford University Press, New York, pp 225–240
- Salzburger, W., Meyer, A., Baric, S., Verheyen, E., et Sturmbauer, C. (2002b). Phylogeny of the Lake Tanganyika Cichlid Species Flock and Its Relationship to the Central and East African Haplochromine Cichlid Fish Faunas. *Syst. Biol.*, 51(1), 113–135.
- Salzburger, W., et Meyer, A. (2004). The species flocks of East African cichlid fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Naturwissenschaften*, 91(6), 277-290. doi:10.1007/s00114-004-0528-6
- Sánchez, L. E. (2015). The impact of the IIRSA Road Infrastructure Programme on Amazonia. *Impact Assessment and Project Appraisal*, 33(3), 234-235. doi:10.1080/14615517.2015.1051426
- Schindler, I. et Staack, W., (2013). Description of *Apistogramma helkeri* sp. n., a new geophagine dwarf cichlid (Teleostei Cichlidae) from the lower río Cuao (Orinoco drainage) in Venezuela. *Vertebrate Zoology*, 63(3), 301-306.
- Scholz CA, Rosendahl BR (1988) Low lake stands in Lakes Malawi and Tanganyika, East Africa, delineated with multifold seismic data. *Science* 240:1645–1648
- Seehausen O, Alphen JJM van, Witte F (1997) Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science* 277:1808–1811
- Seehausen, O., Witte, F., Alphen, J. J. et Bouton, N. (1998), Direct mate choice maintains diversity among sympatric cichlids in Lake Victoria. *Journal of Fish Biology*, 53: 37-55. doi:10.1111/j.1095-8649.1998.tb01016.x
- Seehausen O et Alphen JJM van (1999) Can sympatric speciation by disruptive sexual selection explain rapid evolution of cichlids diversity in Lake Victoria? *Ecol Lett* 2:262–271
- Seehausen O, Koetsier E, Schneider MV, Chapman LJ, Chapman CA, Knight ME, Turner GF, Alphen JJM van, Bills R (2003) Nuclear markers reveal unexpected genetic variation and a Congolese–Nilotic origin of the Lake Victoria cichlid species flock. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270:129–137
- Seehausen, O., Terai, Y., Magalhaes, I. S., Carleton, K. L., Mrosso, H. D., Miyagi, R., . . . Okada, N. (2008). Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature*, 455(7213), 620-626. doi:10.1038/nature07285
- Seehausen, O., et Magalhaes, I. S. (2010). Geographical Mode and Evolutionary Mechanism of Ecological Speciation in Cichlid Fish. *ECOLOGICAL SPECIATION IN CICHLID FISH*, 283- 308.
- Seehausen, O. (2015). Process and pattern in cichlid radiations - inferences for understanding unusually high rates of evolutionary diversification. *New Phytol*, 207(2), 304-312. doi:10.1111/nph.13450
- Sérbier, M., Mercier, J. L., Mégard, F., Laubacher, G., et Carey-Gailhardie, E. (1985). Quaternary normal and reverse faulting and the state of stress in the central Andes of south Peru. *TECTONICS*, 4(7), 739-780.
- Servant, M., Maley, J., Turcq, B., Absy, M.-L., Brenac, P., Fournier, M., et Marie-Pierre, L. (1993). Tropical forest changes during the late Quaternary in African and South American lowlands. *Global and planetary Change*, 25-40.
- Servedio, M. R., et Boughman, J. W. (2017). The Role of Sexual Selection in Local Adaptation and Speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48(1), 85-109. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110316-022905
- Shaw PW, Turner GF, Idid MR, Robinson RL, Carvalho GR (2000) Genetic population structure indicates sympatric speciation of Lake Malawi pelagic cichlids. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267:2273–2280
- Shephard G. E., R. D. Müller, L. Liu, M. Gurnis. (2010). Miocene drainage reversal of the Amazon River driven by plate–mantle interaction. *Nat. Geosci.* 3, 870–875. Sick, H. (1993). *Birds in Brazil: a natural history*. Princeton University Press, Princeton & Chichester.
- Silva, M.N.F. da et Patton, J.L. (1998). Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology*, 7: 475-486.
- Schluter D (2000) *The ecology of adaptive radiation*. Oxford University Press, New York
- Sousa, R. G. C., et Freitas, C. E. d. C. (2008). The influence of flood pulse on fish communities of floodplain canals in the Middle Solimões River, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 6, 249-255.
- Souza J., Frias, A., Vela, U. et Verdi, L. (2004). Principales hábitats para la captura de peces ornamentales en los ríos Nanay y Ucayali (pp. 296-299). *Memorias: VI Congreso Internacional de Manejo de Fauna silvestre en Amazonia y Latinoamérica*. Iquitos. Perú.
- Souza, Marcelo et Lemos, Clara. (2014). Book Review: "The Impact of the IIRSA Road Infrastructure Programme on Amazonia", Pitou van Dijck. *Journal of Environmental Assessment Policy and Management*. 16. 1480002. 10.1142/S1464333214800027.

- Souza, C., Affonso, P., Bitencourt, J., Sampaio, I., Carneiro, P. (2017). Species validation and cryptic diversity in the *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 complex (Teleostei, Cichlidae) from Brazilian coastal basins as revealed by DNA analyses. *Hydrobiologia*. 809. 10.1007/s10750-017-3482-y.
- Sierra Praeli, Y. (2019) Perú: nuevo derrame de petróleo en el Lote 192 se extiende por el río Corrientes. MONGABAY. <https://es.mongabay.com/2019/11/peru-nuevo-derrame-de-petroleo-en-el-lote-192-se-extiende-por-el-rio-corrientes/>
- Sioli, H., O Rio Arapiuns. Estudo limnológico de um corpo d'água da região do Terciário, Plioceno, Série das Barreiras, do baixo Amazonas. *Bol. Técn. Inst. Agr. Norte*, 32, pp. 1-116, 1956a.
- Sparks, J., et Smith, W. (2005). Freshwater fishes, dispersal ability, and nonevidence: "gondwana life rafts" to the rescue. *Syst Biol*, 54(1), 158-165. doi:10.1080/10635150590906019
- Stiassny MLJ et Meyer A (1999) Cichlids of the Rift Lakes. *Sci Am*280(2):64–69
- Streelman JT et Danley PD (2003) The stages of vertebrate evolutionary radiation. *Trends Ecol Evol* 18:126–131
- Sturmbauer C et Meyer A (1992) Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of African cichlid fishes. *Nature* 358:578–581
- Sturmbauer C, Baric S, Salzburger W, Rber L, Verheyen E (2001) Lake level fluctuations synchronize genetic divergences of cichlid fishes in African lakes. *Mol Biol Evol* 18:144–154
- Sturmbauer C, Hainz U, Baric S, Verheyen E, Salzburger W (2003) Evolution of the tribe Tropheini from Lake Tanganyika: synchronized explosive speciation producing multiple evolutionary parallelism. *Hydrobiologia* 500:51–64
- Stute M., Clark J.F., Schlosser P., Broecker W.S., et Bonani G., (1995a). "A 30,000 year continental paleotemperature record derived from noble gases dissolved in groundwater from the San Juan Basin, New Mexico". *Quatern. Res.*, 43 : 209-220.
- Swenson, J. J., Carter, C. E., Domec, J. C., et Delgado, C. I. (2011). Gold mining in the Peruvian Amazon: global prices, deforestation, and mercury imports. *PLOS ONE*, 6(4), e18875. DOI:10.1371/journal.pone.0018875
- Takahashi K, Terai Y, Nishida M, Okada N (2001b). Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in Lake Tanganyika as revealed by analysis of the insertion of retrotransposons. *Mol Biol Evol* 18:2057–2066
- Takahashi K, Okada N (2002). Mosaic structure and retrotranspositional dynamics during evolution of subfamilies of short interspersed elements in African cichlids. *Mol Biol Evol* 19:1303–1312
- Takahashi, R., Watanabe, K., Nishida, M., et Hori, M. (2007). Evolution of feeding specialization in Tanganyikan scale-eating cichlids: a molecular phylogenetic approach. *BMC Evol Biol*, 7, 195. doi:10.1186/1471-2148-7-195
- Takeda, M., Kusumi, J., Mizoiri, S., Aibara, M., Mzighani, S. I., Sato, T., . . . Tachida, H. (2013). Genetic structure of pelagic and littoral cichlid fishes from Lake Victoria. *PLoS One*, 8(9), e74088. doi:10.1371/journal.pone.0074088
- Tello S. et J. Cánepa. (1991). Estado actual de la explotación de los principales peces ornamentales de la Amazonía Peruana. *Folia Amazónica*, 3, 107-128.
- Terai, Y., Mayer, W. E., Klein, J., Tichy, H., et Okada, N. (2002). The effect of selection on a long wavelength-sensitive (LWS) opsin gene of Lake Victoria cichlid fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24), 15501-15506. doi:10.1073/pnas.232561099
- Terai, Y., Seehausen, O., Sasaki, T., Takahashi, K., Mizoiri, S., Sugawara, T., . . . Okada, N. (2006). Divergent selection on opsins drives incipient speciation in Lake Victoria cichlids. *PLoS Biol*, 4(12), e433. doi:10.1371/journal.pbio.0040433
- Tomadin, M., (2012). Spéciation explosive chez les cichlidés nains du genre *Apistogramma* Regan, 1913 (Teleostei, Cichlidae) : rôle de la sélection sexuelle ? (mémoire Master 2)
- Tougaard, C., García Davila, C. R., Romer, U., Duponchelle, F., Cerqueira, F., Paradis, E. et Renno, J. F. (2017). Tempo and rates of diversification in the South American cichlid genus *Apistogramma* (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *PLOS ONE*, 12(9), e0182618. DOI:10.1371/journal.pone.0182618.
- Turner, G. F. et Burrows M. T. A model of sympatric speciation by sexual selection. *Proc. R. Soc. Lond. B* 260, 287–292 (1995).
- Turner GF, Seehausen O, Knight ME, Allender CJ, Robinson RL. (2001). How many species of cichlid fishes are there in African lakes? *Mol Ecol* 10:793–806
- Val, A. L., Silva, M. N. P., et Almeida-Val, V. M. F. (1998). Hypoxia adaptation in fish of the Amazon a never-ending task. *S. Afr. J. Zool.*, 107-114.
- Val, A. L., Fearnside, P. M., et Almeida-Val, V. M. (2016). Environmental disturbances and fishes in the Amazon. *J Fish Biol*, 89(1), 192-193. doi:10.1111/jfb.12896
- Varella, H. R., Loeb, M. V., Lima, F. C. T., et Kullander, S. O. (2018). *Crenicichla ploegi*, a new species of pike-cichlid of the *C. saxatilis* group from the Rio Jurueña and upper Rio Paraguai basins in Brazil, with an updated diagnosis and biogeographical comments on the group (Teleostei: Cichlidae). *Zootaxa*, 4377(3), 361-386. doi:10.11646/zootaxa.4377.3.3
- Vela Diaz, A.E, (2011). Estudio del aislamiento a la reproducción a través de la selección sexual entre poblaciones de *Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875). (Master 2)
- Verheyen E, Salzburger W, Snoeks J, Meyer A (2003). Origin of the superclade of cichlid fishes from Lake Victoria, East Africa. *Science* 300:325–329
- Vinson MR, Hawkins CP (1998). Biodiversity of stream insects: variation at local, basin, and regional scales. *Ann Rev Entom* 43:271–293
- Vitule, J.R.S., Freire, C.A. et Simberloff, D. (2009). Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. *Fish and Fisheries*, 10, 98-108.

- Vitule, J.R.S., da Costa, A.P.L., Frehse, F.A., Bezerra, L.A.V., Occhi, T.V.T., Daga, V.S. et Padial, A.A. (2017). Comment on 'Fish biodiversity and conservation in South America by Reis et al. (2016)'. *Journal of Fish Biology*, 90, 1182-1190.
- Wagner, C. E., McCune, A. R., et Lovette, I. J. (2012). Recent speciation between sympatric Tanganyikan cichlid colour morphs. *Mol Ecol*, 21(13), 3283-3292. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05607.x
- Wallace, A. R. (1854). On the monkeys of the Amazon. *Journal of Natural History*, 14(84), 451-454.
- Waples, R. S. (1986). A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution*, 41 (2), 385-400.
- Weir, B. S., et Cockerham, C. C., (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
- Werneck Felix da Costa, G., de Bello Cioffi, M., Liehr, T., Feldberg, E., Antonio Carlos Bertollo, L., et Franco Molina, W. (2019). Extensive Chromosomal Reorganization in Apistogramma Fishes (Cichlidae, Cichlinae) Fits the Complex Evolutionary
- Wesselingh, Frank et Hoorn, Carina. (2011). Geological Development of Amazon and Orinoco Basins. 10.1525/california/9780520268685.003.0003.
- Williams, M. R., Fisher, T. R., et Melack, J. M. (1997). Solute dynamics in soil water and groundwater in a central Amazon catchment undergoing deforestation. *Biogeochemistry*(38), 303-335.
- Willis, S. C., Winemiller, K. O., Montaña, C. G., Macrander, J., Reiss, P., Farias, I. P., & Ortí, G. (2015). Population genetics of the speckled peacock bass (*Cichla temensis*), South America's most important inland sport fishery. *Conservation Genetics*, 16(6), 1345-1357. doi:10.1007/s10592-015-0744-y
- Wilson, A. B., Noack-Kunmann, K., et Meyer, A. (2000). Incipient speciation in sympatric Nicaraguan crater lake cichlid fishes: sexual selection versus ecological diversification. *Proc Biol Sci*, 267(1458), 2133-2141. doi:10.1098/rspb.2000.1260
- Winemiller, K. O., McIntyre, P. B., Castello, L., Fluet-Chouinard, E., Giarrizzo, T., Nam, S., . . . Sáenz, L. (2016). Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. *SCIENCE*, 351(6269), 128-129. doi:10.1126/science.aac7082
- Woltereck R (1931) Wie entsteht eine endemische Rasse oder Art? *Biol Zentralbl* 51:231–253
- Zhang, Y., Chiessi, C. M., Mülitz, S., Sawakuchi, A. O., Häggi, C., Zabel, M., . . . Wefer, G. (2017). Different precipitation patterns across tropical South America during Heinrich and Dansgaard-Oeschger stadials. *Quaternary Science Reviews*, 177, 1-9. doi:10.1016/j.quascirev.2017.10.012

VERTEBRATE ZOOLOGY

© Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, 2017.

67 (2): 151–171

24.10.2017

SENCKENBERG

<http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:921B9BAE-6789-496A-BCDB-F0E0437F1C26>
Apistogramma megastoma: LSID urn:lsid:zoobank.org:act:3EC6039D-8F34-45A3-9728-F21B3387FCE2

Description of a new maternal larvophilic mouth-brooding cichlid species, *Apistogramma megastoma* sp. n. (Teleostei: Perciformes: Geophaginae), from Loreto, Peru *

UWE RÖMER^{1,2,3}, CLARA ISIS RÖMER^{1,4}, GUILLAIN ESTIVALS^{1,5}, ANTONIA VELA DÍAZ^{1,5},
 FABRICE DUPONCHELLE^{1,6,7}, CARMEN ROSA GARCÍA DÁVILA^{1,5}, INGO HAHN⁸ & JEAN-
 FRANÇOIS RENNO^{1,6,7}

¹ Laboratoire Mixte International – Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne [LMI–EDIA], Iquitos, Peru – ² University of Trier, Animal Research Group, Inst. Biogeography [UTIB], Dep. Geo-Sciences, Universitätsstraße 15, 54286 Trier, Germany – ³ Osterwieher Straße 196, 33415 Verl; Germany; e-mail: eu.roemer@t-online.de [corresponding author] – ⁴ Bielefeld University, Faculty of Biology, Postfach 100131, 33501 Bielefeld – ⁵ Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana [IIAP], km 2.5, Avenida Abelardo Quiñones, Iquitos, Perú – ⁶ Universidad Nacional Federico Villareal, Facultad de Oceanografía y Ciencias Alimentarias, 350 calle Roma, Miraflores, Lima, Perú – ⁷ Institut de Recherche pour le Développement [IRD], UMR ISE-M, 361 rue Jean-François Breton BP5095, 34196 Montpellier Cedex 5, France – ⁸ Munich University of Applied Sciences, Faculty of Geo-information, Karlstraße. 6, 80333 Munich, Germany; Germany

Accepted 5.v.2017.

Published online at www.senckenberg.de/vertebrate-zoology on 15.v.2017.

Abstract

Apistogramma megastoma sp. n. is described based on a total of 18 specimens from small forest streams in the Departamento Loreto, Peru, tributaries of the Río Jutai in the border area between Peru and Brazil south and west of the city of Leticia (Colombia) (near 04°12' S / 70°06' W). *Apistogramma megastoma* sp. n., which may be confused only with *A. barlowi*, is distinguished from all other *Apistogramma* species by the combination of: noticeably disproportionately large head; exceptionally massive jaws, lyrate densely vertically banded caudal fin, extended dorsal-fin membranes in males; in aggressive females sooty head pattern and up to 8 series of small black dashes on flanks; small round caudal spot; and, exceptional for *Apistogramma*, maternal mouth-brooding behaviour. Distinguished from *A. barlowi*, by differences in colour pattern and by higher number of scale rows on cheeks. *Apistogramma megastoma* sp. n. inhabits in small fast-flowing streams.

Resumen

Apistogramma megastoma sp. n. se describe sobre la base de un total de 18 especímenes que provienen de corrientes pequeños del bosque, tributarios del Río Jutai en la zona fronteriza entre Perú y Brasil al sur y al oeste de la ciudad de Leticia (Colombia) (cerca de 04°12' Sur y 70°06' Oeste). *Apistogramma megastoma* sp. n., que sólo puede confundirse con *A. barlowi*, se distingue de todas las otras especies de *Apistogramma* por la combinación de: notablemente cabeza desproporcionadamente grande; excepcionalmente enormes mandíbulas; aleta caudal (lira) densamente con bandas verticales; en machos la aleta dorsal con las membranas alargadas; en hembras agresivas el patrón de la cabeza hollín y hasta ocho series de pequeñas manchas de color negro en los flancos; pequeña mancha caudal redonda; y, excepcional para *Apistogramma*, con el comportamiento maternal de incubación oral. Se diferencia de *A. barlowi*, independientemente de las diferencias en el patrón de color, por un mayor número de hileras de escamas en las mejillas. *Apistogramma megastoma* sp. n. vive en pequeños arroyos de corriente rápida.

Kurzfassung

Apistogramma megastoma sp. n. wird auf Basis von 18 Exemplaren beschrieben, die aus kleinen Waldbächen im Bundesstaat Loreto, Peru, Zuflüssen des Río Jutai in der Grenzregion zwischen Peru und Brasilien südlich und westlich der Stadt Leticia (Kolumbien) stammen (etwa

¹ This is publication number 7 from the *Apistogramma* Project within the Laboratoire Mixte International.

04°12' S / 70°06' W). Die nur mit *A. barlowi* verwechselbare Art unterscheidet sich von allen anderen *Apistogramma*-Arten durch die Kombination von deutlich überproportional großem Kopf und außergewöhnlich massigen Kiefern, leierförmiger dicht senkrecht gebänderter Schwanzflosse, verlängerten Membranen der Dorsale, bei drohenden Weibchen ruhiger Kopfzeichnung und bis zu acht Reihen kleiner schwarzer Flecken auf den Körperseiten, kleinem runden Schwanzwurzelfleck und innerhalb der Gattung *Apistogramma* ungewöhnlichem maternalen Maulbrutverhalten. Von *A. barlowi* neben Unterschieden in Zeichnungsmuster und Färbung durch höhere Zahl von Schuppenreihen auf den Wangen unterschieden. *Apistogramma megastoma* sp. n. lebt in kleinen schnell fließenden Waldbächen.

Key words

Biodiversity, ichthyology, new taxa, systematics, Neotropics, freshwater, ecology, reproductive behaviour.

Prefatory Remarks

In recent decades numerous new species of the genus *Apistogramma* REGAN, 1913 have been discovered in Brazil, Venezuela, and especially Peru. Some of these forms have been scientifically studied and the vast majority of them described for the first time only in recent years (BRITZKE *et al.*, 2015; KULLANDER, 1980, 1986; KULLANDER & FERREIRA, 2005; MESA & LASSO 2011a-b; READY & KULLANDER, 2008; RÖMER, 1994, 1997; RÖMER & HAHN, 2008, 2013; RÖMER *et al.*, 2003, 2004a–b, 2006b–d, 2011, 2012, 2013; SCHINDLER & STAECK, 2013; STAECK, 1991, STAECK & SCHINDLER, 2008; VARELLA & BRITZKE, 2016; VARELLA & SABAJ PÉREZ, 2014), bringing the total number of valid species to significantly over 90 and making *Apistogramma* the largest genus among the Neotropical cichlids. However, there are still several forms awaiting formal description. Amongst the described species, *Apistogramma barlowi* RÖMER & HAHN, 2008 is extraordinary for being the only member of the genus to exhibit mouth-brooding behaviour. Based on observations by RÖMER (2006a–b), RÖMER & HAHN (*op.cit.*) mentioned the possibility that the taxon might in fact consist of two species, one of them cryptic, but after discussing the cryptic species concept for *Apistogramma* in general, the authors rejected the possibility in the case of *Apistogramma barlowi*. However, new evidence from field work carried out between 2010 and 2013 within the multinational project EVOLUTION ET DOMESTICATION DE L'ICHTHYOFAUNE AMAZONIENNE (EDIA), run by the cooperative LABORATOIRE MIXTE INTERNATIONAL (LMI), has shed new light on the situation and led to a review of specimens hitherto identified as *Apistogramma barlowi*. Freshly preserved as well as live material that became available in 2011, 2012, and 2013 provided us with the opportunity for a more in-depth comparison of the different phenotypes of the taxon. On the basis of our research over the last four years, we have come to the conclusion that the original hypothesis that *Apistogramma barlowi* might consist of two distinguishable taxa is valid. Because recent research indicates that mate-choice behaviour may be responsible for speciation within rapidly radiating species clusters (ELMER *et al.*, 2010; ENGELKING *et al.* 2010; REICHARD & POLAČIK, 2010; RÖMER & BEISENHERZ, 2005; RÖMER *et al.*, 2014; SEEHAUSEN, 2000; SVENSSON *et al.*, 2009), and that different colour morphs may represent separate species (RÖMER & BEISENHERZ, 2005; READY *et al.*, 2006), and be-

cause we have diagnosed different brood-care strategies, we have decided to publish the formal description of a second mouth-brooding species of *Apistogramma*, based on our examination of preserved specimens and behavioural studies of numerous live specimens.

Methods

Except where otherwise stated, methods for counts and measurements are as detailed in RÖMER (2006), RÖMER & HAHN (2008), and RÖMER *et al.* (2003, 2004, 2006, 2011, 2012), with scale-row numbering following KULLANDER (1990). Gill rakers, pharyngeal elements, and details of dentition have not been included in this study (for reasons see RÖMER *et al.*, 2011). GPS locality data were not available. Preservation of all specimens collected followed the “low temperature preservation protocol” (LTPP), described in detail by RÖMER & HAHN (2008) and RÖMER *et al.* (2011), in the laboratory of the IIAP in Iquitos, after observing the behaviour and colour patterns of the specimens (for reasons see RÖMER *et al.*, 2011). All specimens were initially preserved in 95 % ethanol to permit the taking of DNA samples, with most individuals being transferred into 75 % ethanol later. DNA samples were taken and preserved as described in RÖMER *et al.* (2011) and stored as detailed in RÖMER *et al.* (2012). The description is based on observations on all type specimens. Although we are fully aware of the overall difficulties of species recognition (reviewed in MENDELSON & SHAW, 2012), for practical reasons we basically follow the morphological/genetic cluster concept (M/GC) for species delimitation (*cf.* SITES & MARSHALL, 2004; also DAVIS & NIXON, 1992; WIENS & SERVEDIO, 2000). Comparative statistical analysis of all data was performed using the PC program STATISTICA for Windows [Dell Inc. (2015). Dell Statistica (software-system for data analysis), version 13. software. dell.com]. The description of live coloration of the species is based on observation and photographs of the type material taken under standardised conditions in aquaria as detailed in RÖMER *et al.* (2011), supplemented by observations of additional specimens (not preserved) kept long-term in aquaria. RÖMER (2000, 2006) and RÖMER *et*

al. (2003, 2004, 2006) have explained at length the reasons for giving precise descriptions of live coloration in *Apistogramma* species¹. Voucher specimens are stored in the fish collections of the IIAP, MTD, and MUSM. For museum acronyms see LEVITON *et al.* (1985).

Comparative material. *Apistogramma allpahuayo* RÖMER *et al.*, 2012: type series; *Apistogramma barlowi*: type series, MUSM 53455, male, 59.2 mm SL; other material as listed in RÖMER (1994, 1997, 2006), RÖMER & WARZEL (1998), and RÖMER *et al.* (2003, 2004, 2006b-d, 2012, 2013, 2015).

Apistogramma megastoma sp. n.

(Figs. 1–5 & 7–19, Tables 1–4)

Apistogramma sp. “Jutai” RÖMER & RÖMER, 2015: 26–31 & title page (7 photographs of live specimens). *Apistogramma* sp. “Diamante” (trade name).

Holotype: (fig. 1) MUSM 52459, female, 61.9 mm SL, Peru, Departamento Loreto, small forest streams southwest of Leticia, probably draining to Rio Yavari, Amazonas system (approx. 04°12' S / 70°06' W); March 2012, leg. Albertino Maca Ausber.

Paratypes: 17 specimens: IIAP 302869, male, 38.2 mm SL; IIAP 302870, male, 41.7 mm SL; IIAP 302871, male, 36.1 mm SL; small forest streams draining to the Rio Jutai south of Leticia, Amazonas system, border area between Brazil and Peru, 29th August 2012, leg. Albertino Maca Ausber. MTD F 32642, male, 50.5 mm SL; MTD F 32700, female, 39.7 mm SL; MTD F 32701, female, 48.1 mm SL; MTD F 32702, male, 56.1 mm SL; MTD F 32704, male, 57.0 mm SL; MUSM 52449, male, 55.9 mm SL; MUSM 52450 (allotype), male, 76.3 mm SL (fig. 2); MUSM 52451, female, 58.2 mm SL (fig. 3); MUSM 52452, 1 male, 48.6 mm SL; MUSM 52453, female, 48.3 mm SL; MUSM 52454, female, 36.7 mm SL; MUSM 52456, 1 female, 44.3 mm SL; MUSM 52457, male, 59.7 mm SL; MUSM 52458, male, 55.4 mm SL; collection data as given for holotype.

Supplementary material (non types): 15 male and 15 female wild-caught specimens, as well as about 150 individuals of their F₁ and F₂ offspring, kept in the aquarium for behavioural observation. These will eventually be preserved and deposited mainly in either the MUSM or the MTD F collections, with some possibly retained in the personal collection of UR.

Diagnosis. *Apistogramma megastoma* sp. n. is a large (males up to 76 mm, females to 62 mm SL), high-backed, laterally compressed, and little elongated maternal mouth-brooding species of the *Apistogramma caca-tuoides* complex, exhibiting pronounced sexual dimorphism and dichromatism, similar only to *Apistogramma barlowi*.

The species is readily differentiated and distinguished from all *Apistogramma* species known to date except *Apistogramma barlowi* on the basis of the combination of the following characters: Adult males with disproportionately large head, enormously enlarged mouth with wide massive jaws and hypertrophied lips; tooth rows and adjacent epidermal tissue yellow in males, in brood-caring females conspicuously deep red (vs. yellow in *A. barlowi*); in both sexes 3 to 4 infraorbital (vs. 3 in *A. barlowi*) and up to 8 preopercular pores. Caudal fin lyrate in adult specimens of both sexes, truncate and immaculate in juveniles and sub-adult individuals; caudal extensions in most males orange posterior to distal edge of caudal centre; males with 10 to 12 continuous vertical rows of light spots on translucent bluish caudal fin. Mature males with extended and pointed dorsal lappets for entire length of fin; old males with lappets of spines 2 to 6 (or 7) more than twice length of spines. Longitudinal band about 1.5 scales wide extending to base of caudal fin; caudal-peduncle spot (visible only in subordinated live specimens) small, rounded. In males longitudinal band fades during threat and display, while several red spots and/or lines appear on cheek, lower part of gill cover, and anterior third of body (absent in *A. barlowi*). Breeding females without any extended black band-like markings immediately behind pectoral-fin base (present in *A. barlowi*); instead some individuals with few blackish scales on base of pectoral; 5 to 7 rows of drop-shape spots or dashes on flanks, dashes positioned on lower and upper edge of scales on body. Females and juvenile or subordinated males with upright oval mid-lateral spot extending slightly above upper margin of longitudinal band. Check stripe extending from eye to lower posterior margin of operculum in both sexes, hardly ever visible in (live) males, about pupil width below eye on infraorbital, in most females widened to more or less cover whole cheek and lower part of operculum.

The species differs from *Apistogramma barlowi* by: higher number of rows of cheek scales (4 to 5 vs. 3 to 3.5); higher number of infraorbital (4 vs. 3) and preopercular pores (6–8 vs. 5–6); different caudal-fin colour pattern (uniformly barred in *A. megastoma* sp. n.); no black breast band in females (vs. present in *A. barlowi*); cheek stripe significantly narrower; rows of spots/dashes on flanks (vs. absent in *A. barlowi*); entire mouth region of females sooty from lips to interorbital and cheek stripe during direct intrasexual aggressive threat (vs. only lips sooty in *A. barlowi*).

Description

Morphological characters: (n=16; 36.1 to 76.3 mm SL). For biometric data see tables 1–2 & 4, for meristic data see table 3.

Habitus (figs. 1–5, 7–19): As given for *Apistogramma barlowi*, with few biometric differences detectable during comparison. The following differences were re-

¹ In a recent publication, STAECK (2015) critically reviewed the historical development of requirements for diagnostic differentiation in species descriptions. He also highlighted aspects and limitations of species diagnosis using descriptions of live coloration in some genera of cichlids (*Heros*, *Hemichromis*), but also explicitly confirmed the usefulness of information on colour and colour pattern for others including *Apistogramma*.



Fig. 1. *Apistogramma megastoma* sp. n., MUSM 52459, holotype, female, 61.9 mm SL; 6 months after preservation. December 2012. All photographs U. Römer except where otherwise stated.

corded between this sexually dimorphic species and other members of the genus: Body noticeably deep overall (34.7–43.8 % SL, mean 38.8 % SL), laterally compressed, about twice deeper than wide, head long (35.0–39.5 % SL, mean 37.0 % SL), appearance altogether strikingly robust. Meristic and morphometric differences between sexes not significant except maximum size (table 1). Adult males about fifth larger than females, with proportionally slightly smaller eye, greater preorbital depth, larger upper and lower jaws, wider interorbital bone, shorter anal-fin spines, longer snout, deeper cheek, and longer pelvic fin. Upper head profile regular apart from indentation above eye, convex from tip of mouth to interorbital and from interorbital to beginning of dorsal base, creating “humped” impression, clearly visible in specimens of about 30 mm SL upwards, but more pronounced in larger males; lower head profile slightly convex, in large males roughly straight from lip to posterior margin of lower jaw, then curving slightly upwards and continuing straight to lower posterior edge of unserrated operculum. Mouth terminal, noticeably large and wide (broadest within genus in relation to head width) (figs. 1–5, 17 & 19), jaws stout, lower jaw long (about 11.1–19.3 % SL, mean 15.5 % SL); allometry of snout and upper jaw positive, of lower jaw roughly linear, in relation to body size; lips extremely thick and hypertrophied, folded; maxillary extending approximately to vertical through anterior margin of pupil; eye relatively small (diameter 8.5–12.9 % SL, mean 10.8 % SL), negatively allometric in correlation with increasing SL; depth of cheek positively allometric with increasing SL; cheek fully scaled, 4 to 5 horizontal rows of cycloid scales (vs. 3 to 3 ½ in *A. barlowi*); scales on gill cover cycloid, for scale pattern see fig. 3; 5 dentary and unusual variable within the genus 3 to 4 infraorbital pores [2 specimens (MUSM 52454, MUSM 52456) with divi-

ating number of pores (3 vs. 4) on both sides of head], unusually high number (6 to 8) of preopercular pores for genus. Ventral fin [V. 1.5 (n=16)] slightly prolonged in males, extending to start of anal-fin base or up to third spine; in females short, only exceptionally extending to anus. Pectoral fin [P. 12 (n=12)] rounded, without modifications. Dorsal fin [D. XV.6.i (n=2), XV.6.ii (n=1), XV.7 (n=8), XV.7.i (n=1), XV.8 (n=2), XVII.6 (n=1), XVI.7 (n=1)] with significantly pointed soft portion extending back to central posterior margin of caudal fin in adult males, even in females slightly pointed, but not extended; length of spines increasing from D1 to D5, thereafter remaining roughly constant to slightly decreasing; fifth and last spine normally about equal in length, occasionally last dorsal spine longest; in MUSM 52454 spine 16 doubled; pointed dorsal membranes significantly prolonged past tips of spines; in most adult males extensions of membranes D2 to D7 about double length of associated spines, remainder about 1.5 times longer than spines; lappets 2 to 5 longest, regularly extending back to vertical through anterior edge of anal-fin base. Anal fin [A. III.6 (n=12), III.7 (n=4)] pointed with soft portion extending to distal edge of first half of caudal fin in adult males, rounded to slightly pointed (but not extended) in females and small males and extending to base of caudal fin when folded. Caudal fin with 15 (n=1) or usually 16 (n=15) principal soft rays; in males and females of about 40 mm SL or larger slightly asymmetrically lyrate, more developed in males, in smaller females rounded or truncate; upper lobe longer than lower; caudal rays D4 to D5 and V4 to V5 significantly prolonged relative to remaining rays, D5 and V5 usually longest; intervening rays about same length, forming straight or (less frequently) slightly convex central edge, outer rays decreasing rapidly in length; caudal fin in both sexes scaled on first third to half. In adults

Table 1. Biometric data for *Apistogramma megastoma* sp. n., taken from the type specimens and expressed as % SL; SL given in mm.

	Apistogramma megastoma sp. n. (all)								males					females					abbreviations	
	HT	AT	(n)	mean	min.	max.	st. dev.		(n)	mean	min.	max.	st. dev.		(n)	mean	min.	max.	st. dev.	
SL	61.9	76.3	15	49.0	36.1	76.3	10.66	9	51.1	36.1	76.3	12.26	6	45.9	36.7	61.9	7.59	HT = Holotype / PT = Paratype		standard length
TL	127.5	128.1	15	132.1	127.5	135.4	2.19	9	132.4	128.1	135.4	2.17	6	131.1	127.5	132.7	1.93			total length
TLS	133.0	135.7	15	138.3	127.8	158.5	8.19	9	142.2	132.9	158.5	8.28	6	132.6	127.8	137.5	3.48			total length plus streamer
HL	34.7	37.6	15	37.0	35.0	39.5	1.26	9	36.9	35.0	39.5	1.45	6	37.2	34.7	38.4	1.02			head length
HD	26.4	30.9	15	30.3	26.4	31.9	1.17	9	30.7	28.3	31.9	1.06	6	29.9	26.4	31.4	1.25			head depth
BD	36.5	37.6	15	38.8	34.7	43.8	2.32	9	39.4	36.4	43.8	2.30	6	37.9	34.7	41.3	2.23			body depth
HW	18.8	16.6	15	18.5	16.6	20.0	0.79	9	18.4	16.6	20.0	0.94	6	18.7	18.1	19.4	0.52			head width
PDL	37.6	34.0	15	38.1	34.0	41.4	1.95	9	38.1	34.0	40.9	2.21	6	38.1	36.6	41.4	1.70			pre-dorsal length
TDL	89.8	87.6	15	90.8	87.6	92.7	1.39	9	91.0	87.6	92.7	1.70	6	90.5	89.0	91.0	0.76			trans-dorsal length
PVL	44.0	40.9	15	40.8	39.3	42.7	0.92	9	40.9	39.3	42.0	0.86	6	40.7	39.8	42.7	1.08			pre-pelvic length
PAL	77.0	73.5	15	76.6	73.5	79.2	1.99	9	76.5	73.5	79.2	2.32	6	76.8	74.1	78.4	1.55			pre-anal length
TAL	88.4	87.1	15	88.9	86.2	100.2	3.26	9	89.5	86.2	100.2	4.13	6	88.0	86.6	89.4	0.94			trans-anal length
Eye	9.2	10.0	15	10.8	8.5	12.9	1.15	9	10.4	8.5	11.6	1.03	6	11.4	9.8	12.9	1.09			eye diameter
SNL	12.2	12.3	15	10.2	8.8	12.4	1.24	9	10.4	8.8	12.4	1.39	6	9.8	8.9	12.2	0.95			snout length
CHD	11.4	13.5	15	11.8	10.0	13.5	1.16	9	12.3	11.0	13.5	1.00	6	11.1	10.0	12.4	1.06			cheek depth
POD	5.7	4.6	15	4.9	3.1	6.2	0.91	9	5.1	3.5	6.2	0.93	6	4.6	3.1	5.7	0.88			pre-orbital depth
LOW	8.8	9.8	15	9.3	8.3	10.0	0.47	9	9.5	9.3	10.0	0.24	6	9.1	8.3	9.9	0.63			inter-orbital width
UUL	14.9	17.0	15	13.6	9.8	17.0	2.12	9	14.2	11.3	17.0	1.14	6	12.6	9.8	14.9	1.87			upper-jaw length
LJL	17.9	16.1	15	15.5	11.1	19.3	2.22	9	15.5	13.3	19.3	2.25	6	15.3	11.1	18.0	2.38			lower-jaw length
CPD	16.6	15.9	15	16.9	14.8	18.7	1.04	9	17.3	15.9	18.7	0.85	6	16.3	14.8	17.4	1.04			caudal-peduncle depth
CPL	11.9	12.4	15	13.0	10.3	16.3	1.71	9	13.8	11.9	16.3	1.73	6	11.9	10.3	12.6	0.84			caudal-peduncle length
DFB	54.1	59.4	15	53.9	54.1	62.6	1.77	9	60.3	58.8	62.6	1.32	6	59.3	54.1	62.0	2.30			dorsal-fin base length
AFB	19.9	20.5	15	19.4	17.9	21.3	1.06	9	19.6	17.9	20.6	0.98	6	19.1	18.1	21.3	1.16			anal-fin base length
PecL	24.8	30.6	15	27.6	22.0	31.3	2.56	9	27.7	24.0	30.6	2.12	6	27.5	22.0	31.1	3.33			pectoral-fin length
PelL	29.2	29.9	15	31.7	25.4	43.7	5.50	9	34.8	27.5	43.7	5.12	6	27.2	25.4	29.2	1.06			pelvic-fin length
PesL	9.9	10.3	15	12.9	9.9	18.5	2.02	9	12.5	10.3	14.0	1.26	6	13.4	9.9	18.5	2.87			pelvic-fin spine length
LDS	17.1	16.1	15	14.9	12.0	19.1	1.91	9	15.7	12.9	19.1	1.91	6	13.8	12.0	17.1	1.27			last dorsal spine length
LAS	13.9	12.6	15	14.2	12.6	16.9	1.21	9	14.5	12.6	16.9	1.40	6	13.8	12.7	15.0	0.83			last anal spine length



Fig. 2. *Apistogramma megastoma* sp. n., MUSM 52450, paratype, male, 76.3 mm SL; *top*: 2 days after preservation, *bottom*: 6 months after preservation. December 2013.

caudal peduncle 21.6 to 51.6 % (mean 31.3 %) deeper than long, correlation of allometry strongly negative with increasing size (SL). Scales in median E1 row 21 to 23 [21 (n=9), 22 (n=6), 23 (n=1)]; 16 circumpeduncular scales (n=16). Lateral-line scales in series E4, E2, and E1, exceptionally some in E3, counts ranging from 13 to 16/ 0 to 3 / 4 to 8, with frequencies as follows: 13/1/7 (1), 13/2/6 (1), 13/2/8 (1), 14/0/6 (1), 14/0/7 (1), 15/1/5 (1), 15/1/8 (1), 15/2/4 (1), 15/2/6 (1), 15/2/7 (1), 15/3/8 (1), 16/1/6 (1) (3 IIAP- and 3 MUSM-specimens not included). Vertebrae 11 + 11 = 24 (7), 11 + 12 = 23 (3), 12 + 12 = 24 (1), 12 + 13 = 25 (1)² (fig. 5). Jaw teeth unicuspid, erect, cusp strongly recurved; teeth of outer row significantly larger than inner row in males, in females only slightly larger or similar in size.

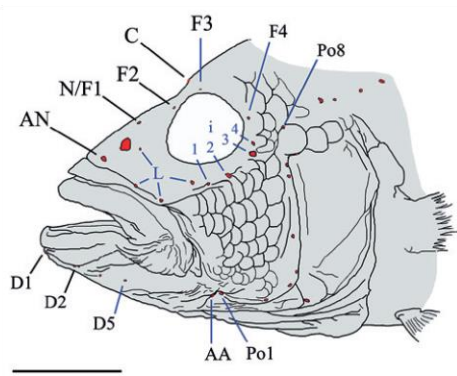
Other details of dentition, gill rakers, and pharyngeal elements have been excluded from this study, as forming part of further studies still in progress.

Coloration of preserved specimens: (described after preservation for six months and three to five years in 75% ethanol; only slight differences in intensity of coloration

² In the sister species *A. barlowi* lateral line scale frequencies (taken from the type material and one authorized specimen) are as follows: 11/0/5 (1), 12/0/5 (1), 12/1/6 (1), 13/0/5 (1), 13/0/6 (1), 13/0/7 (2), 13/1/3 (1), 13/1/5 (1), 13/1/6 (1), 13/1/7 (1), 13/2/6 (1), 13/3/6 (1), 14/0/3 (2), 14/0/6 (1), 14/0/7 (4), 14/0/8 (1), 14/1/7 (1), 14/1/8 (1), 15/0/4 (1), 15/0/6 (2), 15/0/7 (3), 16/0/8 (1), 17/0/6.



Fig. 3. *Apistogramma megastoma* sp. n., MUSM 52451, paratype, female, 58.2 mm SL; *top*: 2 days after preservation, *bottom*: 6 months after preservation. December 2013.



visible after different times of conservation, although fresh material from 2013 slightly darker overall) (figs. 1–3)

Basic colour of body predominantly fairly uniform light brownish, in all specimens darker on dorsum, in small specimens more greyish. Scales on body darker on base and centre, with light, comparatively broad margin

← **Fig. 4.** *Apistogramma megastoma* sp. n., MUSM 52450, 76.3 mm SL; pattern of sensory *lateralis* pores on head. AA: anguloarticular pore; AN: anterior nasal pore; C: *coronalis* pore; D1–D5: dentary pores; F2–F4: frontal pores; i1–i4: post-lachrymal infraorbital pores; L: lachrymal pores; N/F1: pore shared by the nasal and first frontal *lateralis* canal; Po1–Po8: preopercular pores.

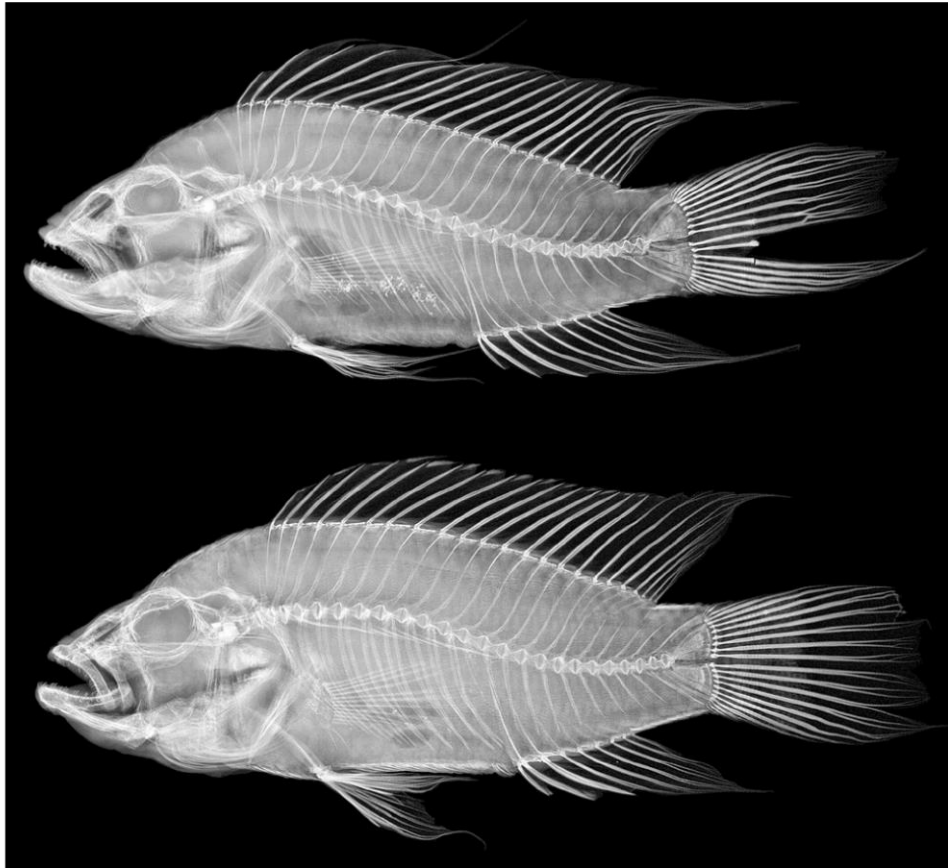


Fig. 5. *Apistogramma megastoma* sp. n., MUSM 52450, male, 76.3 mm SL (*top*); MUSM 52451, female, 58.2 mm SL (*bottom*). Digital x-rays: Mario Richter.

on exposed edge; margin about fifth to third width of visible part of scale along median horizontal line, broadest in mid-lateral scale rows, narrowest on anterior part of dorsum; in some specimens preserved for longer time light margin counter-shaded by dark brown submarginal line. Basic colour of lips, unscaled lower parts of cheeks, preoperculum, infraorbital, lower jaw, pectoral-fin base, and breast bluish white with numerous small grey, brown, or black chromatophores; significantly darker in largest specimens, giving dusky to dirty grey impression; anterior parts of lips generally darker than posterior. In some specimens distinct blackish interorbital stripe with widened oval to squarish centre and widened edges close to orbitals. Preorbital, scaled parts of cheeks, and operculum light greyish to brownish; operculum with more greyish area directly above black cheek stripe. Check (lachrymal) stripe in both sexes about pupil width at origin between foramina 1 and 2 of posterior orbital of suborbital series (for terminology see KULLANDER, 1987),

remaining similar width for entire extent in all males, in several females becoming much wider (frequently up to orbit diameter) running backwards across posterior lower half of cheek, covering most to all of area to lower posterior margin of operculum. Blackish or dark grey snout stripe from orbit to upper lip, about half width of cheek stripe at orbit, significantly wider (1.5 times) at anterior end close to upper-lip fold, visible in few specimens only. Chin and central parts of branchiostegal membrane grey in normal mood, blackish in aggression. No distinct supraorbital stripe, but completely black or dark grey (fresh material) or chestnut brownish (preserved), area from interorbital to dorsum below first dorsal spine, in all cases significantly darker than rest of upper body. Iris dark, blackish or bluish grey in dorsal half, remainder light greyish brown or beige; in some (fresh) specimens pupil with golden, in remainder light brown margin. Abdominal stripes and small anal spot present in most female specimens studied. Lateral band, if present, black-

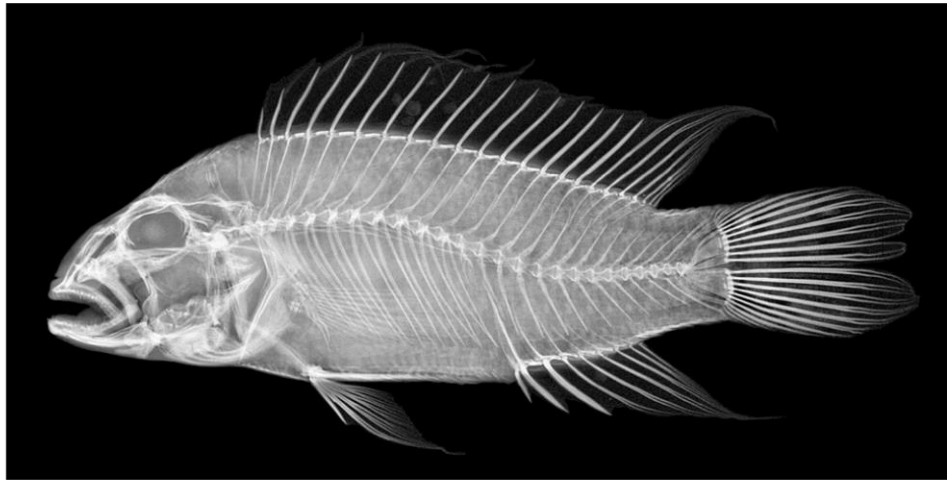


Fig. 6. For comparison: *Apistogramma barlowi*, MUSM 52455, male, 59.2 mm SL. Digital x-ray: L. Fels, N. Leiwes & C. Mühle.

ish or dark brown with centres of scales on caudalmost half slightly lighter than edges, straight, extending from posterior edge of orbital to just above centre of caudal-fin base, about one scale high in anterior third, covering complete height of row E1 scales, overlapping lower quarter of row E2 scales and upper third of row 0 scales, widening to about 1.5 times scale height posterior to anal opening and covering full height of row E1 and upper half of row 0 scales; absent in most larger males. Seven vertical bars on body visible only in few individuals; bars 3 to 7 equally wide below and above lateral band; bar 2 narrower below lateral band, merging above it with bar 1 to form conspicuous subdorsal patch; all bars more conspicuous on dorsal part of body; intervals about third width of bars; upper part of bars 2 and 3 merging roughly at lateral band producing Y- or V-shaped pattern below dorsal-fin base. All female specimens without vertical band on lower half of body at position of vertical bar 2 (vs. present in *Apistogramma barlowi*), few with small black area between and around bases of ventral fins. Few specimens with faint upright oval lateral spot at position of vertical bar 3, exceptionally area below lateral band at position of vertical bar 3 slightly darker than rest of ventral body between pectoral- and anal-fin bases; both markings always missing in large males. Dorsal spots visible in some specimens at positions of vertical bars 1 to 5, small, restricted to scale rows (E4 to E5) next to dorsal-fin base. No caudal-peduncle spot visible in any type specimens (but see coloration of live specimens), but in some entire caudal peduncle slightly darker greyish compared to rest of body³. Under microscope caudal fin in males with 9 to 12 vertical-band-like rows of

small hyaline rectangular light grey melanophores on membranes between rays; pattern absent in females, but anterior third to half of fin (vs. quarter to third in *A. barlowi*) yellowish to orange (fresh material only) or milky white, (unlike in *A. barlowi*) extending at least two thirds length of rays (to about where principal rays branch) or frequently to end of rays, colour sharply separated from rest of transparent hyaline fin (vs. washed-out transition zone in *A. barlowi*). Base colour of all other fins likewise cloudy milky to pale grey or, in some larger males, light brownish. Pectoral transparent, slightly milky whitish, with few finely greyish chromatophores on fin rays. Ventral fin in males without clear dark markings, but dusker along spine with whitish (in fresh material) to orange tip; in females anterior part along spine and adjacent soft rays densely speckled with dark black chromatophores, leaving only narrow strip of fin, usually less than 20% fin width, yellow or whitish posteriorly. Anal fin light milky grey, in larger males with faint greyish to blackish edging and 4 to 6 light vertical bars on soft portion (missing in smaller males), in females outer two thirds translucent hyaline. Coloration of dorsal fin uniform greyish, without marginal or other bands, or other distinct markings except first membrane in males significantly darker blackish and soft portion with up to 8 light hyaline vertical bars; in females first 2 to 3 membranes blackish. Basal part of teeth milky or glassy translucent, distal third reddish brown with dark brown tip.

Coloration of live specimens and sexual dimorphism: (figs. 7–19) Information and illustrations restricted to diagnostic elements, for supplementary photographs of live specimens see RÖMER & RÖMER (2015).

Overall coloration strongly resembles that of *Apistogramma barlowi*, but with some diagnostic differences: *Apistogramma megastoma* sp. n. is highly sexually di-

³ But caudal spot regularly visible in several significantly smaller F₁ specimens.

Table 2. Biometric data for *Apistogramma megastoma* sp. n., taken from the type specimens and expressed in mm.

Coll. No.	Status	Sex	SL	TL	TLS	HL	HD	BD	HW	PDL	TDL	PPL	PAL	TAL	Eye	SNL	CHD	POD	IOW	UJL	LJL	CPD	CPL	DFB	AFB	PeCL	PeIL	PeSL	LDS	LAS
MUSM 52450	PT	m	76.3	97.6	103.5	28.7	23.6	28.7	12.7	25.9	66.8	31.2	51.0	66.4	7.6	9.4	10.3	3.5	7.5	13.0	12.3	12.1	9.5	45.3	15.7	23.4	22.8	7.8	12.3	9.6
MUSM 52459	HT	f	61.9	78.9	82.3	21.5	16.3	22.6	11.6	23.3	55.6	27.3	43.3	54.7	5.7	7.5	7.1	3.5	5.4	9.2	11.1	10.3	7.4	36.6	12.3	15.3	18.1	5.2	10.6	8.7
MUSM 52451	PT	f	58.2	77.0	78.0	21.4	17.9	22.3	10.9	21.3	52.6	24.9	41.5	52.1	6.2	6.7	7.2	3.2	5.7	8.6	9.4	7.2	34.6	10.7	18.2	16.0	6.1	8.6	7.4	
MTD F 32704	PT	m	57.0	76.6	79.1	20.5	17.7	21.7	10.8	21.5	51.6	22.8	38.8	49.7	4.8	7.2	3.5	5.3	9.3	11.0	10.1	7.2	35.1	11.5	15.1	18.7	7.7	7.4	9.6	
MTD F 32702	PT	m	56.1	73.6	81.9	19.7	17.3	23.1	10.5	21.5	51.0	22.7	37.9	48.3	5.3	5.4	7.4	3.0	5.2	7.2	9.9	9.7	7.2	33.2	10.8	16.0	24.5	6.4	9.0	8.1
MUSM 52449	PT	m	55.9	74.8	82.5	20.7	17.8	24.5	11.2	21.8	51.6	23.5	39.6	49.8	6.3	6.9	6.9	2.3	5.4	7.1	7.8	10.5	8.0	35.0	11.5	15.0	21.1	7.0	9.6	7.56
MTD F 32642	PT	m	50.5	67.0	80.0	17.7	14.3	18.4	9.3	18.0	45.0	20.6	35.3	44.6	5.9	5.0	5.6	1.8	4.7	7.1	7.0	8.4	6.3	29.7	10.2	12.1	16.5	6.6	6.6	7.2
MUSM 52452	PT	m	48.6	65.3	71.7	19.2	15.0	18.7	8.9	19.7	45.1	20.1	32.7	42.7	5.1	5.7	6.5	3.0	4.6	8.2	8.7	8.4	5.8	29.9	10.0	14.8	19.7	5.9	9.23	7.5
MUSM 52453	PT	f	48.3	61.8	61.8	18.5	14.5	18.7	8.7	18.1	43.8	19.3	33.8	42.4	5.6	4.5	5.2	2.2	4.3	5.6	8.7	8.3	5.9	29.7	8.9	13.9	12.9	8.9	7.4	6.9
MTD F 32701	PT	f	48.1	63.2	63.9	17.1	14.5	18.2	9.0	18.3	43.8	19.1	34.0	42.5	4.7	4.9	6.0	2.3	4.8	7.0	7.3	8.1	5.8	28.7	9.1	13.5	13.4	7.2	6.78	6.34
MUSM 52456	PT	f	44.3	58.8	59.8	16.5	13.9	18.3	8.1	16.4	40.3	18.2	29.8	38.4	5.1	4.4	4.8	2.4	4.0	5.8	7.5	7.7	5.1	27.5	9.4	13.1	11.3	5.4	6.2	6.3
IIAP 302870	PT	m	41.7	55.2	57.2	15.3	12.4	16.0	7.6	15.8	38.3	17.3	29.8	36.9	4.1	3.8	4.8	2.3	4.0	6.0	5.6	7.3	6.4	24.8	8.0	12.0	11.5	4.8	6.2	5.2
MTD F 32700	PT	f	39.7	52.6	52.6	14.6	11.1	13.8	7.7	15.1	35.4	16.0	28.0	35.0	5.1	3.5	4.0	1.7	3.4	4.8	4.4	5.9	4.1	22.7	7.2	8.8	10.8	4.9	4.78	5.4
IIAP 302869	PT	m	38.2	50.8	50.8	14.6	11.8	15.8	6.8	15.6	35.3	15.0	27.5	34.0	4.1	4.0	4.4	2.1	3.8	4.6	5.2	6.5	6.1	22.9	7.1	10.2	12.8	5.4	6.2	5.7
MUSM 52454	PT	f	36.7	47.6	47.6	14.1	10.6	13.4	7.1	15.2	33.3	14.8	25.3	32.2	4.4	3.3	3.7	1.2	3.1	3.6	5.7	5.6	4.6	20.6	7.1	9.3	10.4	4.5	4.6	5.5
IIAP 302871	PT	m	36.1	48.9	48.9	13.4	11.4	14.3	6.8	14.1	33.0	15.11	26.0	32.0	4.1	3.4	4.0	1.6	3.4	4.1	5.1	6.5	5.9	21.7	6.5	9.6	12.4	5.0	5.8	5.5

morphic and dichromatic. Mature males (figs. 7–11) are about one and a half to two times larger than females (figs. 12–17) and initially have a truncate, later a clearly lyrate caudal fin (figs. 7–10), while in juvenile males and females the latter is rounded truncate (fig. 13), in older female individuals with asymmetric extensions (absent in *A. barlowi*), that on the upper lobe significantly longer than that on the lower lobe of the fin (fig. 14). In males the hyaline caudal fin typically exhibits a fine barring pattern of ten bluish vertical lines (absent in *A. barlowi*) extending on to the central part of the fin and varying from about 80 % to the full height of it, depending on the individual (figs. 7–10). The translucent yellowish caudal fin of females (figs. 12–16) never exhibits such a pattern.

The dorsal fin in males is serrate, with noticeably extended membranes for the entire length of the fin and the soft-rayed portion prolonged to a point (fig. 7). In some adult males the tips of the fin membranes may exhibit an orange colour, likewise the tip of the soft portion of the dorsal fin (fig. 8). The first five, occasionally six, dorsal-fin membranes in females are pointed but not serrate (*vs.* truncated in *A. barlowi*), with no extended membranes (figs. 14–16). The membranes of the first to second and the lower half of the second or third spine to the soft portion of the fin, are usually sooty. The remaining membranes from the first to the sixth are hyaline pinkish to violet (*vs.* uncoloured in *A. barlowi*); there is a yellowish margin and bluish sub-marginal band along the spinous part of the fin, while the remainder is yellowish with small light bluish spots along the spines. The ventral fins in males are transparent blue at their base to yellowish distally, with orange tips; by contrast those of the female are nearly entirely black with a narrow posterior yellow margin. Adult males have a pattern of light blue and red stripes and spots on the head and gill covers (fig. 7), in some individuals with an irregular red dotted pattern extending on to the anterior third of the body (always absent in *A. barlowi*). Sexually mature females usually have a yellowish coloured body, and typically exhibit a broad black cheek band, black ventral fins and anterior dorsal spines, and exceptionally lateral band (subordinated individuals), but no other black markings (figs. 12–15); by contrast dominant mature males suppress most of these black markings (fig. 7), but may express the broad lateral band and a narrow interorbital stripe and cheek band (figs. 8–9). On becoming territorial, females engage in intense intrasexual fights during which the anterior part of the head develops blackish coloration from the tip of the snout to a vertical behind the orbit. The extent of this blackish head coloration varies individually and could be observed repeatedly only during this early stage of breeding behaviour. Females at any stage of brood care may exhibit seven light brownish to greyish vertical bars (fig. 15), more prominent in subordinated individuals and when potential predators are present; these bars are visible only exceptionally in males when subordinated by dominant non-brooding females (fig. 8). During the

Table 3. Morphometric counts for *Apistogramma megastoma* sp. n., taken from the type specimens; SL given in mm.

Coll.No.	Status	DNA-No.	Sex	SL	DF [h]	DF [s]	DF [n]	AF [h]	AF [s]	PF [h]	PF [s]	PecF	CF	LRS	abbreviations
MUSM 52450	PT	UR.101.2318	m	76.3	15	7	0	3	7	1	5	12	16	22	
MUSM 52459	HT	UR.101.2406	f	61.9	15	7	1	3	7	1	5	12	16	22	HT = Holotype
MUSM 52451	PT	UR.101.2319	f	58.2	15	8	0	3	6	1	5	12	16	21	
MTD F 32704	PT	UR.101.2286	m	57.0	15	7	2	3	6	1	5	12	16	21	PT = Paratype
MTD F 32702	PT	UR.101.2085	m	56.1	15	7	0	3	7	1	5	12	16	21	
MUSM 52449	PT	UR.101.2038	m	55.9	15	7	0	3	6	1	5	12	16	21	AT = Allotype
MTD F 32642	PT	UR.101.2296	m	50.5	15	7	0	3	7	1	5	12	15	22	
MUSM 52452	PT	UR.101.2290	m	48.6	15	7	0	3	7	1	5	12	16	21	AF = anal fin
MUSM 52453	PT	UR.101.2292	f	48.3	16	7	0	3	6	1	5	12	16	23	
MUSM 52456	PT	UR.101.2291	f	44.3	15	8	0	3	6	1	5	12	16	22	CF = caudal fin
MTD F 32701	PT	UR.101.2084	f	48.1	15	6	1	3	6	1	5	12	16	21	
IIAP 302870	PT	IIAP 302870	m	41.7	15	7	0	3	6	1	5	12	16	21	DF = dorsal fin
MTD F 32700	PT	MTD F 32700	f	39.7	15	6	1	3	6	1	5	12	16	22	
IIAP 302869	PT	IIAP 302869	m	38.1	15	7	0	3	6	1	5	12	16	21	PecF = pectoral fin
MUSM 52454	PT	UR.101.2289	f	36.7	17	6	0	3	6	1	5	12	16	22	
IIAP 302871	PT	IIAP 302871	m	36.1	15	7	0	3	6	1	5	12	16	21	PF = pelvic fin

Table 4. Biometric data for *Apistogramma megastoma* sp. n. and *A. barlowi* for comparison; taken from the type specimens and expressed as % SL; SL given in mm.

	<i>Apistogramma megastoma</i> sp. n.						<i>Apistogramma barlowi</i>						abbreviations
	HT	(n)	mean	min.	max.	st.dev.	HT	(n)	mean	min.	max.	st.dev.	HT = Holotype
SL	61.9	15	49.0	36.1	76.3	10.66	60.0	32	43.0	28.8	63.7	9.15	standard length
TL	127.5	15	132.1	127.5	135.4	2.19	129.4	32	131.6	118.7	147.0	4.70	total length
TLS	133.0	15	138.3	127.8	158.5	8.19	137.6	32	133.9	121.7	147.0	5.26	total length plus streamer
HL	34.7	15	37.0	35.0	39.5	1.26	34.4	32	36.8	32.8	42.7	2.03	head length
HD	26.4	15	30.3	26.4	31.9	1.17	28.3	32	29.5	26.7	35.5	1.74	head depth
BD	36.5	15	38.8	34.7	43.8	2.32	36.8	32	36.2	32.0	41.7	2.25	body depth
HW	18.8	15	18.5	16.6	20.0	0.79	19.5	32	19.6	17.5	23.7	1.44	head width
PD	37.6	15	38.1	34.0	41.4	1.95	37.8	32	39.3	36.5	43.1	1.67	pre-dorsal length
TDL	89.8	15	90.8	87.6	92.7	1.39	88.9	32	89.4	87.0	92.5	1.43	trans-dorsal length
PVL	44.0	15	40.8	39.3	42.7	0.92	41.1	32	41.6	38.5	47.3	1.72	pre-pelvic length
PAL	77.0	15	76.6	73.5	79.2	1.99	75.7	32	77.1	72.6	82.6	2.45	pre-anal length
TAL	88.4	15	88.9	86.2	100.2	3.26	86.7	32	87.6	82.1	96.4	2.76	trans-anal length
Eye	9.2	15	10.8	8.5	12.9	1.15	9.0	32	10.5	8.8	12.9	0.93	eye diameter
SNL	12.2	15	10.2	8.8	12.4	1.24	12.5	32	11.3	8.7	14.1	1.34	snout length
CHD	11.4	15	11.8	10.0	13.5	1.16	11.0	32	10.6	8.7	12.6	0.97	cheek depth
POD	5.7	15	4.9	3.1	6.2	0.91	6.4	32	5.2	4.0	6.4	0.75	pre-orbital depth
IOW	8.8	15	9.3	8.3	10.0	0.47	10.9	32	9.3	7.7	12.0	1.00	inter-orbital width
UJL	14.9	15	13.6	9.8	17.0	2.12	15.3	32	13.9	8.8	17.7	1.75	upper-jaw length
LJL	17.9	15	15.5	11.1	19.3	2.22	17.3	32	16.8	12.5	19.8	1.59	lower-jaw length
CPD	16.6	15	16.9	14.8	18.7	1.04	16.0	32	16.1	11.6	18.1	1.17	caudal-peduncle depth
CPL	11.9	15	13.0	10.3	16.3	1.71	14.5	32	13.5	10.6	18.4	1.65	caudal-peduncle length
DFB	54.1	15	59.9	54.1	62.6	1.77	58.6	32	57.3	54.0	69.9	2.93	dorsal-fin base length
AFB	19.9	15	19.4	17.9	21.3	1.06	19.2	32	18.9	14.9	22.1	1.43	anal-fin base length
PecL	24.8	15	27.6	22.0	31.3	2.56	25.5	32	27.4	21.3	30.7	2.57	pectoral-fin length
PelL	29.2	15	31.7	25.4	43.7	5.50	28.1	32	27.1	21.4	39.3	3.68	pelvic-fin length
PelSL	9.9	15	12.9	9.9	18.5	2.02	9.3	32	11.7	9.3	13.4	1.03	pelvic fin spine length
LDS	17.1	15	14.9	12.0	19.1	1.91	15.4	32	13.6	9.5	18.0	1.96	last dorsal spine length
LAS	13.9	15	14.2	12.6	16.9	1.21	13.6	32	13.9	11.6	16.1	0.97	last anal spine length

early stages of brood care (i. e. the larval stage) some females exhibit greyish brown dorsal spots (fig. 14), in some cases merging with a mid-lateral spot on vertical bar 3, creating a band-like pattern on the body above the lateral band, slightly resembling a similar pattern known from *Apistogramma hippolytae* KULLANDER, 1982 (figs. 12 & 16).

Females caring for free-swimming fry may exceptionally exhibit a few blackish scales on the base of the pectorals (fig. 14), always combined with five to seven, rarely eight, rows of (depending on the degree of aggression) round to drop-shape spots or dashes on the flanks, irregularly following lower and upper edges of scales (cf. figs. in RÖMER & RÖMER, 2015, pp. 29 & 30). Analyses of



Fig. 7. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult male; not preserved; coloration while aggressively displaying to mouth-brooding female (behind).



Fig. 8. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult male; not preserved; vertical bars are visible only in subdominant males subordinated by aggressive dominant females.

large series of photographs of several females showing this colour pattern have revealed that these line-forming spots or dashes are positioned on the outer radius of the scales a short distance from their upper or lower edges. Female *A. barlowi* may also sometimes exhibit black spots generally reminiscent of those described here, but they never follow the scale edges as in *Apistogramma megastoma* sp. n., but are randomly distributed over the abdomen, never forming such regular lines. In females in a high state of aggression the ground colour changes from bright yellow to whitish yellow, with a pronounced

narrow straight black interorbital stripe, a roughly triangular blackish area between the upper margins of the orbits and extending halfway to the start of the dorsal-fin base, a broad black cheek stripe, black first two to three dorsal membranes, and black ventral fins. Males also exhibit an interorbital stripe, as well as greyish lips and branchiostegal stripes, and bluish cheeks and gill covers (fig. 11). In subdominant mature males the lateral band may occasionally be expressed in combination with a faint round greyish caudal spot, which covers about a third of the height of the caudal base (figs. 8–9).



Fig. 9. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult male; not preserved; coloration of non-territorial subdominant male in neutral mood.



Fig. 10. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult male; not preserved; coloration of dominant territorial male in neutral mood.

Less obviously, the colour of the teeth and adjacent epidermal tissue may be used as an additional character (taken from live photographs) to differentiate *Apistogramma megastoma* sp. n. from its congener *A. barlowi*: in most *Apistogramma* species this internal skin tissue is more or less uniformly whitish to light grey leaving the brownish (in most species) tips of the teeth visible. In species related to *Apistogramma cactuoides* HOEDEMAN, 1951 or *A. nijsseni* KULLANDER, 1979, which develop fleshy hypertrophied lips, the tooth rows are deeply embedded in fleshy skin tissue, which is, however, pushed aside dur-

ing feeding activities such as picking larger insects from the bottom. The teeth of *Apistogramma barlowi* conform to this pattern. But adult specimens of *Apistogramma megastoma* differ significantly from this norm, as they usually exhibit yellowish (males) (fig. 17) or reddish (females) teeth with reddish brown tips. In addition, unique within the genus, the inner mouth tissue embedding the teeth of brood-caring females turns deep red (fig. 18).

Systematic relationships: The systematic positioning suggested here has to be seen as provisional pending



Fig. 11. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult male; not preserved; typical head pattern of slightly aggressive dominant male, with pronounced interorbital stripe and grey lips.

Fig. 12. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult female; not preserved; typical coloration (including broad cheek stripe, dorsal spots, and lateral spot) while guarding fry immediately after free-swimming.

Fig. 13. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult female; not preserved; aggressive coloration while guarding about 2-week-old fry.

Fig. 14. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult female; not preserved; highly aggressive coloration (expressing broad cheek stripe, nearly completely black ventral fin, dorsal spots, and spot line pattern) while guarding fry in presence of *Crenicichla regani*, about 1 week after release from mouth.

Fig. 15. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult female; not preserved; picking up fry as juvenile *Crenicichla regani* approaches; typical coloration when predators are present, including broad cheek stripe, vertical bars, and spot line pattern.

Fig. 16. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult female; not preserved; typical brownish coloration after losing fry, including broad cheek stripe, black dorsal spots, and lateral spot.



17



18



19

Fig. 17. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult male; not preserved; portrait of male in frontal threat showing coloration of teeth and inner mouth tissue.

Fig. 18. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult female; not preserved; frontal portrait of brood-caring female showing coloration of teeth and adjacent tissue.

Fig. 19. *Apistogramma megastoma* sp. n., adult male; not preserved; portrait showing extreme size of mouth when protruded.

more precise analysis on completion of further ongoing morphological, behavioural, and genetic⁴ studies (QUÉROUIL *et al.*, 2016). But it is currently known that *Apistogramma megastoma* sp. n. shares typical morphological features of the members of the *Apistogramma cacauioides* complex within the *Apistogramma steindachneri* lineage (nomenclature following RÖMER, 2006c), with *Apistogramma barlowi* seemingly its closest relative. On

the basis of cluster analysis studies of the phylogenetic relationships within the genus (RÖMER, 2006c), these two species, along with a further, as yet undescribed, form, constitute the *Apistogramma barlowi* subcomplex within this species-rich phylogenetic group. This subcomplex represents the basal sister group to the remaining subcomplexes and species of the *Apistogramma cacauioides* complex. In opsite to this, resulting on molecular analysis (TOUGARD *et al.*, submitted), *A. barlowi* and *A. megastoma* sp. n. (referred to as *Apistogramma* sp. 7 in that paper) represent the basal sister group to species lumped in the *Apistogramma nijsseni* complex excluding *A. ca-*

⁴ Results of initial, as yet unpublished, genetic analysis also clearly separate *Apistogramma megastoma* sp. n. from *A. barlowi*.

catuoides to another clade, leaving the relationships in between this major branches partially unresolved and the necessity for further close inspection.

Etymology: The specific name *megastoma*, a composite noun in apposition, is derived from the Greek μέγα (mega) meaning large and στόμα (stoma) meaning mouth. The name refers to the exceptionally large mouth of the species, which enables it to perform mouth-brooding behaviour and swallow relatively large prey.

Distribution and Ecology: The species is known only from a number of Peruvian waters in an area southwest of Leticia, close to the northern border area between Peru and Brazil (fig. 20). At present confirmed finds and reliable ecological information relate solely to observations from a few small forest streams nearby made by VAN GENNE (2010a-b). MACA AUSBER (pers. comm.) claims to have collected *A. megastoma* sp. n. in various small streams in the Río Jutai drainage close to the Brazilian border, but this information still needs to be independently confirmed (RÖMER & RÖMER, 2015). Just as with *Apistogramma barlowi*, collecting sites for *A. megastoma* sp. n. are only sporadically productive. The fact that this species has not been caught by other collectors is an obvious result of the remoteness of the collecting sites, which can be reached only by boat or long distances on foot through the rain forest. On the basis of information provided by the collector (pers. comm.), the distribution of *Apistogramma megastoma* sp. n. is limited to small fast-flowing forest streams (igarapés) with crystal-clear water. VAN GENNE (2010a-b) provides information more indicative of blackwater habitat species. On the basis of information given in RÖMER & HAHN (2008) for *A. barlowi*, this may be indicative of comparable ecological conditions in the habitat of *Apistogramma megastoma* sp. n. Given this limited data on the distribution and ecology of *Apistogramma megastoma* sp. n., further field studies are required.

Biology: A detailed overview of the behaviour of this species in captivity has been given elsewhere (RÖMER & RÖMER, 2015). The most important behavioural features are the highly ritualised threat behaviour and larvophilic mouth-brooding. The ritualised frontal threat behaviour seen in *Apistogramma barlowi* males, such as digging and building little sand piles, has not been observed in *Apistogramma megastoma* sp. n. Instead *Apistogramma megastoma* sp. n. threatens its opponents frontally as well as laterally with its mouth wide open (vs. closed in *A. barlowi*) (fig. 17, cf. also figs. in RÖMER & RÖMER, 2015: p.28). During aggressive interactions male *Apistogramma megastoma* sp. n. often dispense with frontal threat behaviour and immediately proceed to lateral threat (fig. 7), while *Apistogramma barlowi* may perform highly ritualised frontal threat for long periods (up to several hours) before starting lateral threat. Females take their larvae into their mouths immediately after they hatch (from typical *Apistogramma* p-type eggs; for terminology see WICKLER, 1956) (fig. 15). Unlike in *Apistogramma barlowi*,

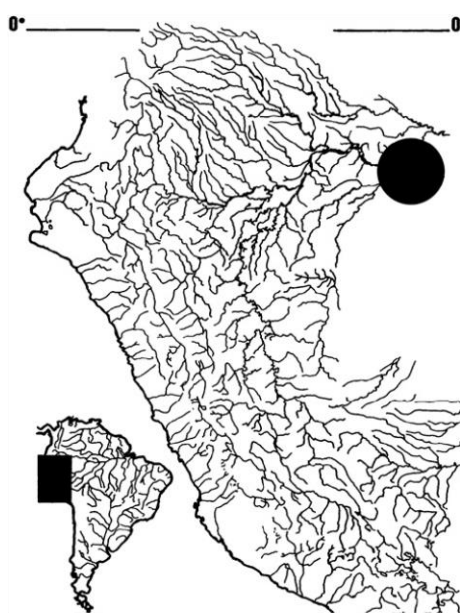


Fig. 20. Map of Peru showing known distribution of *Apistogramma megastoma* sp. n., type locality indicated by dot.

the eggs of *Apistogramma megastoma* sp. n. are neither enlarged nor reduced in number. As otherwise observed within the genus only in *Apistogramma barlowi*, female *Apistogramma megastoma* sp. n. keep their larvae inside the mouth almost constantly during their further development to the free-swimming stage. The larvae are put down regularly only to permit feeding. Unlike in *Apistogramma barlowi*, in *Apistogramma megastoma* sp. n. no facultative mouth-brooding by males or any type of attempt at it has been registered during our ongoing behavioural studies to date, even under highly variable maintenance conditions (cf. also RÖMER & HAHN, 2008; RÖMER & RÖMER, 2015): unlike what has been observed in *A. barlowi*, strong current apparently has no effect as regards inducing males to participate in direct brood care. In our opinion *Apistogramma megastoma* sp. n. has proved to be an exclusively maternal mouth-brooding species, further distinguishing the species from its congener *Apistogramma barlowi*, in which both parents may be involved in larval mouth-brooding behaviour. To date mouth-brooding in the genus is known only from these two species.

Discussion

Amongst the described species of *Apistogramma* there is only one that may morphologically be mistaken for the new species described here: *Apistogramma barlowi* (cf.

figs. in RÖMER & HAHN, 2008; RÖMER & RÖMER, 2015). Females of that species may be easily distinguished from *Apistogramma megastoma* sp. n. by the broad black band visible on the breast immediately posterior to the pectoral fins at the position of vertical bar 2; this black breast band is always absent in female *Apistogramma megastoma* sp. n.. None of the specimens investigated, and none of the nearly 80 female F₁ and F₂ offspring of several wild-caught specimens of *Apistogramma megastoma* sp. n. known to us, has exhibited such a breast band, while this marking is present in almost all female *A. barlowi*. Female *A. barlowi* exceptionally lacking this band usually exhibit an irregular pattern of black patches instead, as well as a significantly narrower cheek band, distinguishing them from the species described here. In addition, females of *Apistogramma megastoma* sp. n., unlike those of *A. barlowi*, exhibit a typical pattern of regular black dashes at the upper and lower edges of nearly every single body scale, creating a pattern of seven to nine dotted longitudinal lines extending for the complete height of the body (RÖMER & RÖMER, 2015, l. c.).

Along with *Apistogramma barlowi*, *A. megastoma* sp. n. can be differentiated from all other *Apistogramma* species (for specific details of the prior taxon see RÖMER & HAHN, 2008, for figures of other related taxa see RÖMER *et al.*, 2015) by its unique shape, proportionally much larger head and jaws, lack of regular rows of conspicuous black abdominal markings, overall coloration, and behaviour. The two species may be adequately differentiated from one other by their typical colour patterns, brooding behaviour, and a number of morphometric data (table 4). Compared to their congener *A. barlowi*, both sexes in *Apistogramma megastoma* sp. n. exhibit a clear tendency to have a narrower head, shorter snout, smaller preorbital distance, narrower interorbital width, slightly longer dorsal- and anal-fin bases, larger eyes, and overall deeper body, all relative to head length, plus a deeper body and longer dorsal- and anal-fin bases relative to interorbital width (in % SL). Compared to *A. barlowi*, male *Apistogramma megastoma* sp. n. have higher counts for preopercular pores (up to 8), an overall deeper cheek with at least one (or two) more rows of cycloid scales, and a shorter caudal peduncle. But given the still limited material available, biometric correlations could not be sufficiently tested for significance.

However, according to KULLANDER (1980), biometric differences are of limited diagnostic value within the genus *Apistogramma*. We share this opinion, as it is obvious that miniaturisation within the genus has resulted in a reduction in scope for differentiation in overall morphology. HANKEN & WAKE (1993) have discussed physiological and evolutionary consequences of miniaturisation. Unlike insects, which may be able to modify several parts of their exoskeleton, miniaturised vertebrates such as fishes have a greatly reduced capacity for changing their basic morphology. Biometric differentiation in small or dwarf fishes may thus be the result solely of environmental impact and highly variable, as the miniaturisation process may itself be linked to adaptation to specific

ecological conditions rather than to major evolutionary fundamentals. This could perhaps trigger the direction of morphometric development randomly, making the resulting characters more or less useless for taxonomists. In fact, measuring larger series of specimens has shown significant variation in some proportions even within a particular *Apistogramma* species, sometimes clearly exceeding value ranges such as those recently used as diagnostic for species delimitation by MESA & LASSO (2011), for example. Hence the pattern of black in *Apistogramma* (KULLANDER, 1980) and – even more importantly – live coloration, where evolutionary development is most probably driven by sexual selection rather than other factors, remain decisive for species determination. Despite our arguments and those of KULLANDER, MESA & LASSO (2011) do not use live coloration as a standard diagnostic feature, but instead place excessive value on statistical differences derived from inadequate data, and worse, regard collecting sites as diagnostic features.

Nevertheless, the most striking synapomorphic characters of *Apistogramma megastoma* sp. n. and *A. barlowi* are undoubtedly the extraordinary reproductive behaviour (described at length by BREEZE, 2007; KOSLOWSKI, 2002; RÖMER, 2006a-c; RÖMER & RÖMER, 2015) and the disproportionately large head and mouth (cf. RÖMER & HAHN, 2008, this work) (figs. 1–3, 5, 7–11, 18 & 19). This is especially noteworthy, as LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, (2012), using compound analysis methods in a complex study on the radiation of South American geophagines, found a clear association between morphology and substrate sifting: among geophagines, substrate sifting is associated with short, deep heads. All *Apistogramma* species are small-bodied taxa that sift substrate for detritus to a moderate extent (RÖMER, 2006), and thus theoretically should conform with the associated head morphology. But on the contrary, at least half of the species of *Apistogramma* have long heads with a massively enlarged mouth structure. As *Apistogramma* species are also highly adept at picking individual benthic invertebrates from the substrate, the evolutionary pressure exerted on their morphology by their sifting behaviour would appear to be less significant than might be expected from the above-mentioned study, and simply cancelled out by the effects of other factors.

STEEL & LÓPEZ-FERNÁNDEZ (2014) have argued that miniaturisation in cichlid species, including *Apistogramma*, may be the result of niche-forming processes triggered by predation by larger species in general. Particularly under high pressure from predatory species such as *Crenicichla* or *Hoplias*, the ability to employ a mouth-brooding strategy ought to be of significantly higher efficiency compared to the fry-guarding behaviour known from other *Apistogramma* species. Not only because the larvae, and later the growing fry, can be protected within the mouth, but also because the brood may rapidly be moved from the actual danger zone to a safer area in the guarding parent's (in this case the female's) territory. Hence mouth-brooding behaviour might be seen as an adaptive result of niche forming under (extreme) predation.

Several other species of the genus *Apistogramma* have developed extraordinary modifications of morphological characters. They include some that have evolved extreme sexual size polymorphism and enlarged mouth and jaws, probably as a result of mate choice systems (cf. ENGELKING *et al.*, 2010; RÖMER, 2006; RÖMER *et al.*, 2014). But none of these species has been identified as mouth-brooding (LINKE & STAECK, 2006; MAYLAND & BORK, 1997; RÖMER, 2000, 2006; RÖMER & RÖMER, 2015; STAECK, 2003). RÖMER & HAHN (2008) discussed environmental conditions that might be expected to trigger mouth-brooding behaviour in the genus *Apistogramma*, including predation. We have subsequently obtained convincing evidence from field and laboratory observations (BENINDE *et al.*, in prep.; RÖMER, unpubl. data), that most species of *Apistogramma* are highly adapted to survive at very low levels of dissolved oxygen. BENINDE *et al.* (in prep.) have found breeding females of various *Apistogramma* species in water with extreme oxygen levels significantly lower than 1 mg/l. *Apistogramma* females were regularly observed in extremely shallow, warm (up to 35 °C), nearly anoxic, and acid water. Here numbers of large predators were low to zero, and, as usually only one *Apistogramma* species was observed in such physiologically extreme environments, it is possible that even interspecific competition is lacking, creating conditions that constitute safe territory for brooding dwarf cichlid females (RÖMER *et al.*, 2012). Nevertheless, in addition to continuous predation, interspecific competition may be a key factor in developing mouth-brooding behaviour against a given environmental background. In fact we have repeatedly found up to four, occasionally up to six, species of *Apistogramma* living sympatric in a variety of Peruvian and Brazilian locations (see also RÖMER 2000, 2006).

The head and mouth morphology of *A. megastoma* sp. n. is obviously related to mouth-brooding behaviour, and must be seen as the result of (sexual) selection and a general tendency to maximise reproductive success and optimise biological fitness. Small fishes have few opportunities to maximise direct reproductive success. They may, if they produce numerous small eggs, spawn repeatedly with high frequency and carry out some form of brood care on eggs, larvae, and even fry in order to positively influence the survival probability of their offspring. SHINE & GREER (1991) have discussed what triggers variation in species clutch size. And in fact many miniaturised species have a significantly increased relative egg size, compensated by a reduction in egg numbers and intensified brood-care behaviour. *Apistogramma* species are among the smallest Neotropical fishes and have significantly enlarged eggs compared to smaller non-cichlid species like characids. In addition, it is also well known that mouth-brooding species regularly produce significantly larger eggs compared to their non-mouth-brooding congeners. Furthermore, large body size in mouth-brooding species appears to be positively correlated with either egg number or egg size, with larger head size resulting in increased carrying capacity during incubation of the brood. The combination of these factors may directly result in higher reproductive

success *per se*, and, in the long term, in individual biological fitness. Hardly surprisingly, the two larvophilic mouth-brooding *Apistogramma* species are among the largest species known from the genus (cf. RÖMER & HAHN, 2008). Only wild-caught males of the recently described *Apistogramma kullanderi* VARELLA & SABAJ PÉREZ, 2014 grow to a larger size (reproductive details are still unknown), while wild-caught females of *Apistogramma megastoma* sp. n. are the largest known in the genus.

All species of *Apistogramma* lay p-type eggs of fairly uniform size (RÖMER, 2001, 2006). The eggs of *Apistogramma barlowi* are significantly larger than those of all congeners (KOSŁOWSKI, 2000, 2002, 2003; RÖMER, 2006; STAECK, 2004). Females of most *Apistogramma* species, e.g. *A. cactuoides*, may produce about 100 to more than 250 eggs in a single clutch (RÖMER, 2001), but even females of the smallest species within the genus, e.g. *A. wapisana* RÖMER *et al.*, 2006, may regularly produce up to 150 eggs in a single clutch (RÖMER, 2001 & unpubl. data). In *A. barlowi* the size difference results in a significantly smaller clutch size and lower number of offspring compared to non-mouth-brooding species: *A. barlowi* clutches rarely contain more than about 30 eggs. It might thus be expected that *Apistogramma megastoma* sp. n. would share larger egg size and low egg numbers with *A. barlowi*, but this is not the case. Egg size in *Apistogramma megastoma* sp. n. is intermediate between that of *A. barlowi* and non-mouth-brooding species such as *A. cactuoides*. Comparably sized females of *Apistogramma megastoma* sp. n. (~ 25-30 mm SL) may lay about twice as many or even more eggs than those of *A. barlowi*, with clutch size in large females (>40 mm SL) regularly exceeding 100 or more eggs (CIR & UR, unpubl. data). The fact that clutches of *A. megastoma* sp. n. are much larger and the eggs smaller is another diagnostic but far less obvious feature of the reproduction of the two mouth-brooding species. In aquarium experiments, independent of the size of eggs or clutch the reproductive success of *Apistogramma megastoma* sp. n. proved to be significantly dependant on the mouth-carrying capacity of the guarding female when fry needed to be picked up in the event that the potential predator *Crenicichla regani* PLOEG, 1989 approached the offspring (RÖMER, 2000, 2001). Based on our observations it may be speculated that bi-parental mouth-brooding behaviour, as observed in *Apistogramma barlowi*, has developed from shelter-brooding ancestors (with female brood care) via maternal mouth-brooding relatives such as *Apistogramma megastoma* sp. n., as a response to high predation pressure.

The case of *Apistogramma barlowi* and *Apistogramma megastoma* sp. n. suggests the desirability of increased systematic focus on species or species groups within the genus with large distributions (e.g. *A. agassizii*, *A. bitaeniata*, and *A. cactuoides*), as these may in fact represent species clusters with several cryptic species included. The phenomenon is not restricted to *Apistogramma*: recently genetic microsatellite marker inspection of the hatchetfish *Carnegiella marthae* (MYERS, 1927) in the Brazilian Rio Negro system has brought

to light two cryptic species within that taxon (PIGGOTT *et al.*, 2011). And the tools for closer inspection of *Apistogramma* species and populations are now available following the development of specific microsatellite markers (QUÉROUIL *et al.*, 2016).

Acknowledgements

We are grateful to Albertino Maca Ausber (Iquitos, Peru) for collecting part of the study material including type specimens, for providing field observations, and indicating locality data. The Gobierno Regional de Loreto, Dirección Regional de la Producción (DIREPRO) kindly gave permission for the export of preserved as well as live specimens to the IRD-IIAP within the LMI-EDIA project *Caracterización y Valorización de la diversidad ictiológica amazónica para el desarrollo de una piscicultura razonable*. We thank David Panduro, Carlos Reyes, Tulio C. Correa Girón, and Debbie Regategui Ocampo (DIREPRO) for constructive discussions, unreserved cooperation, and friendly support. Hernan Ortega, Ana Maria Cortijo, Giannina Isabel Trevejo, and Silvia Soledad Valenzuela (MUSM) kindly supported UR during inspection of the MUSM collection. We also thank Hernan Ortega (MUSM) and Axel Zarske (MTD F) for their cooperation in the depositing of voucher specimens and / or the opportunity for examination of comparative material in their collections. Laura Fels, Nina Leiwes, and Charlotte Mühle produced x-rays for the BiA of which some were analysed for this study. We are especially grateful to Roger Mori sr. and Sergio Llanos for their skilled help in collecting comparative specimens for the project *Biodiversity in Apistogramma* within the LMI, even under the most bizarre and uncomfortable conditions. We also thank Fred Chu Coo (IIAP) for his kind help in solving organisational problems. David P. SOARES (Sisters, Oregon, US), Edgard Panduro Noronha [Ornamental Amazon Fish Aquarium (O.A.F.A.)], as well as Ina and Andreas Fröhlich (Deister Aquaristik), provided technical assistance in exportation of live voucher specimens. We also especially thank Mary Bailey (Crediton, Devon, UK) and two anonymous reviewers for reading and helpfully commenting on this manuscript.

References

- DAVIS, J.I. & NIXON, K.C. (1992): Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. – *Systematic Biology*, **48**: 502–511.
- BREEZE, M. (2007): *Apistogramma* sp. “Maulbrüter”, the one and only. – *Cichlidae: The Journal of the British Cichlid Association*, **28** (5): 5–15.
- ELMER, K.R., LETHONEN, T., KAUTT, A.F., HARROD, C. & MEYER, A. (2010): Rapid sympatric ecological differentiation of crater lake cichlid fishes within historical times. – *BMC Biology* **8** (60): 2–15. [doi: 10.1186/1741-7007-8-60]
- ENGELKING, B., ROMER, U. & BEISENHERZ, W. (2010): Intraspecific colour preference in mate choice by female *Apistogramma cacauioides* Hoedeman, 1951 (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). – *Vertebrate Zoology*, **60**(2): 123–138.
- HANKEN, J. & WAKE, D.B. (1993): Miniaturization of body size: Organismal consequences and evolutionary significance. – *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **24**: 501–19.
- KOSŁOWSKI, I. (2000): Putzverhalten und Maulbrutpflege. – *DATZ* **53** (11): 18–21.
- KOSŁOWSKI, I. (2002): Maulbrutpflege bei einer Art der Gattung *Apistogramma*. – DCG-Informationen, Sonderheft **1**: 27–29.
- KOSŁOWSKI, I. (2003): Die Buntbarsche Amerikas. Volume 2. *Apistogramma* & Co. – Eugen Ulmer, Stuttgart: 320 pp.
- KULLANDER, S.O. (1980): A Taxonomical Study of the Genus *Apistogramma* REGAN, with a Revision of Brazilian and Peruvian Species (Teleostei: Percoidae: Cichlidae). – *Bonner zoologische Monographien* **14**. Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander König, Bonn: 152 pp.
- KULLANDER, S.O. (1980): Description of a new species of *Apistogramma* from the Rio Madeira system in Brazil (Teleostei: Cichlidae). – *Bulletin Zoologisch Museum, Universiteit van Amsterdam* **7** (16): 157–164.
- KULLANDER, S.O. (1981): Description of a new species of *Apistogramma* (Teleostei: Cichlidae) from the upper Amazon basin. – *Bonner zoologische Beiträge* **32** (1/2): 183–194.
- KULLANDER, S.O. (1986): Cichlid Fishes from the Amazon River Drainage of Peru. – *Swedish Museum of Natural History, Stockholm*: 431 pp.
- KULLANDER, S.O. (1990): *Mazarunia mazarunii* (Teleostei: Cichlidae), a new genus and species from Guyana, South America. – *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **1** (1): 3–14.
- LEVITON, A.E., GIBBS, R.H., HEAL, JR. E. & DAWSON, C.E. (1985): Standards in herpetology and ichthyology: Part I. Standard symbolic codes for institutional resource collections in herpetology and ichthyology. – *Copeia* **1985** (3): 808–832.
- LINKE, H. & STAECK, W. (2006): Amerikanische Cichliden I. Kleine Buntbarsche. 8th compl. rev. edition. – Tetra Verlag, Berlin-Velten: 296 pp.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H., WINEMILLER, K.O., MONTAÑA, C. & HONEYCUTT, R.L. (2012): Diet-Morphology Correlations in the Radiation of South American Geophagine Cichlids (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). – *PlosOne* **7** (4): e33997: 14 pp.
- MAYLAND, H.J. & D. BORK (1997): Zwergbuntbarsche: Südamerikanische Geophaginen und Crenicarinen. – Landbuch Verlag, Hannover: 187 pp.
- MENDELSON, T.C. & SHAW, K.L. (2012): The (mis)concept of species recognition. – *TREE* **27** (8): 421–427.
- MESA SALAZAR, L.M. & LASSO, C.A. (2011a): *Apistogramma megaptera* (Perciformes: Cichlidae), una nueva especie para la cuenca del Orinoco. – *Biota Colombiana* **12** (1) 2011: 19–29.
- MESA SALAZAR, L.M. & LASSO, C.A. (2011a): Revisión del Género *Apistogramma* Regan, 1913 (Perciformes, Cichlidae) en la cuenca del río Orinoco. – Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; Bogotá, D. C., Colombia: 192 pp.
- PIGGOTT, M.P., CHAO, N.L. & BEHEREGARAY, L.B. (2011): Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest species. – *Biological Journal of the Linnean Society* **102**: 391–403. [DOI: 10.1111/j.1095-8312.2010.01571.x]
- QUÉROUIL, S., A. VELA DIAZ, C. GARCÍA-DÁVILA, U. RÖMER & J.-F. RENNO (2016): Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in neotropical fishes of the genus

- Apistogramma* (Perciformes: Labroidae: Cichlidae). – Journal of Applied Ichthyology **31** (Supplement 4): 52 – 56 [doi: 10.1111/jai.12975].
- READY, J.S. & KULLANDER, S. (2004): *Apistogramma erennopyge*, a new species of cichlid fish (Teleostei: Cichlidae) from Peru. – Zootaxa **564**: 1 – 10.
- READY, J.S., SAMPAIO, I., SCHNEIDER, H., VINSON, C., DOS SANTOS, T. & TURNER, G.F. (2006): Colour forms of Amazonian cichlid fish represent reproductive isolated species. – Journal of Evolutionary Biology **564**: 1 – 10.
- REICHARD, M. & POLAČIK, M. (2010): Reproductive isolating barriers between colour-differentiated populations of an African killifish, *Nothobranchius korthausae* (Cyprinodontiformes). – Biological Journal of the Linnean Society **100**: 62 – 72.
- RÖMER, C.I. & RÖMER, U. (2015): Anmerkungen zur Identifizierung von *Apistogramma* sp. „Jutai“, einem weiteren maulbrütenden Zwergbuntbarsch aus dem oberen Amazonas-Einzug. – DCG-Informationen **46** (2): 26 – 31.
- RÖMER, U. (1994): *Apistogramma mendezi* nov. spec. (Teleostei: Perciformes: Cichlidae): Description of a New Dwarf Cichlid from the Rio Negro System, Amazonas State, Brazil. – aqua Journal of Ichthyology and Aquatic Biology **1** (1): 1 – 12.
- RÖMER, U. (1997): Diagnoses of two new dwarf cichlids (Teleostei: Perciformes) from Peru, *Apistogramma atahualpa* and *Apistogramma panduro* n. spp. – Buntbarsche Bulletin – The Journal of the American Cichlid Association **182** (October 1997): 9 – 14.
- RÖMER, U. (2000): Cichlid Atlas 1: Natural history of South American dwarf cichlids. Volume 1. – Mergus Publishers, Melle: 1311 pp.
- RÖMER, U. (2001): Influence of temperature on fertility, growth rates, and reproductive success on selected species of *Apistogramma* (Teleostei, Cichlidae). – Verhandlungen der Gesellschaft für Ichthyologie **2**: 87 – 106.
- RÖMER, U. (2006): Cichlid Atlas 2: Natural History of South American Dwarf Cichlids. Volume 2. – Mergus Publishers, Melle: 1319 pp.
- RÖMER, U. & BEISENHERZ, W. (2005): Intra- and interspecific mate choice of female *Apistogramma cactuoides* Hoedemann, 1951 (Teleostei, Perciformes, Cichlidae). – Ichthyological Exploration of Freshwaters **16** (4): 339 – 345.
- RÖMER, U., BENINDE, J. & HAHN, I. (2011): *Apistogramma playayacu* sp. n.: Description of a new cichlid species (Teleostei: Perciformes: Geophaginae) from the Rio Napo system, Ecuador. – Vertebrate Zoology **61** (3): 321 – 333.
- RÖMER, U., BENINDE, J., DUPONCHELLE, F., VELA DÍAZ, A., ORTEGA, H., HAHN, I., SOARES, D.P., DÍAZ CACHAY, C., GARCÍA DÁVILA, C.R., SIRVAS CORNEJO, S., RENNO, J.-F. (2012): Description of *Apistogramma allpahuayo* sp. n., a new dwarf cichlid species (Teleostei: Perciformes: Geophaginae) from in and around the Reserva Nacional Allpahuayo Mishana, Loreto, Peru. – Vertebrate Zoology **62** (2): 189 – 212.
- RÖMER, U., DUPONCHELLE, D., VELA DÍAZ, A., GARCÍA DÁVILA, C., SIRVAS, S., DÍAZ CACHAY, C. & RENNO, J.-F. (2011): *Apistogramma cinilabra* sp. n.: Description of a potentially endangered endemic cichlid species (Teleostei: Perciformes: Geophaginae) from the Departamento Loreto, Peru. – Vertebrate Zoology **61** (1): 3 – 23.
- RÖMER, U., ENGELKING, B. & BEISENHERZ, W. (2014): Genetically determined mate choice can be influenced by learning in *Apistogramma cactuoides* Hoedemann, 1951 (Teleostei, Cichlidae). – Vertebrate Zoology **64** (2): 199 – 206.
- RÖMER, U. & HAHN, I. (2008): *Apistogramma barlowi* sp. n.: Description of a new facultative mouth-breeding cichlid species (Teleostei: Perciformes: Geophaginae) from Northern Peru. – Vertebrate Zoology **58** (1): 49 – 66.
- RÖMER, U., HAHN, I., MELGAR, J., SOARES, D.P. & WÖHLER, M. (2004): Redescription of *Apistogramma erennopyge* Ready & Kullander, 2004. – Das Aquarium, **38**(12) (426): 17 – 34.
- RÖMER, U., HAHN, I., RÖMER, E., SOARES, D.P. & WÖHLER, M. (2003): *Apistogramma martini* sp. n. - Beschreibung eines geophaginen Zwergcichliden (Teleostei: Perciformes) aus dem nördlichen Peru. – Das Aquarium, **37**(4) (406): 14 – 29.
- RÖMER, U., HAHN, I., RÖMER, E., SOARES, D.P. & WÖHLER, M. (2004): *Apistogramma baenschi* sp. n.: Description of another geophagine Dwarf-Cichlid (Teleostei: Perciformes) from Peru. – Das Aquarium, **38**(8) (422): 15 – 30.
- RÖMER, U., HAHN, I. & VERGARA, P.M. (2010): Description of *Dicrososs foirmi* sp. n. and *Dicrososs warzeli* sp. n. (Teleostei: Perciformes: Cichlidae), two new cichlid species from the Rio Negro and the Rio Tapajos, Amazon drainage, Brazil. – Vertebrate Zoology **60** (2): 123 – 138.
- RÖMER, U., PRETOR, P. & HAHN, I. (2006): *Apistogramma huascar* sp. n. – Description of a Dwarf Cichlid from Peru. – pp. 530 – 573 in: Römer, U. (ed.): Cichlid Atlas 2: Natural History of South American Dwarf Cichlids. Volume 2. Mergus Publishers, Melle.
- RÖMER, U., RÖMER, E. & HAHN, I. (2006): *Apistogramma rositae* sp. n. - Description of a new Dwarf Cichlid from Peru. – pp. 668 – 693 in: Römer, U. (ed.): Cichlid Atlas 2: Natural History of South American Dwarf Cichlids. Volume 2. Mergus Publishers, Melle.
- RÖMER, U., RÖMER, E., SOARES, D.P. & HAHN, I. (2006): *Apistogramma pantalone* sp. n. - Description of a geophagine Dwarf Cichlid (Teleostei: Perciformes) from northern Peru. – pp. 642 – 667 in: Römer, U. (ed.): Cichlid Atlas 2: Natural History of South American Dwarf Cichlids. Volume 2. Mergus Publishers, Melle.
- RÖMER, U., SOARES, D.P., GARCÍA DÁVILA, C.R., DUPONCHELLE, F., RENNO, J.-F. & HAHN, I. (2015): Re-description of *Apistogramma payaminonis* KULLANDER, 1986, with descriptions of two new cichlid species of the genus *Apistogramma* (Teleostei, Perciformes, Geophaginae) from northern Peru. – Vertebrate Zoology **65** (3): 287 – 314.
- RÖMER, U. & WARZEL, F. (1998): *Apistogramma arua* sp. n. (Teleostei: Perciformes: Cichlidae), a new species of dwarf cichlid from the Rio Arapiuns system, Pará State, Brazil. – aqua Journal of Ichthyology and Aquatic Biology **3** (2): 45 – 54.
- SCHINDLER, I. & STAECK, W. (2013): Description of *Apistogramma helkeri* sp. n., a new geophagine dwarf cichlid (Teleostei: Cichlidae) from the lower rio Cuao (Orinoco drainage) in Venezuela. – Vertebrate Zoology **63** (3): 311 – 306.
- SEEHAUSEN, O. (2000): Explosive speciation rates and unusual species richness in haplochromine cichlid fishes: Effects of sexual selection. – Advances in Ecological Research **31**: 237 – 274.

- SHINE, R. & GREER, A.E. (1991): Why are clutch sizes more variable in some species than in others. – *Evolution* **45**: 1696–1706.
- SITES, J.W. JR. & MARSHALL, J.C. (2004): Operational criteria for delimiting species. – *Annual Reviews in Ecology, Evolution, and Systematics* **35**: 199–277.
- STAECK, W. (2003): Cichliden Lexikon, Teil 3: Südamerikanische Zwergbuntbarsche. – Dähne Verlag, Ettlingen, Germany: 219 pp.
- STAECK, W. (2004): *Apistogramma* sp. “Maulbrüter”: Zusammenfassung bisheriger Erkenntnisse. – *DCG-Informationen* **35** (6): 121–129.
- STAECK, W. (2012): Die *Apistogramma*-Arten des Orinoko-Beckens (1). – *DATZ* **65** (12): 20–27.
- STAECK, W. (2015): Färbung und Zeichnungsmuster als Mittel zur Bestimmung und Unterscheidung von Buntbarschen: Möglichkeiten und Grenzen. – *DCG-Informationen* **46** (10): 250–255.
- STAECK, W. & SCHINDLER, I. (2008): *Apistogramma erythrura* sp. n. – a new geophagine dwarf cichlid (Teleostei: Perciformes: Cichlidae) from the río Mamoré drainage in Bolivia. – *Vertebrate Zoology* **58** (2): 197–206.
- STEELE, S.E. & LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. (2014): Body Size Diversity and Frequency Distributions of Neotropical Cichlid Fishes (Cichliformes: Cichlidae: Cichlinae). – *PlosOne* **9** (9): e106336: 11pp.
- SVENSSON, E.L., ABBOTT, J.K., GOSDEN, T.P. & COREAU, A. (2009): Female polymorphism and limits to speciation processes in animals. – *Evolutionary Ecology* **23** (1): 93–108 [doi.org/10.1007/s10682-007-9208-2]
- TOUGARD, C., GARCÍA DAVILA, C. R., RÖMER, U., DUPONCHELLE, F., CERQUEIRA, F., GUINAND, B., CHAVEZ, C. A., SALAS, V., SIRVAS, S. & RENNO, J.-F. (submitted): Tempo and Rates of Diversification in the South American Cichlid Genus *Apistogramma* (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). – *PlosOne*
- VAN GENNE, E. (2010a): *Leticia 2010*. – *Cichlidae (NVC)* **36** (2): 5–21.
- VAN GENNE, E. (2010b): *Leticia 2010*. – *Cichlidae (NVC)* **36** (3): 14–18.
- VARELLA, H.R. & BRITZKE, R. (2014): *Apistogramma eleutheria* and *A. flavipedunculata*, two new species of dwarf cichlids from the rio Curuá on Serra do Cachimbo, Brazil (Teleostei: Cichlidae). – *Ichthyol. Explor. Freshwaters* **27** (1): 81–95.
- VARELLA, H.R. & SABAJ PÉREZ (2014): A titan among dwarfs: *Apistogramma kullanderi*, new species (Teleostei: Cichlidae). – *Ichthyol. Explor. Freshwaters* **25** (3): 243–258.
- WERNER, U. (2015): Arten oder Farbformen? *Apistogramma* aus dem Orinoko-Einzug. – *DCG-Informationen* **49** (9): 214–220.
- WICKLER, W. (1956): Der Haftapparat einiger Cichliden-Eier. – *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **45** (3): 304–327.
- Wiens, J.J. & Servedio, M.R. (2000): Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. – *Proceedings of the Royal Society London, Series B* **267**: 631–636.

Annexe 2: Code d'identification des séquences utilisées provenant de Genbank

Genre	Espèce	Spécimen	Code
<i>Apistogramma</i>	<i>agassizii</i>	302306	LN679006.1
<i>Apistogramma</i>	<i>agassizii</i>	302911	LT617287.1
<i>Apistogramma</i>	<i>agassizii</i>	302307	LN679007.1
<i>Apistogramma</i>	<i>agassizii</i>	302185	LN679004.1
<i>Apistogramma</i>	<i>agassizii</i>	302919	LT617281.1
<i>Apistogramma</i>	<i>agassizii</i>	302920	LT617283.1
<i>Apistogramma</i>	<i>atahualpa</i>	300411	LT617292.1
<i>Apistogramma</i>	<i>baenschi</i>	301654	LN678963.1
<i>Apistogramma</i>	<i>barlowi</i>	300542	LN678976.1
<i>Apistogramma</i>	<i>bitaeniata</i>	302613	LN679018.1
<i>Apistogramma</i>	<i>cacatuoides</i>	300690	LN679008.1
<i>Apistogramma</i>	<i>cinilabra</i>	300371	LT617305.1
<i>Apistogramma</i>	<i>eremnopyge</i>	300401	LN678971.1
<i>Apistogramma</i>	<i>eunotus</i>	301599	LN679040.1
<i>Apistogramma</i>	<i>megastoma</i>	302869	LT617339.1
<i>Apistogramma</i>	<i>moae</i>	302864	LT617316.1
<i>Apistogramma</i>	<i>nijsseni</i>	300304	LN678968.1
<i>Apistogramma</i>	<i>paulmuelleri</i>	300387	LT617328.1
<i>Apistogramma</i>	<i>playayacu</i>	FMNH 101589 PT	LT617327.1
<i>Apistogramma</i>	<i>rositae</i>	301032	LN678948.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp.</i>	300438	LT617345.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp. Algodon</i>	300787	LT617290.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp. Carapintada</i>	302364	LN678993.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp. Huanta</i>	302452	LN679021.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp. Jurua</i>	302878	LT617336.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp. Melgar</i>	301639	LN678958.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp. Morado</i>	300564	LN679044.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp. Oregon</i>	302891	LT617321.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp. Papagayo</i>	301770	LN678990.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp. Pebas</i>	302561	LN679027.1
<i>Apistogramma</i>	<i>sp. Peru-regani</i>	301543	LT617344.1
<i>Apistogramma</i>	<i>wolli</i>	302976	LT617326.1
<i>Crenicichla</i>	<i>alta</i>		AY263860.1
<i>Crenicichla</i>	<i>lacustris</i>	LBP-29098	GU702154.1
<i>Crenicichla</i>	<i>vittata</i>	MG ZV-P 176	KU288884.1
<i>Crenicichla</i>	<i>britskii</i>	LBP-40272	GU701938.1
<i>Crenicichla</i>	<i>lepidota</i>	DCC01187	HM405098.1
<i>Crenicichla</i>	<i>haroldoi</i>	LBPV-31750	JN988829.1
<i>Crenicichla</i>	<i>cf. lepidota</i>	MG ZV-P 271-1	KU288841.1

Annexe 3: Paramètres historiques (a priori). N = taille efficace ; T = temps en générations ; A = mélange.
UN = distribution uniforme

N1 N UN [10000,0 - 100000,0]
N1b N UN [1000,0 - 30000,0]
N2 N UN [10000,0 - 80000,0]
N3 N UN [2000,0 - 20000,0]
N4 N UN [100,0 - 12000,0]
N5 N UN [100,0 - 10000,0]
N6 N UN [1000,0 - 22000,0]
N6b N UN [60000,0 - 200000,0]
N7 N UN [1600,0 - 16000,0]
N8 N UN [8000,0 - 40000,0]
N9 N UN [3000,0 - 30000,0]
N10 N UN [100,0 - 12000,0]
N10b N UN [1000,0 - 30000,0]
N11 N UN [100000,0 - 200000,0]
N12 N UN [10000,0 - 50000,0]
NA N UN [10,0 - 15000,0]
Na N UN [1000,0 - 100000,0]
t1 T UN [500,0 - 3000,0]
t2 T UN [500,0 - 5000,0]
t3 T UN [1000,0 - 20000,0]
t4 T UN [1000,0 - 30000,0]
t5 T UN [1000,0 - 150000,0]
t6 T UN [10000,0 - 150000,0]
t7 T UN [10000,0 - 150000,0]
t8 T UN [10000,0 - 150000,0]
t9 T UN [10000,0 - 150000,0]
t10 T UN [10000,0 - 150000,0]
db T UN [10,0 - 50000,0]
r1 A UN [0,001 - 0,999]

Annexe 4: Description des locus. A =Autosomal ; M = Microsatellites. Le chiffre 2 correspond au type de motif (dinucléotide) et le nombre à droite au nombre de répétitions

Locus01 <A> [M] 2 69
Locus09 <A> [M] 2 59
Locus08 <A> [M] 2 52
Locus14 <A> [M] 2 44
Locus28 <A> [M] 2 36
Locus16 <A> [M] 2 19
Locus30 <A> [M] 2 45
Locus32 <A> [M] 2 52
Locus06 <A> [M] 2 93
Locus11 <A> [M] 2 47

Annexe 5. Paramétrage du modèle de mutation

Mean mutation rate	Prior distribution ☒ Unif ☐ Log-u ☐ Gamma	Minimum 1.00E-004	Maximum 1.00E-3	Mean 0.0005	Shape 2
Individual locus mutation rate	Prior distribution ☒ Gamma	Minimum 1.00E-005	Maximum 1.00E-002	Mean Mean_u	Shape (1) 2
Mean coefficient P	Prior distribution ☒ Unif ☐ Log-u ☐ Gamma	Minimum 1.00E-001	Maximum (2) 20	Mean 2	Shape 2
Individual locus coefficient P	Prior distribution ☒ Gamma	Minimum 1.00E-002	Maximum 20	Mean Mean_P	Shape (1) 2
Mean SNI rate	Prior distribution ☐ Unif ☒ Log-u ☐ Gamma	Minimum 1.00E-015	Maximum (3) 1.00E-010	Mean 1.00E-009	Shape 2
Individual locus SNI rate	Prior distribution ☒ Gamma	Minimum 1.00E-020	Maximum 1.00E-009	Mean Mean_u_SNI	Shape (1) 2

(1) Set the shape to 0 if you want all individual loci to take the same value (=mean)

(2) Set the minimum and the maximum to 0 if you want a Stepwise Mutation Model (SMM)

(3) Set the minimum and the maximum to 0 if you want to exclude Single Nucleotide Insertion/deletions

Annexe 6. Choix des statistiques résumées. Pour les statistiques résumées entre deux échantillons, toutes les combinaisons par paires ne sont pas montrées

One Sample summary statistics		Samp 1	Samp 2	Samp 3	Samp 4	Samp 5	Samp 6	Samp 7	Samp 8	Samp 9	Samp 10
Mean number of alleles	☒ all ☐ none	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
Mean genic diversity	☒ all ☐ none	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
Mean size variance	☒ all ☐ none	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
Mean Garza-Williamson's M	☒ all ☐ none	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Two Sample summary statistics		Samp 1&2	Samp 1&3	Samp 1&4	Samp 1&5	Samp 1&6	Samp 1&7	Samp 1&8	Samp 1&9	Samp 1&10
Mean number of alleles	☒ all ☐ none	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Mean genic diversity	☒ all ☐ none	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Mean size variance	☒ all ☐ none	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Fst	☒ all ☐ none	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
Classification index	☒ all ☐ none	☒ ☒	☒ ☒	☒ ☒	☒ ☒	☒ ☒	☒ ☒	☒ ☒	☒ ☒	☒ ☒
Shared allele distance	☒ all ☐ none	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
(d _p) ² distance	☒ all ☐ none	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒

Annexe 7 : Estivals et al. (Soumis)

Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems



The Amazonian dwarf cichlid *Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875) is a geographic mosaic of potentially tens of species: conservation implications

Journal:	<i>Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems</i>
Manuscript ID	AQC-19-0262
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	31-Jul-2019
Complete List of Authors:	Estivals, Guillaing; Museum National d'Histoire Naturelle, Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme-ED 227. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06; Laboratoire Mixte International – Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne (LMI-EDIA) Duponchelle, Fabrice; Laboratoire Mixte International – Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne (LMI-EDIA); Institut de recherche pour le développement, UMR MARBEC (IFREMER, Université de Montpellier, CNRS, IRD) Römer, Uwe; Laboratoire Mixte International – Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne (LMI-EDIA); University of Trier, Animal Research Group, Inst. Biogeography [UTIB], Dep. Geo-Sciences; Osterwieher Straße García-Dávila, Carmen; Laboratoire Mixte International – Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne (LMI-EDIA); Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), Iquitos, Peru. Airola, Etienne; Laboratoire Mixte International – Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne (LMI-EDIA) Deléglise, Margot; Laboratoire Mixte International – Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne (LMI-EDIA) Renno, Jean-François; Laboratoire Mixte International – Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne (LMI - EDIA); Institut de recherche pour le développement, UMR Diversité Adaptation et Développement des Plantes (DIADE)
Broad habitat type (mandatory) select 1-2:	river < Broad habitat type, floodplain < Broad habitat type
General theme or application (mandatory) select 1-2:	biodiversity < General theme or application, biogeography < General theme or application, genetics < General theme or application
Broad taxonomic group or category (mandatory, if relevant to paper) select 1-2:	fish < Broad taxonomic group or category
Impact category (mandatory, if relevant to paper) select 1-2:	fishing < Impact category

<http://mc.manuscriptcentral.com/aqc>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



SCHOLARONE™
Manuscripts

<http://mc.manuscriptcentral.com/aqc>

The Amazonian dwarf cichlid *Apistogramma agassizii* (Steindachner, 1875) is a geographic mosaic of potentially tens of species: conservation implications

Guillain Estivals^{1,2,*}, Fabrice Duponchelle^{2,3}, Uwe Römer^{2,4,5}, Carmen García-Dávila^{2,6}, Etienne Airola², Margot Deléglise², Jean-François Renno^{2,7,*}

¹ Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme–ED 227. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France.

² Laboratoire Mixte International – Evolution et Domestication de l'Ichtyofaune Amazonienne (LMI–EDIA)

³ IRD, UMR MARBEC (IFREMER, Université de Montpellier, CNRS, IRD), Montpellier, France

⁴ University of Trier, Animal Research Group, Inst. Biogeography [UTIB], Dep. Geo-Sciences, Universitätsstraße 15, 54286 Trier, Germany

⁵ Österwieher Straße 196, 33415 Verl; Germany

⁶ Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), AQUAREC, Laboratorio de Biología y Genética Molecular, Iquitos, Perú

⁷ IRD, UMR Diversité Adaptation et Développement des Plantes (DIADE), Montpellier, France

Correspondence:

Guillain Estivals (ichtyos3134@hotmail.fr), Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme–ED 227. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France.

Jean-François Renno (Jean-Francois.Renno@ird.fr), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR Diversité Adaptation et Développement des Plantes (DIADE), Montpellier, France

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 ABSTRACT

- 2 1- Assessing biodiversity and understanding how it works is a prerequisite for species
3 conservation. The Amazon basin is one of the main biodiversity hotspots where fish are
4 heavily exploited for ornamental purposes. The ornamental trade heavily exploits the
5 genus *Apistogramma*, which is one of the most species-rich among Neotropical cichlids
6 with currently 94 formally described species. This number is certainly underestimated
7 owing to the limitations of conventional taxonomy, which is still too often based solely
8 on morphological criteria and sometimes on few individuals. Most species of this genus
9 have a high degree of endemism and are highly prized on the ornamental market, which
10 could put them at risk. Yet, a few species are supposed to have extensive distributions,
11 and in particular *A. agassizii*, present from the Amazon estuary up to the Ucayali and
12 Marañon rivers in Peru.
- 13 2- Here we assessed the taxonomic status of 1151 specimens of *A. agassizii* collected from
14 35 sites around Iquitos in the Peruvian Amazon. On the basis of molecular analyses
15 (nDNA and mtDNA) and mate choice experiments, we show that there are at least three
16 biological species in the morphospecies *A. agassizii* in our sampling area, which is very
17 small compared to the known distribution of the species as initially described.
- 18 3- According to the molecular calibrations, these three species would have diverged during
19 the Plio-Pleistocene. Two of them seem to be endemic from small sub basins, one from
20 the Nanay River and the other from the Apayacu/Ampiyacu systems. We develop a
21 possible scenario that may explain the evolutionary history of these species.
- 22 4- We discuss the conservation implications of our results on the estimation of the diversity
23 of *A. agassizii*, of *Apistogramma* in general and of other Amazonian cichlids.

24
25 Key words: river, floodplain, biodiversity, biogeography, genetics, fish, fishing.

1 INTRODUCTION

Anthropogenic pressures on biodiversity, and aquatic biodiversity in particular, are alarmingly increasing in the Amazon basin (Castello et al., 2013; Castello & Macedo, 2016). The main threats are deforestation (Houghton et al., 2000; Morton et al., 2006), pollution (Finer, Jenkins, Pimm, Keane & Ross, 2008; Kingston, 2002; Swenson, Carter, Domec & Delgado, 2011), species introductions (Latini & Petrere, 2004; Vitule, Freire & Simberloff, 2009; Vitule et al., 2017), or the construction of infrastructures such as hydroelectric dams (Anderson et al., 2018; Finer & Jenkins, 2012; Forsberg et al., 2017). Many of these threats result in habitat degradation or loss directly affecting aquatic communities including fish. As a traditional major source of protein and income in the Amazon basin, fish additionally have to cope with threats associated with fishing exploitation (Barthem & Goulding, 2007; Castello et al., 2013; Castello, Arantes, McGrath, Stewart & Sousa, 2015), including for ornamental purposes (Bayley & Petrere, 1989).

Of the more than 2400 fish species formally described for the Amazon basin, (Reis et al., 2016), 697 are exported from Brazil for ornamental purposes (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2017) and more than 300 from Peru (Gerstner, Sanchez & Graham, 2006). These estimates are certainly below reality due to problems of taxonomic identification by exporters. Indeed, many fish are exported under generic terms that sometimes include dozens of species (Moreau & Coomes, 2007). In addition, there are species that are not described and others that require taxonomic revisions. Indeed, the vast majority of current descriptions have been made only on morpho-meristic characteristics. At the time of molecular biology, these descriptions show their limits, particularly in the case of complexes of morphologically very close and thus by phenotype confusable species. Many fish are therefore exploited without knowing their taxonomic status and vulnerability. Most ornamental fishes have restricted distribution, or compared to species used for human consumption, live in areas with high rates of endemism (Moreau & Coomes 2007, Olivier, 2001). They are therefore particularly vulnerable to the threats already mentioned and to ornamental fishing, the impact of which has received little attention (Alho, Reis & Aquino, 2015; Crampton, 1999; Gerstner et al., 2006; Moreau & Coomes, 2007; Römer, 1995).

The genus *Apistogramma* is the most diversified of the neotropical cichlids: it is composed of 94 described valid species and is subject to regular new descriptions (Britzke, Oliveira & Kullander, 2014; Römer, 2006; Römer & Hahn, 2008, 2013; Römer et al., 2011, 2012, 2015, 2017). All of its species are considered as ornamental fish species. They generally have small distribution areas. The most extreme case is *Apistogramma cinilabra* (Römer et al., 2011;

1
2
3 60 formerly known as *A. sp.* 'Roterpunkt' in the ornamental fish trade) which exclusively lives in a
4
5 61 small isolated lake near the city of Nauta (Peru). In 2014, it was added to the IUCN Red List and
6
7 62 assessed as vulnerable. Today, it is probably in critical danger due to deforestation and chemical
8
9 63 fishing in its habitat. According to the comment of an ornamental fisherman, it has become so
10
11 64 scarce that it is no longer interesting to fish for it.

12 65 The genus *Apistogramma* does not escape the known problems of taxonomic
13
14 66 identification in other ornamental species (Britzke, 2015; Römer, 2006; Tougard et al., 2017),
15
16 67 especially since some descriptions have been made on a limited number of individuals (f. e. Mesa
17
18 68 & Lasso, 2011), not allowing to account for their distribution and intraspecific variability
19
20 69 (Schindler & Staack, 2013). The number of species belonging to this genus is probably
21
22 70 significantly underestimated (Römer, 2006), as evidenced by the many new descriptions in recent
23
24 71 years. Within this genus, only three species, *A. agassizii*, *A. cacatuoides* and *A. bitaeniata*, are
25
26 72 reported to have large distribution ranges. Fish placed into the species *A. agassizii* are found from
27
28 73 the Marañón and Ucayali rivers, along the main Amazon River, in some of its tributaries, and
29
30 74 down to its estuary at the Atlantic Ocean. They can be found throughout the floodplain of the
31
32 75 Amazon basin and live in all types of water, whether white, clear or black (Kullander, 1986;
33
34 76 Römer, 2006). The species prefers areas with little current where plant debris accumulates,
35
36 77 particularly dead leaves (Römer, 2000). Different geographical populations, based on
37
38 78 morphological characteristics, have been identified by Römer (2000, 2006) and Koslowski
39
40 79 (2002). A recent molecular study has shown that the taxon *A. agassizii* is not monophyletic at the
41
42 80 Amazon basin scale: the species *A. geophyra* is located within the taxon, which is divided into 4
43
44 81 clades, including 1 from the Peruvian Amazon (Britzke, 2015). It is therefore likely that within
45
46 82 this taxon, described on morpho-meristic characteristics and colour criteria, there are several
47
48 83 distinct biological or phylogenetic species as suggested by Britzke (2015), Römer (2000, 2006)
49
50 84 and Tougard et al. (2017). It is of paramount importance to precisely define the species
51
52 85 boundaries in the genus *Apistogramma* and, in particular, in *A. agassizii* in order to assess the
53
54 86 true species diversity of the genus *Apistogramma* as a tool to identify the number of individuals
55
56 87 extracted per species for the ornamental fish trade in order to regulate their harvesting and to
57
58 88 ensure their conservation.

59 89 The objective of our study is to evaluate the genetic variation and taxonomic status of *A.*
60 90 *agassizii* in a portion of the Loreto region (Peru). We analyse the variation of the allelic
61 91 frequencies of microsatellite markers, the sequence polymorphism of a fragment of the
62 92 Cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, and perform mate choice experiments to assess pre-
63 93 zygotic reproductive isolation. We delimit the genetic and biological boundaries of *A. agassizii*

species on the basis of three species concepts: genetic entities defined by clusters (e. g. Mallet 1995), monophylogenetic clades (e. g. Hennig, 1966; Cracraft, 1989; Mayden & Wood, 1995), and reproductive isolation (e. g. Mayr, 1942). We propose and discuss the evolutionary processes that might have caused the observed genetic variation. Finally, we discuss the nature conservation implications of the existence of a biodiversity that is probably largely underestimated, for the conservation a) of the *A. agassizii* "complex", b) of the genus *Apistogramma*, and c) of Amazonian cichlids in general.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 SAMPLING

First study areas have been defined from three regions where *A. agassizii* was known to be abundant from ornamental fishermen comments (Figure 1a). The first study area corresponds to the surroundings of Jenaro Herrera (Loreto, Peru). This region is drained by a complex network of forest streams, which flow into various parts of the Ucayali River. The streams surrounding Jenaro Herrera (at the right bank of the Ucayali) are located on "tierra firme", i.e. they are not submerged by the floods of the Ucayali (Figure 1b). A second study area corresponds to the surroundings of Orán (Figure 1c). The Orán region, hillier than Jenaro Herrera, is also drained by a complex network of forest streams where *A. agassizii* is found exclusively in lowland areas near the Amazon floodplain. The third study area is the Nanay River, representing the largest black water river in the Peruvian Amazon. *A. agassizii* is mainly distributed in its floodplain. All of the 3 regions have been sampled consecutively in order to have a global vision to evaluate the genetic structure of the species at different geographical scales.

Between 2015 and 2018, 1151 samples were collected from 35 sites near the rivers Ucayali, Marañón, Amazon and Nanay (Figure 1) using a beach seine or landing nets. The sample (all the fish) collected from a single site will thereafter be named "popsite" (the contraction of the words population and site). The fish were anaesthetized with eugenol using the protocol defined by Chanseau, Bosc, Galiay & Oules (2002) until respiratory arrest, then were stored in coded tubes one by one and preserved with 96% ethanol. The alcohol was renewed after 24 hours. The tubes with voucher specimens are kept in the collection of the "Laboratorio de Biología y Genética Molecular del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana" (LBGM-IIAP, Iquitos, Peru).

1
2
3 126 In order to evaluate the evolutionary history of *Apistogramma agassizii* in the study area,
4
5 127 the mitochondrial marker Cytochrome c Oxidase subunit I (COI) and 10 nuclear markers
6
7 128 (microsatellite locus) have been used. The COI allows to identify clade differentiation events and
8
9 129 the microsatellite loci the formation of genetic entities structured in clusters, hence that do not
10 130 share gene flow.

11 131

12 132 2.2 DNA EXTRACTION, AMPLIFICATION AND GENOTYPING OF MICROSATELLITE 13 133 LOCI

14
15
16
17 134 DNA extraction was performed from ~ 10 mg of caudal fin using a modified CTAB extraction
18
19 135 protocol (Doyle & Doyle 1987). The amplification of the 10 microsatellite loci was performed
20
21 136 with primers developed by Quéroutil, Vela Díaz, García-Dávila, Römer & Renno (2015) using
22
23 137 the Qiagen Multiplex PCR kit. For each multiplex, a fluorescent primer was marked with one of
24
25 138 the three dyes 6-FAM, HEX or NED (Applied Biosystems). The amplification program used was
26
27 139 the one recommended by the kit manufacturer (hybridisation temperature 57°C and 28 cycles).
28
29 140 The analysis of the fragment's length was performed on an ABI 3130 XL sequencer with 16
30
31 141 capillaries (Applied Biosystems). For each capillary, 1 µL of the diluted PCR product, added to
32
33 142 8.85 µL of formamide and 0.15 µL of ROX 500™ denatured for 10 min at 70°C have been used.
34
35 143 The size of each allele was obtained using the Geneious 9.1.8 program (Kearse et al., 2012).

36 144

37 145 2.3 AMPLIFICATION AND SEQUENCING OF THE CYTOCHROME C OXIDASE 38 146 SUBUNIT I (COI) GENE

39
40
41 147 The individuals sequenced were chosen after genotyping. A total of 32 individuals from 14
42
43 148 popsites were selected summarizing both the information provided by the nuclear data and the
44
45 149 sampling area. The COI was amplified using the L5698-Asn (F) 5' -AGG CCT CGA CGA TCC
46
47 150 TAC AAA GKT TTA GTT AAC-3' (Miya & Nishida, 2000) and H7271 (R) 5' -GTG GTG GGC
48
49 151 TCA TAC AAT AAA-3' (Ramos, 2007). For both fragments, amplification was performed in a
50
51 152 10 µL volume containing: 1 µL buffer 10x for Kod Hot Start DNA Polymerase (Novagen®), 1.7 µL
52
53 153 dNTP (25mM), 0.8 µL MgSO₄ (25mM), 0.7 µL Kod Hot Strat DNA Polymerase (1.0U/µL), 3.8 µL
54
55 154 H₂O, 0.5 µL for each primer and 1 µL ADN (100ng/µL). The amplification program used included
56
57 155 a polymerase activation phase of 2 min at 94°C and then 35 cycles: 30 s at 94°C, 40 s at 54°C
58
59 156 and 1 min at 72°C, to complete a final extension of 10 min at 72°C. Sequence reactions were
60
157 performed in both directions using the same primers as for amplification. The sequence analysis
158 was performed on an ABI 3130XL sequencer with 16 capillaries (Applied Biosystems).

159

160 2.4 MATE CHOICE (REPRODUCTIVE ISOLATION)

161 The objective of the experiment was to test for reproductive isolation (pre-zygotic barrier)
162 through mate choice pairing between the genetic entities observed. To determine whether females
163 preferentially reproduce with males of their own genetic entity, mate choice experiments were
164 performed in eighteen 100x30x30 cm aquariums (Figure 2). Females from different genetic
165 entities were presented two males (one of their own genetic entity and one of the other genetic
166 entity tested) of the same colour (according to our visual criteria) to choose as potential mate. In
167 each combined set the males were similar in length to avoid size assortative mating by females
168 (Beeching & Hopp 1999). Females were placed in the central compartment (50x30x30cm), males
169 in the lateral compartments (25x30x30cm). The glass dividers separating the compartment of the
170 female and the two males were drilled ($\varnothing$ 8 mm) in their lower part to allow the passage of
171 possible olfactory and / or acoustic signals. Spawning sites consisted of PVC tubes of 10 cm
172 length and 4.8 cm diameter cut lengthwise and positioned to each side of the dividers (Figure 2).
173 To exclude habituation, learning, or general preference by females for a particular end of a tank
174 during the experiments, males from the two tested genetic entities were placed alternately on the
175 right or the left side of the tank in the 18 experimental tanks. Females of each genetic entity were
176 offered the same number of male combinations (their genetic entity either on the right or on the
177 left side of the aquarium). When a female had spawned in one of the PVC spawning sites, it was
178 considered it had sexually selected the male adjacent to that site (Coultridge & Alexander 2001,
179 2002; Römer & Beisenherz, 2005). The female was then removed, placed in a recuperation tank
180 and replaced by another female of the same genetic entity. Each fish had a specific code that
181 prevented putting a female twice in contact with the same male to exclude any type of learning
182 effects on the test results as indicated by Römer, Engelking & Beisenherz (2014) for another
183 species of the genus. Aquariums were separated by black plastic film to avoid inter-tank
184 interaction.

185 Each aquarium was filtered using internal sponge filters, maintained at a temperature of
186 $\sim 25^{\circ}\text{C}$ using air-conditioner and illuminated by LED strip light on a 12 L: 12 D cycle. Fish
187 behavior and potential spawning events were observed twice a day (morning and afternoon). Fish
188 were fed commercial pellets (Aquatech® Trucha Pre-inicio 45) following this observation
189 periods.

191 2.5 DATA ANALYSIS

192

2.5.1 NUCLEAR DATA

194

2.5.1.1 ALLELIC AND GENETIC DIVERSITY

Initially, the analyses of microsatellite data were carried out using popsites as taxonomic units. Each popsite was characterized by: (1) allele diversity, average number of alleles per locus, allele richness and number of private alleles (TNA, MNA, AR and NPA respectively) using Fstat software version 1.2 (Goudet 1995) and GENETIX (Belkhir, Borsa, Chikhi, Raufaste & Bonhomme, 2004), (2) genetic diversity such as expected heterozygosity, expected unbiased heterozygosity and observed heterozygosity (H_{exp} , $H_{n.b.}$ and $H_{obs.}$, respectively) with the software GENETIX (Belkhir et al., 2004), and (3) the panmixia deviations, evaluated according to the values of the F_{is} estimator (Weir & Cockerham, 1984), using the program GENETIX (Belkhir et al., 2004).

205

2.5.1.2 DISTANCES AND GENETIC GROUP

The distance matrix from Nei & Chesser (1983) was used to create an unrooted Neighbor Joining dendrogram to establish genetic distance relationships between “popsites”. The robustness of the nodes was tested by “bootstrap” from 1000 draws. The analyses were performed using R’s “adegenet” library (Jombart, 2008). From this dendrogram we identified the clusters and then alleles with a frequency higher than 0.50 present in at least one of the clusters using the GENETIX program (Belkhir et al., 2004).

A discriminant analysis of principal components (DAPC) was performed on the individuals in order to identify clusters using R’s “adegenet” library (Jombart, 2008; Jombart, Devillard & Balloux, 2010). Popsite information was taken into account in order to identify clusters in a same popsite. This method combines both, the advantages of discriminant analysis (DA, which attempts to synthesize genetic differentiation between clusters), and of principal component analysis (PCA, which aims to synthesize overall variability among individuals, as well as variation occurring within clusters) (Jombart et al., 2010)]. In our case, this method has proven to be more efficient compared to the Bayesian method used by the “STRUCTURE” software (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000). Indeed we considered that the best method was the one that was able to find the smallest and totally disjointed clusters i.e. that cluster all the individuals of a popsite to a single branch. It has been shown by the authors of the DAPC method that this analytic strategy is more effective than using STRUCTURE in unravelling complex

population structures (Jombart et al., 2010). Then the degrees of genetic differentiation were calculated in each cluster between pairs of popsites from the values of the F_{ST} θ estimator (Weir & Cockerham, 1984) using the GENETIX program (Belkhir et al., 2004).

2.5.2 MITOCHONDRIAL DATA

2.5.2.1 ANALYSIS OF POLYMORPHISM

The complete sequence fragments were obtained by aligning the forward and reverse fragments using the MEGA-X v.10.0.5 program (Kumar, Stecher, Li, Knyaz & Tamura et al., 2018). No gaps or missing data occurred. The numbers of haplotypes, haplotypic diversity, variance of haplotypic diversity and nucleotide diversity (Nhap, Hd and π , respectively) were calculated using the DnaSP v.6 program (Rozas et al., 2017).

2.5.2.2 PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AND EVOLUTIONARY HISTORY

Two maximum likelihood (ML) trees were produced. The first (haplotype tree) was constructed from 32 sequences of *Apistogramma agassizii* rooted with two outgroups, *A. bitaeniata* and *A. eremnopyge*. The results were included in a part of the phylogeny of Tougard et al. (2017) (species tree), which corresponds to the species of the A2, A3 and A4 clades as well as 6 haplotypes of *A. agassizii* sampled in Peru. The approach was first to determine if *A. agassizii* is monophyletic in the Peruvian Amazon and second to evaluate if the Peruvian haplotypes of *A. agassizii* would correspond to the clades we highlighted. The ML trees were produced using the program MEGA-X v.10.0.5 (Kumar et al., 2018), taking into account the best evolutionary models estimated with the corrected AIC of Burnham & Anderson (2004). The strength of the tree nodes was estimated by percentage of bootstrap after 1000 replications.

In order to reconstruct the evolutionary history between clades, the molecular clock was assumed to be constant for the comparison between species. Then the differences between clades have been calculated from the number of nucleotide substitutions using the same model used for the construction of the tree (MEGA-X v.10.0.5 (Kumar et al., 2018)). The substitution rate and the divergence times of the marker between clades were then estimated using two types of calibrations from the publication of Genner et al. (2007). The first calibration considers that the origin of cichlids predates the fragmentation of Gondwana, the second calibration takes into account the fossil dating of cichlids which implies a transatlantic dispersion. The divergence dates considered were those established by the authors between the genus *Apistogramma* and

1
2
3 258 *Crenicichla*, in the first case the divergence is estimated at 50.2Ma and in the second 17.3Ma
4
5 259 ago. In order to have a better estimate of the average substitution rate between *Apistogramma*
6
7 260 and *Crenicichla* all our *Apistogramma agassizii* sequences have been used as well as
8
9 261 *Apistogramma* and *Crenicichla* sequences from GeneBank (Supporting information S1).
10 262

11 263 2.5.3 MATE CHOICE EXPERIMENTS

12
13
14 264 One-tailed binomial statistical tests were performed to test for deviation from random
15
16 265 mating between genetic entities.
17
18 266

19 267 3 RESULTS

20 268 3.1 NUCLEAR DNA

21 269 3.1.1 GENETIC VARIABILITY

22
23
24
25 270 A sample of 1151 fish was analysed distributed among 35 popsites (Figure 1). Genetic
26
27 271 diversity between popsites is very heterogeneous (Table 1). For example, the two popsites "Or7"
28
29 272 and "Or8", which have the same number of individuals, have a total number of alleles of 24 and
30
31 273 101, respectively. The allelic richness for all popsites is between 2.40 and 9.82 for an average
32
33 274 value of 5.86 ± 1.90 (SD). The "An" popsite has the highest allelic richness, followed by the
34
35 275 "JH4", "JH3" and "JH5" popsites with values of 9.54, 9.51 and 9.35, respectively. The "Or7"
36
37 276 popsite has the lowest allelic richness. The average number of private alleles per popsite is $2 \pm$
38
39 277 3.3 (SD), although the "An" popsite has 19. The values of the Fis estimator show a panmixia
40
41 278 deviation for seven popsites ("JH3", "Or8", "JH13", "JH2", "JH11", "JH16" and "JH14") over a
42
43 279 total of 35 popsites.
44
45 280

46 281 3.1.2 STRUCTURING AND GENETIC DISTANCES

47
48
49 282 The dendrogram of genetic distance shows the presence of three clusters (Figure 3).
50
51 283 Clusters 2 versus 1 and 3 are supported by a bootstrap value of 94 and cluster 3 versus 1 and 2
52
53 284 by a value of 98. Cluster 1 is highly structured. Some popsites are very differentiated, such as
54
55 285 popsites Na1, Na2 and Na3, which form a group supported by a bootstrap value of 97. Another
56
57 286 group is formed by the popsites JH15, JH19 and JH16 supported by a bootstrap value of 72 and
58
59 287 the popsites JH12, JH13, JH20, JH18 and JH8 form another group supported by a bootstrap value
60 288 of 73. This structuring is closely linked to the distribution of popsites. Indeed, popsites sampled

on the same stream network are genetically closer to each other than to popsites from neighbouring streams (Figure 1b).

For each of the 10 loci, at least one allele has a high frequency in only one of the 3 clusters (freq. >0.50, Table 2), with the exception of alleles 100 and 142 in locus 01 and 16 whose frequencies are greater than 0.5 for clusters 2 and 3. The allele 123 (locus 11) is diagnostic of cluster 1. Alleles 194 (Locus 28) and 161 (locus 09) are diagnostic of clusters 1 and 3 with frequencies of 0.45 and 0.41, respectively.

The eigenvalues of the discriminant analysis of principal components show that the two main components represent nearly 100% of the genetic structure (Figure 4a). The results show three distinct clusters that are well differentiated and genetically isolated: the ellipses of each of the three clusters do not overlap and there is no admixture between clusters (Figure 4b). The first main component differentiates on the negative side the individuals of cluster 1 (blue) and on the positive side the individuals of cluster 2 (green). The second main component differentiates individuals of cluster 3 (red). All the individuals in a popsite belong exclusively to one of the three clusters (Figure 4b). The structuring into 3 clusters gives the smallest and most differentiated clusters (Figure 4b, c and d). It is worth to note that these three clusters are the same as those identified by the dendrogram of genetic distance.

3.1.3 GENETIC DIFFERENTIATION IN CLUSTERS

The F_{st} values per pair of popsites within cluster 1 are between 0.00 and 0.36, the popsites Na1, Na2 and Na3 are the most differentiated (Table 3). For cluster 2, the F_{st} values in pairs of comparisons are between 0.00 and 0.33, the Or7 popsite is the most differentiated (Table 4). For cluster 3, the value of the F_{st} between the two popsites is 0.10.

3.2 MITOCHONDRIAL DNA

3.2.1 POLYMORPHISM OF COI SEQUENCES

The Cytochrome c Oxidase subunit I gene shows a strong polymorphism in *Apistogramma agassizii* (Table 5): the 32 sequences analysed are split up in 12 haplotypes ($H_d = 0.9173 \pm 0.023$). These are clustered into 3 clades, 5 in clade 1 ($H_d = 0.780 \pm 0.085$, $\pi = 0.00615$), 4 in clade 2 ($H_d = 0.733 \pm 0.12$, $\pi = 0.00137$), and 3 in clade 3 ($H_d = 0.679 \pm 0.122$, $\pi = 0.00089$). Of the total of 942 nucleotide sites studied, 37 are polymorphic ($\pi = 0.015$).

3.2.2 PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS

The maximum likelihood trees were constructed taking into account the best evolutionary model according to AICc, TN93+G (Log likelihood = -1541.89, gamma parameter = 0.0500 (5 categories +G), transition/transversion ratio = 6.0666) for the haplotype tree (Figure 5a) and TN93+G (Log likelihood = -2821.79, gamma parameter = 0.3722 (5 categories +G), transition/transversion ratio = 4.4691) for the species tree (Figure 5b). The haplotype tree, rooted with two species close to *A. agassizii* (*A. eremnopyge* and *A. bitaeniata*) confirms the presence of 3 clades (3 clusters with nDNA), each of which is monophyletic (Figure 5a). The three clades are supported by high bootstrap values, 100, 99 and 98, respectively. It is worth noting that haplotype 8 of clade 1 is well differentiated from other haplotypes and has a significant number of own mutations (anagenesis).

Considering that *Apistogramma* and *Crenicichla* would have diverged either 50.2 Ma (Fragmentation of Gondwana) or 17.3 Ma (Fossil dating of cichlids), the substitution rate obtained was 0.3 % by Ma or 0.9% by Ma for the partial COI marker. Then, *A. agassizii* and *A. bitaeniata*/*A. eremnopyge* would have diverged either 23.2 Ma or 8.01 Ma ago. The most recent common ancestor (MRCA) to the 3 clades would have a maximum of 3.80 Ma and a minimum of 1.31 Ma. Under the same assumptions, clades 2 and 3 would have diverged either 2.27 Ma or 0.78 Ma ago. In cluster 1, haplotype 8 would have diverged either 1.71 Ma or 0.59 Ma ago.

The three entities Sp1, Sp2 and Sp3 (which represent clades 1, 2 and 3) form a monophyletic clade supported by a bootstrap value of 100 when placed in the partial *Apistogramma* phylogeny of Tougaard et al. (2017) (Figure 5b). Of the 6 haplotypes representing the overall polymorphism observed in the study of Tougaard et al. (2017) in *A. agassizii*, 5 are positioned with Sp1 (including one with haplotype 8) and one with Sp2.

3.3 MATE CHOICE

Females from genetic entities 1 and 2 were tested for potential mating preferences for males of their own genetic entity. This mating preference would indicate their ability to recognize and intentionally mate with such. Fourteen out of 15 females tested from entity 1 laid eggs on the side of the male belonging to their own genetic entity; only one laid it on the side of a male from genetic entity 2 ($p < 0.001$). Out of the 11 females tested from genetic entity 2, 10 laid their eggs on the side of males of their own entity and only one on the side of a male of genetic entity 1 ($p = 0.005$). Our results thus indicate highly significant pre-zygotic reproductive isolation between these two genetic entities. Unfortunately, we were not able to test all possible

combinations of genetic entities, as test specimens of genetic entity 3 were still too small during the mating experiments.

4 DISCUSSION

4.1 APISTOGRAMMA AGASSIZII, A SPECIES COMPLEX ?

In *Apistogramma* most taxonomic descriptions have been made based on morpho-meristic characteristics. In some cases, these descriptions show limitations, particularly in the case of cryptic species complexes where morphological differentiation is not *a priori* sufficient (Römer et al., 2017). Therefore, the risk is evident, that some species described on these criteria are in fact groups or clusters of species, underestimating biodiversity (Briscoe & Tait, 1995, Rocha-Olivares, Fleeger & Foltz, 2001; Frankham, Ballou & Briscoe, 2002) and biasing the management of species protection status (Bowen & Avise, 1996; Frankham et al., 2002). Indeed, a taxon with poorly defined taxonomic contours could be wrongly considered representing an abundant species having a large distribution. Such a species would not require protection status, whereas it could in reality represent a group of distinct species with small distribution areas, some of which might be threatened (Römer & Hahn, 2013; Römer et al., 2015).

The wide distribution of *A. agassizii* throughout the Amazon is rather atypical for species of the genus. Several authors have suggested that it could hold clearly more than one distinct species (Britzke, 2015; Koslowski, 2002; Römer, 2000, 2006; Römer et al., 2017; Tougard et al., 2017). Our study in the small portion of Peruvian Amazon investigated, clearly shows that there are at least 3 entities that represent separate “Genotypic clusters”, or biological and phylogenetic species (Mayr, 1942; Hennig, 1966; Cracraft, 1989; Mayden & Wood, 1995; Mallet 1995), presently lumped under the name of *A. agassizii*. Using the dating of Genner et al. (2007), these 3 species would have diverged either 3.80 (Fragmentation of Gondwana) or 1.31 (fossil dating) Ma ago. If another totally independent calibration from mainly perciform reef fish based on the closure of the Panama Isthmus (DiBattista et al., 2013, Figure 5a) is considered, then the three species would have diverged either 1.17 Ma (mutation rate for COI of 1% per Ma) or 0.59 Ma ago (mutation rate for COI of 2% per Ma). The mutation rate of 1% by Ma found by DiBattista et al. (2013) is consistent with that estimated by Genner et al. (2007) with the fossil calibration.

These three species, referred to as Sp1, Sp2 and Sp3 in the following, are genetically isolated from each other, as indicated by the DAPC and the COI phylogeny. Indeed, the fact that the DAPC shows 3 totally disjointed clusters means that there have not been any recent nuclear

1
2
3 387 introgressions or any migrants between the species in the sampling. The COI phylogeny also
4
5 388 does not show any mitochondrial introgression between species. These evidences are not
6
7 389 consistent with the hypothesis of the existence of a species complex within *A. agassizii* but rather
8
9 390 support the hypothesis of a mosaic distribution of biological species.

10 391

11 392 4.2 GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF THE 3 SPECIES

12
13
14 393 Species Sp2 and Sp3 have significantly reduced distribution areas compared to species
15
16 394 Sp1. Indeed, according to the sampling they are found exclusively on the left bank of the Amazon
17
18 395 and are separated from each other by the Napo River (Figure 1). Species Sp1 appears to have a
19
20 396 much larger distribution area than the other two: it occurs on the left bank of the Marañón River
21
22 397 and the right banks of the Ucayali and Amazonas rivers.

23 398 The high F_{ST} values found between geographically close popsites (especially in Sp1)
24
25 399 belonging to the same stream system (Figure 1b) indicate a low dispersal capacity of *A. cf.*
26
27 400 *agassizii* (Frankham et al., 2002; Waples, 1987; Ward, Woodward & Skibinski, 1993). This fact
28
29 401 is in so far noteworthy, as it is incongruent with observed behaviour of several other species of
30
31 402 the genus in the past: active mass migratory or dispersal movement has been reported f. e. for
32
33 403 *Apistogramma elizabethae*, *A. paucisquamis*, *A. pertensis*, and *A. uaupezi* from the Rio Negro-
34
35 404 system in the Brazilian Amazon (Römer, 1992, 1993, 2000). For example, Jenaro Herrera's
36
37 405 popsites JH13 and JH20, which are less than 1km apart from each other (following the stream),
38
39 406 have an F_{ST} value of 0.13. Another example, still in the same stream network, the JH20 popsite
40
41 407 is less than 2 km from the JH12 popsite, yet the F_{ST} value is 0.21. The intraspecific F_{ST} values
42
43 408 observed in species Sp1 are similar to the values observed between species belonging to different
44
45 409 genera in some Haplochromine cichlids: 0.14 between *Astatotilapia nubilata* and *Lipochromis*
46
47 410 *maxillaris* for example (Odhiambo, Mautner, Bock & Sturmbauer, 2012). The popsites of Jenaro
48
49 411 Herrera (Sp1) city are found exclusively in small stream systems that tend to reduce or even dry
50
51 412 out on some sections during the dry season; this phenomenon is amplified by the intense
52
53 413 deforestation for livestock and food crops around the city. We were able to observe the
54
55 414 consequences of deforestation on the JH12 popsite (Figure 1b), which was sampled in November
56
57 415 2016; the following year at the same time (October), we wanted to complete the sampling of this
58
59 416 popsite (n=16) but the previously sampled section had completely dried out. Between these two
60
417 years a parcel of forest of several hectares was deforested around this popsite. It is likely that
418
419 419 popsites near to the city of Jenaro Herrera, which have the lowest allelic richness compared to
other popsites of species Sp1, regularly experience population bottlenecks due to deforestation.

Such bottlenecks would directly affect allelic frequencies within the popsites, which would partly explain the high F_{st} values observed in the same stream networks near the city of Jenaro Herrera.

Looking exclusively at popsites of species Sp1 from four large streams (An; JH3+JH4+JH5; Ya2+Ya3; Or8+Or9) with little or no deforestation, we observe a trend of the reduction in allelic richness from upstream (Ucayali, popsite An, $AR = 9.818$) to downstream (Amazon, posites Or8+Or9, $AR = 7.821$). Moreover, the mantel test between the geographical distance and the genetic distance of Roussel (1997) between these four streams indicated a significant isolation by distance ($p\text{-value} = 0.042$) (Figure 6b). *Apistogramma* Sp1, in the study area, therefore most likely dispersed from upstream (Ucayali) to downstream (Amazon), a result corresponding to proposals on dispersal for another species of the genus given by Römer (1992, 2000).

According to molecular dating, the three species were formed during the Plio-Pleistocene, a period known for its glacial and interglacial cycles. These glacial events have affected river dynamics, particularly erosion/sedimentation phases (Baker & Fritz, 2015) and species distribution (Dumont, Lamotte & Kahn, 1990; Hubert & Renno 2006). During the Quaternary period, terraces appeared along the Amazon and some of its tributaries like the Nanay River (Dumont & García 1989; Dumont, Lamotte & Fournier, 1988; Dumont, Deza & García, 1991; Dumont, 1992; Gonçalves, Soares, Tatumi, Yee & Mittani, 2016; Wesselingh & Salo 2006). The popsites where the 3 species of *A.cf. agassizii* were found seem to be restricted to these Quaternary terraces and floodplain. Plotting the distribution of the 35 popsites on an elevation map (Fig. 1), shows that Sp1 seems to be restricted to terraces above the floodplain areas, to the "tierra firme"; it has never been found in the floodplain area. Species Sp2 appears to inhabit streams located on the most recent (lowest) terraces, as well as the floodplains of the Apayacu and Ampiyacu rivers. It is far more difficult to postulate if species Sp3 is living on different terraces or in the floodplain due to the fact that a) the number of popsites is low (2) and b) quaternary terraces along the Nanay River are small (Räsänen et al., 1998). The dispersion of the most recent common ancestor (MRCA) and the formation of the three species may have been favoured by these geologic and climatic events. As an effect of it, the MRCA population may at least temporarily have been split up in different refuges (Ab'Sáber cited in Sick, 1993; Grabert, 1991; Hafer, 1969; Römer, 2006) and undergone further development (and genetic modifications) under more or less strict geographic isolation.

The distribution of the 3 species is also consistent with the barrier effect of large rivers (Wallace, 1854), which has already been shown in other Amazonian fish groups (Hubert & Renno 2006). Large rivers can prevent gene flow between populations of different regions

1
2
3 454 favouring allopatric speciation. Species Sp2 and Sp3, which are phylogenetically closest, are
4
5 455 found on the left side of the Amazon River and are separated from each other by the Rio Napo,
6
7 456 whereas species Sp1 is observed on the right side of the Amazon River only. These 3 species
8
9 457 have never been encountered in strict sympathy, i.e. in the same watercourse. The fact that the
10 458 popsites Na1, Na2 and Na3 housing species Sp1 are located on the left bank of the Rio Marañón
11
12 459 could *a priori* seem inconsistent with the barrier effect of large rivers. However, concomitant
13
14 460 with glacial events, the reactivation of tectonics, particularly in the Ucayali depression
15
16 461 (delimited by the Marañón and Ucayali rivers), has favoured rapid changes in the course of the
17 462 Ucayali and Marañón rivers (i.e. avulsion; Sébrier, Mercier, Mégard, Laubacher & Carey-
18
19 463 Gailhardis, 1985; RADAMBRASIL, 1977; Räsänen, Salo & Kalliola, 1987). Furthermore,
20
21 464 according to Dumont (1991), the Ucayali was once connected to the Marañón river above the
22
23 465 city of Nauta (above the popsites Na1, 2 and 3, Figure 1), which could explain the presence of
24
25 466 species Sp1 on the left side of the Marañón.

26 467 Complementarily, it has to be kept in mind that the current distribution of the three species
27
28 468 may also result from competitive interactions with other *Apistogramma* or fish species.
29
30 469

31 470 4.3 VARIATION OF COLOUR PATTERNS

32
33 471 The 3 species are distinguished at genetic (nDNA and mtDNA), behavioural (mate
34
35 472 choice), and geographic levels. Once the 3 species were clearly identified on genetic criteria,
36
37 473 phenotypic variation could also be observed *a posteriori* among the genetically identified species,
38
39 474 particularly on colour patterns of the caudal fin (Figure 7). Further studies will be needed to
40
41 475 investigate whether distinct colour and morpho-meristic patterns are detectable, and possibly,
42
43 476 working as diagnostic phenotypic characters, may be used to segregate these new species.
44
45 477

46 478 4.4 BIODIVERSITY OF THE GENUS APISTOGRAMMA IN THE AMAZON REGION

47
48 479 In eastern Amazonia, Ready et al. (2006) demonstrated the existence of 3 species in what
49
50 480 was previously known as *Apistogramma caetei* from unconnected small river basins. Here, we
51
52 481 described a similar situation in *A. agassizii*, but in a much smaller area of interconnected streams
53
54 482 and river network. We observed at least 3 species, and potentially 4 (popsites Na1, 2 et 3), from
55
56 483 our small study area of the Peruvian Amazon, located between the city of Requena on the Ucayali
57
58 484 mainstream and the city of Pebas on the Amazonas, which represents a linear distance of ~ 450
59
60 485 km. For a first rough estimate, if we report this number of species to the linear distance
60 486 corresponding to the presently known distribution of *A.cf. agassizii* (from the city of Requena to

the mouth of the Amazon), representing a distance of ~ 3500 km, a potential species richness of 23 to 31 species is obtained in *A. cf. agassizii*, i.e. ~ 30% of the *Apistogramma* species described so far. This first estimate is necessarily very rough as it, for example, does not take into account the diversity of habitats within the distribution area of the species, or the presence of rivers that may represent a barrier, or the geological history of the different watersheds, etc. It can nevertheless be considered relatively conservative, as we are far from having sampled all the small streams likely to harbour *A. cf. agassizii* in our study area, which could hold even more species. This estimate is also comparable to that made by Römer (2006) on the basis of cluster analysis carried out on 27 different morphotypes identified as *A. cf. agassizii*, which were collected on numerous sites along the whole Amazon river by commercial collectors, travelling aquarists, and scientists, and exported to Europe, Japan, and the USA (listed in Römer & Wise 2006).

The study presented here clearly demonstrates, that *A. agassizii* by no means can be considered a widespread species any longer: the taxon in real can represent a supercomplex or a mosaic of many species whose precise contours remain open to be defined. Our results highlight the urgent need for further studies in different Amazonian countries to better specify the number of species in *A. cf. agassizii* and to respectively delineate their distribution ranges, which could be limited in some cases. This information is essential to clarify our knowledge of Amazonian ichthyological diversity and its rates of local endemism, in order to develop appropriate conservation and management strategies (Nogueira et al., 2010). Our results indeed suggest that 2 out of the 3 newly identified species could be endemic to very localized regions: the Apayacu and Ampiyacu systems for species Sp2 and the Nanay basin for species Sp3. Management of aquarium market should be revised to take that into account in order to avoid local extirpations and loss of genetic variability, which has to be one of conservation's ultimate goals.

It is also very likely that the two other species known to have a very wide distribution in the Amazon basin, *A. bitaeniata* and *A. cacaotoides*, also hold many species, as suggested by Römer (2000, 2006), Römer et al. (2015, 2017), and Britzke (2015). The genus *Apistogramma* could then be made up of hundreds of species if we add the numerous species whose taxonomical status has not been molecularly assessed, such as *A. caetei* (Ready et al., 2006). This estimate has no reference value, but may illustrate the limitations of our knowledge regarding the biodiversity of Amazonian fishes (Pitman et al., 2011). Knowledge of aquatic biodiversity patterns is an essential prerequisite for the conservation of freshwater ecosystems, which are the most threatened in the world (Abell, Thieme & Revenga, 2008). This also holds true for the Amazon basin (Nogueira et al., 2010; Castello et al., 2013; Castello & Macedo 2016) and even

1
 2
 3 521 more so for streams (Frederico, Zuanon & De Marco Júnior, 2018), where most *Apistogramma*
 4 522 species live (Römer, 2000, 2006). Freshwater fish are among the most threatened vertebrates in
 5 523 the world (Pimm et al., 2014), which is also likely the case in the Amazon basin owing to habitat
 6 524 degradation or loss and the still limited knowledge about fish ecology (Nogueira et al., 2010;
 7 525 Frederico et al., 2018). Further in depth studies are urgently needed to understand the extent of
 8 526 biodiversity in the many small-bodied, species-rich, yet understudied Amazonian taxa (Barletta
 9 527 et al., 2010), such as *Apistogramma* or other highly diversified cichlid taxa such as *Crenicichla*
 10 528 sp. (Piálek, Řičan, Casciotta, Almirón & Zrzavý, 2012; Rican, Piálek, Dragová & Novák, 2016;
 11 529 Burress et al., 2018) or *Rivulus*. Although the aquarium trade has the advantage of attracting the
 12 530 general public's awareness on these species that often inhabit environments that are almost
 13 531 invisible to the public attention when compared to large rivers (Olden, Hogan & Zanden, 2007;
 14 532 Frederico et al., 2018), it may also imperil their survival by over-harvesting when their
 15 533 distribution or population sizes are limited. During our field trips we often observed
 16 534 recipients/canisters used by fishermen to fish with barbasco, an ichthyotoxic substance naturally
 17 535 found in plants of the genera *Lonchocarpus*, *Paraderis*, and *Tephrosia* (Van Andel, 2000).
 18 536 Barbasco is traditionally used in Amazonia by rural communities to fish, quickly and without
 19 537 specific material, in small streams. The problem is that it kills almost everything in the influence
 20 538 area. Its use appears widespread in the Peruvian Amazon and its consequences on aquatic
 21 539 communities have not been assessed.

22 540 As far as we know, *Apistogramma* Sp3 is endemic to the Nanay, the largest black water
 23 541 river in the Peruvian Amazon (Roldán, 1992; Sioli, 1984; Ortega & Castro, 1998). The Nanay is
 24 542 the most heavily exploited river for the ornamental fish trade owing to its close proximity to the
 25 543 city of Iquitos, where most fish exporters are operating (Tello & Cánepa 1991, Souza, Frias, Vela
 26 544 & Verdi, 2004; Gerstner et al., 2006). This situation puts further pressure on *Apistogramma* Sp3,
 27 545 which currently supports most of the local ornamental fishing for *A. cf. aggassizii*. Our results
 28 546 should foster adapted management actions to take this situation into account, such as the potential
 29 547 setting of quotas or specified licences for extraction/exportation and incentives to reproduce the
 30 548 species and export certified, sustainably bred F1-specimens.

31 549 The ornamental trade probably much less affects *Apistogramma* Sp1 and Sp2. Both
 32 550 species, however, and especially species Sp1, live in forest streams that are highly sensitive to
 33 551 primary effects of deforestation, as previously emphasised in our Jenaro Herrera example, and
 34 552 as well to its secondary effects as shown by Beninde, Römer, Vela Diaz & Duponchelle.
 35 553 (submitted).

554 These different threats will likely further impact the ability of *Apistogramma* species and
 555 other stream fishes to support expected climate-induced changes in water quality and quantity
 556 (Freitas, Siqueira-Souza, Humston & Hurd, 2013; Frederico, Olden & Zuanon, 2016).

558 ACKNOWLEDGEMENTS

559 Guillaín Estivals was supported by a scholarship of the Franco-Peruvian School of Life Sciences.
 560 The authors declare to have no conflict of interest regarding the publication of this article.

562 REFERENCES

- 563
- 564 Abell, R., Thieme, M., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, ...Petry, P. (2008)
 565 Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity
 566 conservation. *BioScience* 58, 403-414
- 567
- 568 Anderson, E.P., Jenkins, C.N., Heilpern, S., Maldonado-Ocampo, J.A., Carvajal-Vallejos, F.M.,
 569 Encalada, A.C., et Tedesco, P.A. (2018). Fragmentation of Andes-to-Amazon connectivity by
 570 hydropower dams. *Science Advances*, 4.
- 571
- 572 Alho, C. J., Reis, R. E., & Aquino, P. P. (2015). Amazonian freshwater habitats experiencing
 573 environmental and socioeconomic threats affecting subsistence fisheries. *Ambio*, 44(5), 412-425.
 574 DOI:10.1007/s13280-014-0610-z.
- 575
- 576 Baker, P. A., & Fritz, S. C. (2015). Nature and causes of Quaternary climate variation of tropical
 577 South America. *Quaternary Science Reviews*, 124, 31-47. doi:10.1016/j.quascirev.2015.06.011.
- 578
- 579 Barletta, M., Jaureguizar, A.J., Baigun, C., Fontoura, N.F., Agostinho, A.A., Almeida-Val,
 580 V.M.F. & Corrêa, M.F.M. (2010). Fish and aquatic habitat conservation in South America: a
 581 continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of Fish Biology*, 76, 2118-
 582 2176.
- 583
- 584 Barthem, R. & Goulding, M. (2007) Un ecosistema inesperado: la Amazonía revelada por la
 585 pesca, Lima, Peru: Museu Paraense Emilio Goeldi, Amazon Conservation Association (ACA).

- 1
2
3 587 Bayley, P.B. & Petrere, M. (1989) Amazon Fisheries: Assessment methods, current status and
4 588 management options. In: D.P. Dodge (Eds.) Proceedings of the International Large River
5 589 Symposium. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*. Honey Harbour,
6 590 Ontario, Canada.
7
8 591
9
10 592 Beeching, S.C. & Hopp, A.B. (1999). Male mate preference and size-assortative pairing in the
11 593 convict cichlid. *Journal of Fish Biology*, 55, 1001-1008.
12 594
13 595 Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (1996-2004) GENETIX 4.05,
14 596 logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations,
15 597 Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
16 598
17 599 Beninde, J., Römer, U., Vela Diaz, A. & Duponchelle, F. (submitted). Changes of water
18 600 temperature caused by deforestation are of major concern for the future of many species of
19 601 *Apistogramma* (Regan, 1913) (Teleostei; Perciformes; Cichlidae; Geophaginae).
20 602
21 603 Bowen, B. W., & J. C. Avise. (1996). *Conservation genetics of marine turtles. In Conservation*
22 604 *genetics: Case histories from nature*, J. C. Avise, and J. L. Hamrick (eds), Chap. 7. New York:
23 605 Chapman and Hall.
24 606
25 607 Briscoe D. A. & Tait N. N. (1995). Allozyme evidence for extensive and ancient radiations in
26 608 Australian Onychophora. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 7 (14), 91-102.
27 609
28 610 Britzke, R. (2015) Relações filogenéticas do gênero *Apistogramma* (Teleostei, Cichlidae) e
29 611 filogeografia da espécie *Apistogramma agassizi*. 187 f. (PhD thesis). Universidade Estadual
30 612 Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu.
31 613
32 614 Britzke, R., Oliveira, C. & Kullander, S.O. (2014). *Apistogramma ortegai* (Teleostei: Cichlidae),
33 615 a new species of cichlid fish from the Ampiyacu River in the Peruvian Amazon basin. *Zootaxa*,
34 616 3869, 409-419.
35 617
36 618 Burress, E.D., Piálek, L., Casciotta, J.R., Almirón, A., Tan, M., Armbruster, J.W. & Říčan, O.
37 619 (2018). Island- and lake-like parallel adaptive radiations replicated in rivers. *Proceedings of the*
38 620 *Royal Society B: Biological Sciences*, 285.

- 621
- 622 Burnham, K. P. & Anderson, D. R. (2016). Multimodel Inference. *Sociological Methods &*
 623 *Research*, 33(2), 261-304. DOI:10.1177/0049124104268644.
- 624
- 625 Castello, L., Arantes, C.C., McGrath, D.G., Stewart, D.J. & Sousa, F.S.D. (2015). Understanding
 626 fishing-induced extinctions in the Amazon. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater*
 627 *Ecosystems*, 25, 587-598.
- 628
- 629 Castello, L. & Macedo, M.N. (2016). Large-scale degradation of Amazonian freshwater
 630 ecosystems. *Global Change Biology*, 22, 990-1007.
- 631
- 632 Castello, L., McGrath, D.G., Hess, L.L., Coe, M.T., Lefebvre, P.A., Petry, P., ... Arantes, C.C.
 633 (2013). The vulnerability of Amazon freshwater ecosystems. *Conservation Letters*, 6, 217-229.
- 634
- 635 Chanseau, M., Bosc, S., Galiay, E., & Oules, G. (2002). L'utilisation De L'huile De Clou De
 636 Girofle Comme Anesthésique Pour Les Smolts De Saumon Atlantique (*Salmo Salar* L.) Et
 637 Comparaison De Ses Effets Avec Ceux Du 2-Phenoxyethanol. *Bulletin Français de la Pêche et*
 638 *de la Pisciculture* (pp. 365-366), 579-589. DOI:10.1051/kmae:2002054.
- 639
- 640 Couldridge, V.C.K. & Alexander, G.J. (2001). Does the time spent near a male predict female
 641 mate choice in a Malawian Cichlid? *Journal of Fish Biology*, 59, 667-672.
- 642
- 643 Couldridge, V.C.K. & Alexander, G.J. (2002). Color patterns and species recognition in four
 644 closely related species of Lake Malawi. *Behavioral Ecology*, 13, 59-64.
- 645
- 646 Cracraft, J. (1989) Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species
 647 concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: Otte, D. and Endler, J.A.
 648 (Eds.). *Speciation and Its Consequences* (pp. 25-59). Sinauer, Sunderland.
- 649
- 650 Crampton, W. G. R. (1999). Plano de manejo para o uso sustentável de peixes ornamentais na
 651 Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. In: Queiroz, H. L. & W. G. R. Crampton
 652 (Eds.). *Estratégias para Manejo de Recursos Pesqueiros em Mamirauá* (pp. 208). Brasília.
 653 Sociedade Civil Mamirauá/MCT, CNPq.
- 654

- 1
2
3 655 Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolement procedure for small quantities of fresh
4 656 leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
5
6 657
7
8 658 DiBattista, J. D., Berumen, M. L., Gaither, M. R., Rocha, L. A., Eble, J. A., Choat, J. H. &
9 659 McClain, C. (2013). After continents divide: comparative phylogeography of reef fishes from the
10 660 Red Sea and Indian Ocean. *Journal of Biogeography*, 40, 1170-1181. DOI:10.1111/jbi.12068.
11
12 661
13
14 662 Dumont, J.F., Lamotte, S. & Fournier, M. (1988). Neotectonica del arco de Iquitos (Jenaro
15 663 Herrera, Peru). *Boletín de la Sociedad Geológica del Perú*, 7-17.
16
17 664
18
19 665 Dumont, J.-F. & García, F. (1989). Pleistocene deposits in Amazonian Peru: are lithological
20 666 characteristics related to glacial interstages? Proceeding of the IGCP meeting, La Paz.
21
22 667
23
24 668 Dumont, J. F., Lamotte, S. & Kahn, F., (1990). Wetland and upland forest ecosystems in Peruvian
25 669 Amazonia_ plant species diversity in the light of some geological and botanical evidence.
26 670 *Elsevier Science*, 125-139.
27
28 671
29
30 672 Dumont, J. F., Deza, E. & García, F. (1991). Morphostructural provinces and neotectonics in the
31 673 Amazonian lowlands of Peru. *Journal of South American Earth Sciences*, 4, 373-381.
32
33 674
34
35 675 Dumont, J. F.(1991). Cambio del curso de los ríos Marañón y Ucayali en la depresión Ucamara
36 676 durante el Cuaternario reciente. VII Congreso Peruano de Geología, Lima.
37
38 677
39
40 678 Dumont, J. F. (1992). Rasgos morfoestructurales de la llanura amazónica del Perú_ efecto de la
41 679 neotectónica sobre los cambios fluviales y la delimitación de las provincias morfológicas.
42 680 *Bulletin de l'Institut français d'études andines*, 21, 801-833.
43
44 681
45
46 682 Finer, M., Jenkins, C. N., Pimm, S. L., Keane, B., & Ross, C. (2008). Oil and gas projects in the
47 683 Western Amazon: threats to wilderness, biodiversity, and indigenous peoples. *PLOS ONE*, 3(8),
48 684 e2932. DOI:10.1371/journal.pone.0002932.
49
50 685
51
52 686 Finer, M. & Jenkins, C.N. (2012). Proliferation of hydroelectric dams in the Andean Amazon
53 687 and implications for Andes-Amazon connectivity. *PLOS ONE*, 7, e35126.
54
55 688
56
57
58
59
60

- 1
2
3 689 Frederico, R., Zuanon, J. & De Marco Júnior, P. (2018) Amazon protected areas and its ability
4 690 to protect stream-dwelling fish fauna. *Biological Conservation*, 219, DOI:
5 691 10.1016/j.biocon.2017.12.032.
6
7 692
8
9 693 Frederico, R.G., Olden, J.D. & Zuanon, J. (2016). Climate change sensitivity of threatened, and
10 694 largely unprotected, Amazonian fishes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater*
11 695 *Ecosystems*, 26, 91-102.
12
13 696
14 697 Freitas, C.E.C., Siqueira-Souza, F.K., Humston, R. & Hurd, L.E. (2013). An initial assessment
15 698 of drought sensitivity in Amazonian fish communities. *Hydrobiologia*, 705, 159-171.
16 699
17 700 Forsberg, B.R., Melack, J.M., Dunne, T., Barthem, R.B., Goulding, M., Paiva, R.C.D., ...
18 701 Weisser, S. (2017). The potential impact of new Andean dams on Amazon fluvial ecosystems.
19 702 *PLOS ONE*, 12, e0182254.
20 703
21
22 704 Frankham, R., Ballou, J. D. & Briscoe, D.A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*.
23 705 Cambridge University Press.
24 706
25 707 Genner, M. J., Seehausen, O., Lunt, D. H., Joyce, D. A., Shaw, P. W., Carvalho, G. R., & Turner,
26 708 G. F. (2007). Age of cichlids: new dates for ancient lake fish radiations. *Molecular Biology and*
27 709 *Evolution*, 24(5), 1269-1282. DOI:10.1093/molbev/msm050.
28 710
29 711 Gerstner, C. L. O., H.; Sanchez, H., et, & Graham D. L. (2006). Effects of the freshwater
30 712 aquarium trade on wild fish populations in differentially-fished areas of the Peruvian Amazon.
31 713 *Journal of Fish Biology*, 68, 862-875. DOI:10.1111/j.1095-649.2006.00978.x.
32 714
33 715 Gonçalves Júnior, E. S., Soares, E. A. A., Tatumi, S. H., Yee, M., & Mittani, J. C. R. (2016).
34 716 Pleistocene-Holocene sedimentation of Solimões-Amazon fluvial system between the tributaries
35 717 Negro and Madeira, Central Amazon. *Brazilian Journal of Geology*, 46(2), 167-180.
36 718 DOI:10.1590/2317-4889201620160009.
37 719
38 720 Goudet, J., (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *The*
39 721 *Journal of Heredity*, 485-486.
40 722

- 1
2
3 723 Grabert, H. (1991). Der Amazonas: Geschichte und Probleme eines Stromgebietes zwischen
4 724 Pazifik und Atlantik. *Springer-Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio,
5 725 Hong Kong.
6
7 726
8
9 727 Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165, 131-137.
10 728
11
12 729 Hennig, W. (1966). *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
13 730
14
15 731 Houghton, R. A., Skole, D. L., Nobre, C. A., Hackler, J. L., Lawrence, K. T. & Chomentowski,
16 732 W H. (2000). Annual fluxes of carbon from deforestation and regrowth in the Brazilian Amazon.
17 733 *Nature*, 403, 301-304.
18
19 734
20
21 735 Hubert, N., & Renno, J.-F. (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes.
22 736 *Journal of Biogeography*, 33(8), 1414-1436. DOI:10.1111/j.1365-2699.2006.01518.x
23 737
24
25 738 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2017) normativa
26 739 interministerial n°01/2012, [https://www.ibama.gov.br/component/phocadownload/file/2331-](https://www.ibama.gov.br/component/phocadownload/file/2331-instrucao-normativa-interministerial-n-01-2012)
27 740 [instrucao-normativa-interministerial-n-01-2012](https://www.ibama.gov.br/component/phocadownload/file/2331-instrucao-normativa-interministerial-n-01-2012).
28 741
29
30 742 Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers.
31 743 *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405. DOI:10.1093/bioinformatics/btn129.
32 744
33
34 745 Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components:
35 746 a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11, 94.
36 747 doi:10.1186/1471-2156-11-94.
37 748
38
39 749 Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S. & Drummond, A.
40 750 (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the
41 751 organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
42 752 DOI:10.1093/bioinformatics/bts199.
43 753
44
45 754 Kingston, P. F. (2002). Long-term Environmental Impact of oil spills. *Spill Science &*
46 755 *Technology Bulletin*, 7, 53-61.
47 756

- 1
2
3 757 Koslowski, I. (2002). *Die Buntbarsche Amerikas Band 2 Apistogramma & Co.* Ulmer, Stuttgart.
4
5 758
6
7 759 Kullander, S.O. (1986). *Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru*. Swedish Museum
8 760 of Natural History, Stockholm.
9
10 761
11
12 762 Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular
13 763 Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*,
14 764 35(6), 1547-1549. DOI:10.1093/molbev/msy096.
15
16 765
17
18 766 Latini, A.O. & Petrere, M.J. (2004). Reduction of native fish fauna by alien species: an example
19 767 from Brazilian freshwater tropical lakes. *Fisheries Management and Ecology*, 11, 71-79.
20
21 768
22
23 769 Mallet, J. (1995) A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology & Evolution*.
24 770 10, 294-299.
25
26 771
27
28 772 Mayden, R.L. & Wood, R.M. (1995) Systematics, species concepts and the evolutionarily
29 773 significant unit in biodiversity and conservation biology. *American Fisheries Society Symposium*.
30 774 17, 58-113.
31
32 775
33
34 776 Mayr, E. (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Harvard University Press, Cambridge,
35 777 MA.
36
37 778
38
39 779 Mesa, S. L. M. & Lasso, C. A. (2011). Revisión del género *Apistogramma* Regan, 1913
40 780 (Perciformes, Cichlidae) en la cuenca del río Orinoco (Eds.). *Recursos Hidrobiológicos y*
41 781 *Pesqueros Continentales de Colombia III* (pp.194). Instituto Humboldt. Bogotá, Colombia.
42
43 782
44
45 783 Miya, M., et Nishida, M. (2000). Use of mitogenomic information in teleostean molecular
46 784 phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion.
47 785 *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17(3), 437-455. DOI:10.1006/mpev.2000.0839.
48
49 786
50
51 787 Moreau, M.-A., & Coomes, O. T. (2007). Aquarium fish exploitation in western Amazonia:
52 788 conservation issues in Peru. *Environmental Conservation*, 34(01), 12.
53 789 DOI:10.1017/s0376892907003566.
54
55 790
56
57
58
59
60

- 1
2
3 791 Morton, D. C., DeFries, R. S., Shimabukuro, Y. E., Anderson, L. O., Arai, E., del Bon Espirito-
4 792 Santo, F. & Morisette, J. (2006). Cropland expansion changes deforestation dynamics in the
5 793 southern Brazilian Amazon. *PNAS*, 103(39), 14637-14641. DOI:10.1073/pnas.0606377103.
6
7 794
8
9 795 Nei, M. & Chesser, R. K. (1983). Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of*
10 796 *Human Genetics*, 47, 253-259. DOI:10.1111/j.1469-1809.1983.tb00993.x
11
12 797
13
14 798 Nogueira, C., Buckup, P.A., Menezes, N.A., Oyakawa, O.T., Kasecker, T.P., Ramos Neto, M.B.
15 799 & da Silva, J.M.C. (2010). Restricted-range fishes and the conservation of Brazilian freshwaters.
16
17 800 *PLOS ONE*, 5, e11390.
18
19 801
20
21 802 Odhiambo, E. A., Mautner, S. I., Bock, O., & Sturmbauer, C. (2012). Genetic distinction of four
22 803 haplochromine cichlid fish species in a satellite lake of Lake Victoria, East Africa. *Journal of*
23 804 *Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 50(1), 51-58. DOI:10.1111/j.1439-
24 805 0469.2011.00641.x
25
26 806
27
28 807 Olden, J.D., Hogan, Z.S. & Zanden, M.J.V. (2007). Small fish, big fish, red fish, blue fish: size-
29 808 biased extinction risk of the world's freshwater and marine fishes. *Global Ecology and*
30 809 *Biogeography*, 16, 694-701.
31
32 810
33
34 811 Olivier, K. (2001). The Ornamental Fish Market. FAO/Globefish, *United Nations Food and*
35 812 *Agriculture Organisation*, Research Programme 67.
36
37 813
38
39 814 Ortega H. & Castro, E., (1998). Hidrobiología de la Cuenca del Río Nanay. *Evaluación de la*
40 815 *Ictiofauna, Diagnostico de la Pesquería y Propuesta de Manejo de los Recursos Hidrobiológicos*
41 816 (pp 60). CEDIA. Lima, Perú.
42
43 817
44
45 818 Piálek, L., Řičan, O., Casciotta, J., Almirón, A. & Zrzavý, J. (2012). Multilocus phylogeny of
46 819 *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae), with biogeography of the *C. lacustris* group: Species flocks
47 820 as a model for sympatric speciation in rivers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 46-61.
48
49 821
50
51 822 Pimm, S.L., Jenkins, C.N., Abell, R., Brooks, T.M., Gittleman, J.L., Joppa, L.N., ... Sexton, J.O.
52 823 (2014). The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection.
53 824 *Science*, 344, 1246752.
54
55
56
57
58
59
60

- 825
- 826 Pitman, N. C. A., Widmer, J., Jenkins, C. N., Stocks, G., Seales, L., Paniagua, F., & Bruna, E.
- 827 M. (2011). Volume and Geographical Distribution of Ecological Research in the Andes and the
- 828 Amazon, 1995–2008. *Tropical Conservation Science*, 4(1), 64-81.
- 829 DOI:10.1177/194008291100400107.
- 830
- 831 Pritchard, J.K.; Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using
- 832 multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2), 945-959.
- 833
- 834 Quéroutil, S., Vela Diaz, A., García-Dávila, C., Römer, U., & Renno, J. F. (2015). Development
- 835 and characterization of polymorphic microsatellite markers in neotropical fish of the genus
- 836 *Apistogramma* (Perciformes: Labroidae: Cichlidae). *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 52-56.
- 837 DOI:10.1111/jai.12975.
- 838
- 839 RADAMBRESIL (1977)- Levantamento de recursos naturais. Folha SB.I9 JURUA., Ministerio
- 840 das Minas e Energia, Projeto Radambresil.
- 841
- 842 Ramos Sato, L. R. (2007). Estudo das relações filogenéticas de Trichomycteridae (Teleostei,
- 843 Siluriformes) com base em evidências cromossômicas e moleculares (PhD thesis). Universidade
- 844 Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Brazil.
- 845
- 846 Räsänen, M. E., Salo, J. S. & Kalliola, R. J., (1987). Fluvial Perturbance in the Western Amazon
- 847 Basin Regulation by Long-Term Sub-Andean Tectonics. *Science*, 238.
- 848
- 849 Räsänen, M., Linna, A., Irion, G., Rebata Hernani, L., Vargas Huaman, R., & Wesselingh, F.
- 850 (1998) Geología y geoformas de la zona de Iquitos. En: Kalliola, R. & Flores, S. (eds.),
- 851 *Geoecología y desarrollo amazónico: estudio integrado en la zona de Iquitos* (pp. 59-137), Perú.
- 852 Turun, Turku, Annales Universitatis Turkuensis.
- 853
- 854 Ready JS, Sampaio I, Schneider H, Vinson C & Dos Santos T.(2006). Colour forms of
- 855 Amazonian cichlid fish represent reproductively isolated species. *Journal of Evolutionary*
- 856 *Biology*, 19: 1139 -1148. DOI:10.1111/j. 1420-9101.2006.01088.x.
- 857

- 1
2
3 858 Reis, R. E., Albert, J. S., Di Dario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., & Rocha, L. A. (2016). Fish
4 859 biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, 89(1), 12-47.
5 860 DOI:10.1111/jfb.13016.
6 861
7 862 Řičan, O., Piálek, L., Dragová, K. & Novák, J. (2016). Diversity and evolution of the Middle
8 863 American cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) with revised classification. *Vertebrate Zoology*,
9 864 66, 1-102.
10 865
11 866 Rocha-Olivares, A., Fleeger, J. W., & Foltz, D. W. (2001). Decoupling of molecular and
12 867 morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic harpacticoid copepod. *Molecular*
13 868 *Biology and Evolution*, 18(6), 1088-1102. DOI:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003880.
14 869
15 870 Roldán G. (1992). Fundamentos de Limnología Neotropical (pp. 529). *Editorial Universidad de*
16 871 *Antioquia*, Colombia.
17 872
18 873 Römer, U. (1992). Weitere Beobachtungen zur Verbreitung, Ökologie und Aquarienbiologie von
19 874 Laetacara spec. "Orangenflossen". *DCG-Informationen*, 23, 74-83.
20 875
21 876 Römer, U. (1993). Freilandbeobachtungen an *Apistogramma diplotaenia* Kullander, 1987.
22 877 *Buntbarschjahrbuch* (pp. 58-71), bede, Kollnburg.
23 878
24 879 Römer U. (1995). Kritische Bemerkungen über Angaben zu Beständen und
25 880 Bestandsentwicklungen von neotropischen Kleinfischen am Beispiel von *Apistogramma*
26 881 *mendezi* und *Paracheirodon*. In Sioli H, editor. Reports of the Workshop and Exhibition
27 882 "Gefährdete Süßwasserfische tropischer Ökosysteme", Zoologisches Forschungsinstitut und
28 883 Museum Alexander Koenig, Bonn, Germany.
29 884
30 885 Römer U., (2000) *Cichlid Atlas*. Volume 1. Melle: Mergus Verlag.
31 886
32 887 Römer U., (2006) *Cichlid Atlas*. Volume 2. Melle: Mergus Verlag.
33 888
34 889 Römer, U. & Beisenherz, W. (2005). Intra- and interspecific male choice of female
35 890 *Apistogramma cacatuoides* (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*,
36 891 16 (4), 339-345.

- 1
2
3
4 892
5 893 Römer, U., Beninde, J., Duponchelle, F., Vela Díaz, A., Ortega, H., Hahn, I., Soares, D. P., Díaz
6 894 Cachay, C., García Dávila, C. R., Sirvas Cornejo, S. & Renno, J. F. (2012). Description of
7 895 *Apistogramma allpahuayo* sp. n., a new dwarf cichlid species from in and around the Reserva
8 896 Nacional Allpahuayo Mishana, Loreto, Peru. *Vertebrate Zoology*, 62 (2), 189-212.
9 897
10 898 Römer, U., Duponchelle, F., Vela Díaz, A., García Davilla, C. R., Sirvas, S., Díaz Catchay, C.,
11 899 & Renno, J. F., (2011). *Apistogramma cinilabra* sp. n. Description of a potentially endangered
12 900 endemic cichlid species (Teleostei Perciformes Cichlidae) from the Departamento Loreto, Peru.
13 901 *Vertebrate Zoology*, 61 (1), 3-23.
14 902
15 903 Römer, U., Engelking, B. & Beisenherz, W. (2014). Genetically determined mate choice can be
16 904 influenced by learning in *Apistogramma cacatuoides* Hoedeman, 1951 (Teleostei, Cichlidae).
17 905 *Vertebrate Zoology*, 64(2), 199-206.
18 906
19 907 Römer, U. & Hahn, I., (2008). *Apistogramma barlowi* sp. n.: Description of a new facultative
20 908 mouth-breeding cichlid species (Teleostei: Perciformes: Geophaginae) from Northern Peru.
21 909 *Vertebrate Zoology*, 58(1), 49-66.
22 910
23 911 Römer, U. & Hahn, I., (2013). *Apistogramma aguarico* sp. n.: A new species of geophagine
24 912 cichlid fish (Teleostei: Perciformes) from the Ecuadorian and Peruvian río Napo system.
25 913 *Vertebrate Zoology*, 63(1), 171-181.
26 914
27 915 Römer, U., Römer, C. I., Estivals, G., Vela Díaz, A., Duponchelle, F., García Dávila, C. R., Hahn,
28 916 I. & Renno, J. F., (2017). Description of a new maternal larvophilic mouth-brooding cichlid
29 917 species, *Apistogramma megastoma* sp. n. (Teleostei Perciformes Geophaginae), from Loreto,
30 918 Peru. *Vertebrate Zoology*, 67(2), 151-171.
31 919
32 920 Römer, U., Soares, D. P., García Dávila, C. R., Duponchelle, F., Renno, J. F. & Hahn, I., (2015).
33 921 Re-description of *Apistogramma payaminonis* Kullander, 1986, with descriptions of two new
34 922 cichlid species of the genus *Apistogramma*. *Vertebrate Zoology*, 65(3), 287-314.
35 923
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
- 2
- 3 924 Römer U. & Wise, M. (2006). Nominal list of known species and local morphs of the genus
- 4 925 Apistogramma (Regan) imported until August 2005. in Römer, (Eds.). *Cichlid Atlas. Volume 2*
- 5 926 (pp. 378-390). Mergus publishers, Melle.
- 6 927
- 7 928 Rousset, F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under
- 8 929 isolation by distance. *Genetics*, 145(4), 1219-1228.
- 9 930
- 10 931 Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-
- 11 932 Onsins, S. E., & Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis
- 12 933 of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302.
- 13 934 DOI:10.1093/molbev/msx248.
- 14 935
- 15 936 Schindler, I. & Staack, W., (2013). Description of Apistogramma helkeri sp. n., a new
- 16 937 geophagine dwarf cichlid (Teleostei Cichlidae) from the lower río Cuao (Orinoco drainage) in
- 17 938 Venezuela. *Vertebrate Zoology*, 63(3), 301-306.
- 18 939
- 19 940 Sébrier, M., J. L. Mercier, F. Mégard, G. Laubacher, & E. Carey-Gailhardis (1985), Quaternary
- 20 941 normal and reverse faulting and the state of stress in the central Andes of south Peru, *Tectonics*,
- 21 942 4(7), 739–780 DOI:10.1029/TC004i007p00739ss.
- 22 943
- 23 944 Sick, H. (1993). *Birds in Brazil: a natural history*. Princeton University Press, Princeton &
- 24 945 Chichester.
- 25 946
- 26 947 Sioli H. (1984). *The Amazon, Limnology and landscape ecology of a mighty river and its basin*
- 27 948 (pp.763). Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht Netherlands and Boston and Hingham, MA, USA.
- 28 949
- 29 950 Souza J., Frias, A., Vela, U. & Verdi, L. (2004). *Principales hábitats para la captura de peces*
- 30 951 *ornamentales en los ríos Nanay y Ucayali* (pp. 296-299). Memorias: VI Congreso Internacional
- 31 952 de Manejo de Fauna silvestre en Amazonia y Latinoamérica. Iquitos. Perú.
- 32 953
- 33 954 Swenson, J. J., Carter, C. E., Domec, J. C., & Delgado, C. I. (2011). Gold mining in the Peruvian
- 34 955 Amazon: global prices, deforestation, and mercury imports. *PLOS ONE*, 6(4), e18875.
- 35 956 DOI:10.1371/journal.pone.0018875
- 36 957

- 958 Tello S. & J. Cánepa. (1991). Estado actual de la explotación de los principales peces
959 ornamentales de la Amazonía Peruana. *Folia Amazónica*, 3, 107-128.
- 960
- 961 Tougard, C., Garcia Davila, C. R., Romer, U., Duponchelle, F., Cerqueira, F., Paradis, E. &
962 Renno, J. F. (2017). Tempo and rates of diversification in the South American cichlid genus
963 *Apistogramma* (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *PLOS ONE*, 12(9), e0182618.
964 DOI:10.1371/journal.pone.0182618.
- 965
- 966 Van Andel, T. (2000). The diverse uses of fish-poison plants in Northwest Guyana. *Economic*
967 *Botany*, 54(4), 500-512.
- 968
- 969 Vitule, J.R.S., Freire, C.A. & Simberloff, D. (2009). Introduction of non-native freshwater fish
970 can certainly be bad. *Fish and Fisheries*, 10, 98-108.
- 971
- 972 Vitule, J.R.S., da Costa, A.P.L., Frehse, F.A., Bezerra, L.A.V., Occhi, T.V.T., Daga, V.S. &
973 Padial, A.A. (2017). Comment on 'Fish biodiversity and conservation in South America by Reis
974 et al. (2016)'. *Journal of Fish Biology*, 90, 1182-1190.
- 975
- 976 Wallace, A. R. (1854). On the monkeys of the Amazon. *Journal of Natural History*, 14(84), 451-
977 454.
- 978
- 979 Waples, R. S. (1986). A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes.
980 *Evolution*, 41 (2), 385-400.
- 981
- 982 Ward, R. D., Woodward, M. & Skibinski, D. O. F., (1993). A comparison of genetic diversity
983 levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44, 213-232.
- 984
- 985 Weir, B. S., & Cockerham, C. C., (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population
986 Structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
- 987
- 988 Wesselingh, F.P. & Salo, J. A., (2006). A Miocene perspective on the evolution of Amazonian
989 biota. *Scripta Geologica*, 133, 439-458.

TABLES

Table 1: Genetic diversity indices in *Apistogramma agassizii* popsite based on 10 microsatellite loci. N, samples size; TNA, total number of alleles; MNA, mean number of alleles; AR, allelic richness; NPA, number of private alleles; Hobs., observed heterozygosity; Hexp., expected heterozygosity; Hn.b., expected heterozygosity without bias; FIS, inbreeding coefficient of cluster; * = p -value < 0.050.

Popsite	N	TNA	Allelic Diversity			Genetic diversity			
			MNA	AR	NPA	H exp.	H n.b.	H obs.	Fis
JH3	48	140	14.0	9.512	6	0.754	0.762	0.708	0.072*
An	35	138	13.8	9.818	19	0.754	0.765	0.762	0.003
JH4	39	132	13.2	9.537	1	0.749	0.758	0.761	-0.003
JH5	36	130	13.0	9.349	2	0.739	0.749	0.737	0.017
Or8	30	101	10.1	7.904	4	0.710	0.722	0.654	0.096*
Or9	30	98	9.8	7.738	2	0.707	0.719	0.747	-0.040
Ya3	24	92	9.2	8.147	2	0.715	0.730	0.729	0.001
JH7	29	88	8.8	7.146	4	0.644	0.655	0.682	-0.042
JH17	39	88	8.8	6.803	3	0.686	0.695	0.690	0.007
JH10	30	83	8.3	7.259	1	0.706	0.718	0.703	0.021
JH13	52	79	7.9	6.015	2	0.681	0.688	0.650	0.055*
Or4	30	78	7.8	6.337	3	0.588	0.598	0.600	-0.004
Ya2	23	77	7.7	6.991	1	0.694	0.709	0.735	-0.037
Or5	30	75	7.5	6.115	1	0.537	0.547	0.514	0.061
JH2	48	74	7.4	5.738	2	0.636	0.643	0.581	0.096*
JH9	77	74	7.4	6.091	1	0.658	0.662	0.657	0.007
Or3	30	73	7.3	5.910	2	0.555	0.564	0.560	0.007
Or2	30	71	7.1	5.559	0	0.496	0.504	0.493	0.022
Or1	30	66	6.6	5.482	4	0.531	0.540	0.557	-0.032
JH11	30	63	6.3	5.524	0	0.655	0.667	0.621	0.069*
Pe4	27	60	6.0	5.198	5	0.488	0.497	0.500	-0.006
JH16	32	58	5.8	5.166	0	0.632	0.642	0.578	0.101*
JH19	38	56	5.6	4.908	0	0.618	0.627	0.657	-0.050
JH15	26	55	5.5	5.168	0	0.650	0.663	0.700	-0.058
Na2	24	55	5.5	4.675	0	0.391	0.399	0.425	-0.067
JH20	39	53	5.3	4.567	1	0.549	0.556	0.536	0.036
JH14	28	50	5.0	4.647	0	0.613	0.624	0.539	0.138*
PU16	30	48	4.8	4.144	3	0.410	0.417	0.430	-0.032
Na1	24	47	4.7	4.164	0	0.391	0.399	0.408	-0.023
JH18	40	45	4.5	4.184	0	0.611	0.618	0.605	0.022
JH8	30	42	4.2	3.963	0	0.564	0.574	0.563	0.019
JH12	16	37	3.7	3.700	0	0.544	0.562	0.613	-0.093
Na3	22	34	3.4	3.253	0	0.425	0.435	0.436	-0.004
PU5A	25	32	3.2	3.028	1	0.358	0.365	0.364	0.003
Or7	30	24	2.4	2.317	1	0.350	0.356	0.387	-0.089

Table 2: Alleles frequencies > 0.5 for at least one of the three clusters.

Locus	Allele	Frequencies ≥ 0.5		
		Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
Loc01	100	-----	0.5049	0.9182
Loc06	138	0.0628	0.6014	-----
Loc06	144	0.0006	0.0048	0.5648
Loc08	138	0.1195	0.0558	0.7909
Loc09	129	0.5209	0.1293	-----
Loc09	131	0.2863	0.6024	-----
Loc11	123	0.7099	-----	-----
Loc11	127	0.0655	0.5145	-----
Loc11	137	0.0040	0.0942	0.5833
Loc14	116	0.0074	0.7937	-----
Loc16	142	0.2649	0.9082	0.9364
Loc16	144	0.5676	0.0024	0.0455
Loc28	196	0.1020	-----	0.9727
Loc28	200	0.0353	0.5631	-----
Loc30	187	0.0045	0.0048	0.8364
Loc32	201	0.2035	-----	0.6636
Loc32	203	0.5609	-----	0.3091
Loc32	209	0.0023	0.6401	0.0273

Cluster 1 is composed of popsites JH2, JH3, JH4, JH5, JH7, JH8, JH9, JH10, JH11, JH12, JH13, JH14, JH15, JH16, JH17, JH18, JH19, JH20, An, Ya2, Ya3, Na1, Na2, Na3, Or8, Or9; Cluster 2 of popsites Pe4, Or1, Or2, Or3, Or4, Or5, Or7, and Cluster 3 of popsites PU5A, PU1

Table 3. Pairwise value of FST estimator of Weir & Cockerham (1984) between 26 popsites from cluster 1.

	JH3	JH4	JH5	JH7	JH8	JH9	JH10	JH11	JH12	JH13	JH14	JH15	JH16	JH17	JH18	JH19	JH20	An	Ya2	Ya3	Na1	Na2	Na3	Or8	Or9
JH2	0.08	0.07	0.08	0.07	0.16	0.14	0.08	0.12	0.22	0.12	0.12	0.15	0.14	0.14	0.14	0.18	0.16	0.13	0.16	0.11	0.24	0.24	0.21	0.17	0.18
JH3	-----	0.00	0.00	0.05	0.11	0.08	0.03	0.06	0.13	0.07	0.11	0.08	0.08	0.06	0.09	0.10	0.12	0.06	0.07	0.05	0.19	0.18	0.16	0.08	0.09
JH4	0.00	-----	0.00	0.05	0.12	0.09	0.03	0.06	0.15	0.08	0.11	0.08	0.09	0.07	0.09	0.11	0.11	0.07	0.08	0.05	0.19	0.19	0.17	0.10	0.11
JH5	0.00	0.00	-----	0.05	0.12	0.10	0.04	0.08	0.14	0.07	0.11	0.08	0.09	0.07	0.10	0.11	0.12	0.07	0.08	0.05	0.20	0.20	0.18	0.09	0.10
JH7	0.05	0.05	0.05	-----	0.18	0.08	0.06	0.09	0.20	0.11	0.15	0.10	0.12	0.10	0.15	0.16	0.17	0.09	0.12	0.08	0.18	0.17	0.15	0.11	0.13
JH8	0.11	0.12	0.12	0.18	-----	0.20	0.14	0.19	0.17	0.13	0.21	0.18	0.18	0.18	0.05	0.19	0.10	0.20	0.20	0.18	0.32	0.32	0.32	0.21	0.21
JH9	0.08	0.09	0.10	0.08	0.20	-----	0.05	0.07	0.22	0.14	0.20	0.13	0.15	0.13	0.17	0.18	0.21	0.13	0.14	0.13	0.18	0.18	0.18	0.12	0.15
JH10	0.03	0.03	0.04	0.06	0.14	0.05	-----	0.05	0.16	0.09	0.13	0.10	0.09	0.09	0.12	0.12	0.14	0.10	0.12	0.09	0.20	0.20	0.19	0.12	0.13
JH11	0.06	0.06	0.08	0.09	0.19	0.07	0.05	-----	0.20	0.12	0.19	0.13	0.12	0.13	0.16	0.15	0.21	0.11	0.13	0.11	0.21	0.21	0.20	0.15	0.16
JH12	0.13	0.15	0.14	0.20	0.17	0.22	0.16	0.20	-----	0.09	0.24	0.18	0.18	0.22	0.16	0.18	0.21	0.20	0.24	0.21	0.35	0.34	0.36	0.21	0.22
JH13	0.07	0.08	0.07	0.11	0.13	0.14	0.09	0.12	0.09	-----	0.16	0.12	0.14	0.13	0.10	0.17	0.13	0.12	0.15	0.11	0.25	0.25	0.22	0.15	0.15
JH14	0.11	0.11	0.11	0.15	0.21	0.20	0.13	0.19	0.24	0.16	-----	0.17	0.13	0.15	0.17	0.16	0.19	0.14	0.16	0.13	0.30	0.29	0.26	0.18	0.22
JH15	0.08	0.08	0.08	0.10	0.18	0.13	0.10	0.13	0.18	0.12	0.17	-----	0.09	0.12	0.13	0.11	0.19	0.13	0.14	0.11	0.25	0.24	0.23	0.15	0.16
JH16	0.08	0.09	0.09	0.12	0.18	0.15	0.09	0.12	0.18	0.14	0.13	0.09	-----	0.15	0.16	0.05	0.19	0.14	0.16	0.14	0.27	0.26	0.27	0.18	0.19
JH17	0.06	0.07	0.07	0.10	0.18	0.13	0.09	0.13	0.22	0.13	0.15	0.12	0.15	-----	0.14	0.18	0.15	0.10	0.07	0.08	0.24	0.24	0.22	0.12	0.14
JH18	0.09	0.09	0.10	0.15	0.05	0.17	0.12	0.16	0.16	0.10	0.17	0.13	0.16	0.14	-----	0.17	0.08	0.16	0.14	0.13	0.28	0.27	0.27	0.18	0.20
JH19	0.10	0.11	0.11	0.16	0.19	0.18	0.12	0.15	0.18	0.17	0.16	0.11	0.05	0.18	0.17	-----	0.22	0.17	0.18	0.16	0.30	0.29	0.30	0.19	0.20
JH20	0.12	0.11	0.12	0.17	0.10	0.21	0.14	0.21	0.21	0.13	0.19	0.19	0.19	0.15	0.08	0.22	-----	0.18	0.20	0.18	0.35	0.34	0.33	0.23	0.24
An	0.06	0.07	0.07	0.09	0.20	0.13	0.10	0.11	0.20	0.12	0.14	0.13	0.14	0.10	0.16	0.17	0.18	-----	0.11	0.08	0.24	0.23	0.20	0.10	0.12
Ya2	0.07	0.08	0.08	0.12	0.20	0.14	0.12	0.13	0.24	0.15	0.16	0.14	0.16	0.07	0.14	0.18	0.20	0.11	-----	0.04	0.28	0.27	0.25	0.10	0.13
Ya3	0.05	0.05	0.05	0.08	0.18	0.13	0.09	0.11	0.21	0.11	0.13	0.11	0.14	0.08	0.13	0.16	0.18	0.08	0.04	-----	0.26	0.25	0.21	0.08	0.10
Na1	0.19	0.19	0.20	0.18	0.32	0.18	0.20	0.21	0.35	0.25	0.30	0.25	0.27	0.24	0.28	0.30	0.35	0.24	0.28	0.26	-----	0.00	0.16	0.24	0.26
Na2	0.18	0.19	0.20	0.17	0.32	0.18	0.20	0.21	0.34	0.25	0.29	0.24	0.26	0.24	0.27	0.29	0.34	0.23	0.27	0.25	0.00	-----	0.15	0.23	0.26
Na3	0.16	0.17	0.18	0.15	0.32	0.18	0.19	0.20	0.36	0.22	0.26	0.23	0.27	0.22	0.27	0.30	0.33	0.20	0.25	0.21	0.16	0.15	-----	0.22	0.25
Or8	0.08	0.10	0.09	0.11	0.21	0.12	0.12	0.15	0.21	0.15	0.18	0.15	0.18	0.12	0.18	0.19	0.23	0.10	0.10	0.08	0.24	0.23	0.22	-----	0.02

Highlighted FST values in green <0.05, 0.05 ≤ yellow<0.15, 0.15≤Orange<0.25 and 0.25≥ blue.

Table 4. Pairwise value of FST estimator of Weir and Cockerham (1984) between 7 popsites from cluster 2.

	Pe4	Or1	Or2	Or3	Or4	Or5	Or7
Pe4	----	0.13	0.08	0.12	0.08	0.07	0.33
Or1	0.13	----	0.07	0.11	0.06	0.07	0.23
Or2	0.08	0.07	----	0.05	0.01	0.00	0.27
Or3	0.12	0.11	0.05	----	0.03	0.04	0.28
Or4	0.08	0.06	0.01	0.03	----	0.02	0.21
Or5	0.07	0.07	0.00	0.04	0.02	----	0.26

Highlighted FST values in green <0.05 , $0.05 \leq$ yellow <0.15 , $0.15 \leq$ orange <0.25 and $0.25 \geq$ blue.

For Peer Review

Table 5. Genetic parameters for COI sequences in *Apistogramma agassizii*, clade 1, clade 2 and clade 3.

	<i>Apistogramma. agassizii</i>	Clade 1	Clade 2	Clade 3
Number of sequences (N)	32	14	10	8
Number of haplotypes (H)	12	5	4	3
Haplotypic diversity (Hd) $\pm$ SD(Hd)	0.917 $\pm$ 0.023	0.780 $\pm$ 0.085	0.733 $\pm$ 0.12	0.679 $\pm$ 0.122
Nucleotide diversity (π) $\pm$ SD(π)	0.015 $\pm$ 0.00059	0.00615 $\pm$ 0.00055	0.00137 $\pm$ 0.000354	0.00089 $\pm$ 0.00022
Total number of sites	924	924	924	924
Total number of polymorphic sites	37	13	4	2
Mean nucleotide differentiation between pairwise sequences (K)	13.857	5.681	1.267	0.821

FIGURE LEGEND

Figure 1: Elevation map of a) the complete study area, Loreto (Peru) with the 35 collecting sites (popsites), b) the sampling area in the Jenaro Herrera Region, c) the sampling area in the Orán region. Blue, green and red colours of the sampling sites correspond to distinct genetic units. Main river channels are highlighted in brown.

Figure 2: Model of the aquarium setting for the mate choice experiments. Each aquarium (100x30x30cm) is divided in three compartments: central one for females (50x30x30cm) and each extremity (25x30x30cm) for one male of each reproductive unit. Separations between the female and the male's compartments are perforated with 8mm holes to allow for all three types of communication: sound, chemical and visual. Filtering is performed with an internal sponge-filter and lightning with LED tubes on a 12 L : 12 D cycle. Spawning sites are 10cm long and 4.8 cm diameter PVC tubes cut lengthwise and fixed to each side of the glass separations.

Figure 3. Unrooted neighbor-joining dendrogram of pairwise genetic distances of Nei (1972). Codes on branches are the popsites and numbers on nodes are the bootstrap value ≥ 60 . Each popsite is identified by a colour code corresponding to a distinct genetic group : blue for cluster 1, green for cluster 2 and red for cluster 3.

Figure 4. a) Scatterplot of the DAPC of 1151 individual's genotypes (10 microsatellites loci) providing from 35 popsites of *Apistogramma* cf. *agassizii*. It shows the first two principal components of the DAPC for $k=3$. Each cluster has a colour code (blue, green and red for cluster 1, 2 and 3, respectively) and an inertia ellipse (dots represent individual genotypes). **b), c) and d)** Contingency tables between popsites and clusters for $k=3$, $k=2$ and $k=4$, respectively. Square size takes into account the number of individuals.

Figure 5. Maximum likelihood trees of COI gene. **a)** Tree of haplotypes, including 32 *Apistogramma* specimens of *agassizii* phenotype from the Loreto region (Peruvian Amazon) and rooted with two species outgroups (*A. eremnopyge* and *A. bitaeniata*) using the TN93+G model (LogL= -1541.89). Each haplotype is identified with a colour corresponding to a clade: Hap. 1 to 4, clade 2 (green); Hap. 5 to 7, clade 3 (red) and Hap. 8 to 12, clade 1 (blue). Below the nodes, datations (Ma) are presented : in bold datation estimated from Genner et al. (2007) taking in to account the Gondwana fragmentation (left) and data fossil (right); in italic bold datation

estimated from DiBattista et al. (2013) taking in to account a mutation rate of 1% (left) and 2% (right). **b)** Tree of species. The 3 entities (species Sp1-clade 1 in blue, Sp2-clade 2 in red, Sp3-clade 3 in green) and the Haplotype 8 from species Sp1 (clade 1) are placed in the genus *Apistogramma* partial phylogeny of Tougard et al. (2017), using the TN93+G model (LogL = -2821.79). Both trees are drawn to scale, with branch lengths measured in number of substitution per site. Bootstrap values established after 1000 replicates are indicated with black circle when value is >90. Real tree are as shown, they have the same topology as the bootstrap consensus tree.

Figure 6. a) Data distribution simulated from Mantel correlation under the null hypothesis of no isolation by distance. The dot represents the observed correlation. **b)** Relationship between the geographic distance (following the river channels) and the genetic distance of Rousset (1997) between popsites from specie Sp1. *p-value* = 0.042 based on 1000000 permutations.

Figure 7. Colour morph “Blue” and “Yellow” of *Apistogramma* cf. *agassizii* from different localities. Colour code used in boxes are the same as those used in all the other figures: blue for species Sp1, green for species Sp2 and red for species Sp3. The last picture in the “blue” colour morph of species Sp2 is a pattern from the Ampiyacu River identified by Koslowski (2002). Specific phenotypes identified *a posteriori* for each of the 3 species, on colour pattern of the caudal fin are: All males of Sp1 have a blue (white in picture) “V”-shaped band between two relatively wide dark bands (distal and proximal) at the submarginal part of the caudal. By contrast, the blue band is particularly visible. The dark proximal band is not always clearly defined, so it partially mixes with blue (blue colour moph) or yellow (yellow colour moph) patterns distributed down to the proximal part of the caudal fin. In species Sp2, the thin blue “V”-shaped band is very irregular in blue individuals while it is non-existent or sparse in yellow individuals. Individuals of this specie exhibit only one dark band on the distal part of the caudal fin. All blue males have very well defined blue patterns on the central and proximal part of the caudal fin. These patterns tend to merge with the blue stripe giving a “lace” pattern. These blue patterns are generally absent or spotted in yellow individuals. This colour pattern have been identified by Koslowski (2002). In species Sp3, for the blue colour moph, the blue “V”-shaped band always seems to be present; it is thin, straight and always seems to be between two dark bands (distal and proximal). While in the yellow colour moph, the blue band may be absent and the proximal dark band is absent. In blue males, the blue patterns of the central and proximal part

of the caudal are diffuse and tend to follow the rays of the fin. In yellow males, the colour is solid.

For Peer Review

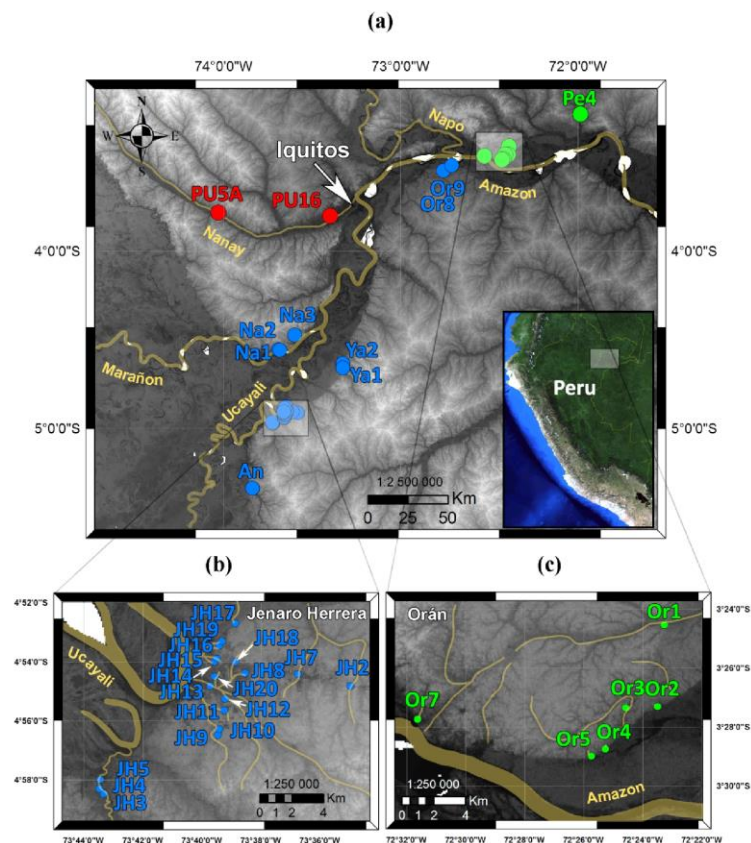


Figure 1: Elevation map of a) the complete study area, Loreto (Peru) with the 35 collecting sites (popsites), b) the sampling area in the Jenaro Herrera Region, c) the sampling area in the Orán region. Blue, green and red colours of the sampling sites correspond to distinct genetic units. Main river channels are highlighted in brown.

186x217mm (300 x 300 DPI)

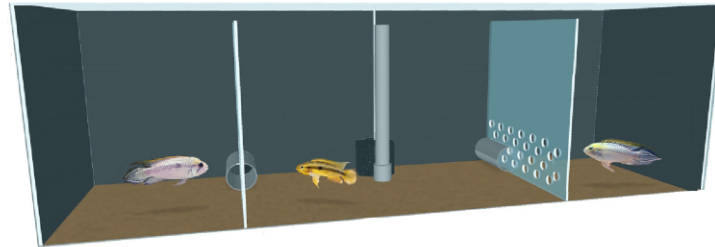


Figure 2: Model of the aquarium setting for the mate choice experiments. Each aquarium (100x30x30cm) is divided in three compartments: central one for females (50x30x30cm) and each extremity (25x30x30cm) for one male of each reproductive unit. Separations between the female and the male's compartments are perforated with 8mm holes to allow for all three types of communication: sound, chemical and visual. Filtering is performed with an internal sponge-filter and lightning with LED tubes on a 12 L : 12 D cycle. Spawning sites are 10cm long and 4.8 cm diameter PVC tubes cut lengthwise and fixed to each side of the glass separations.

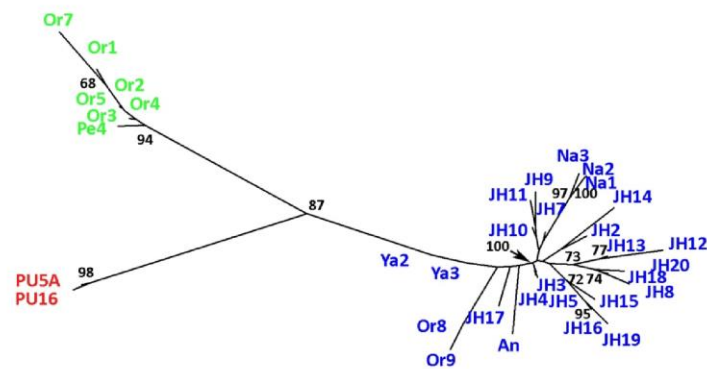


Figure 3. Unrooted neighbor-joining dendrogram of pairwise genetic distances of Nei (1972). Codes on branches are the popsites and numbers on nodes are the bootstrap value ≥ 60 . Each popsite is identified by a colour code corresponding to a distinct genetic group : blue for cluster 1, green for cluster 2 and red for cluster 3.

160x123mm (220 x 220 DPI)

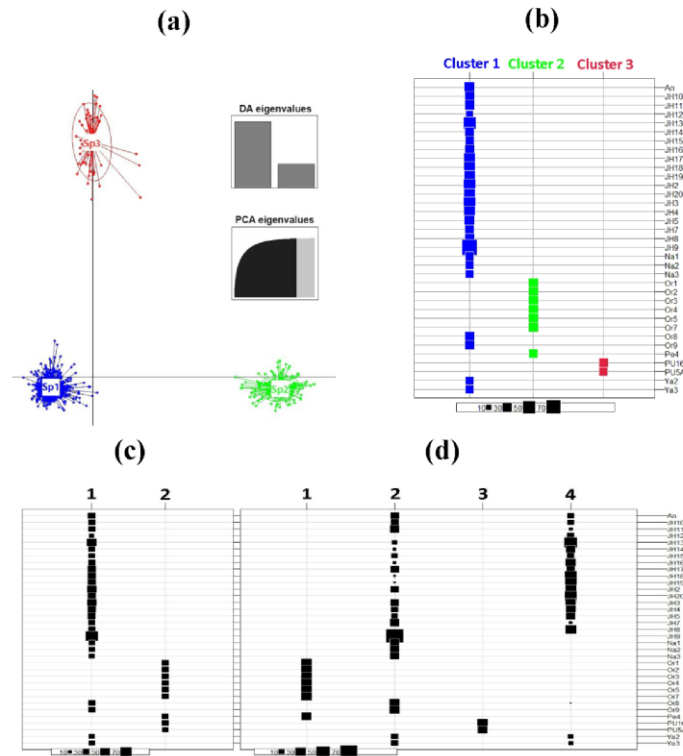


Figure 4. a) Scatterplot of the DAPC of 1151 individual's genotypes (10 microsatellites loci) providing from 35 popsites of *Apistogramma* cf. *agassizii*. It shows the first two principal components of the DAPC for k=3. Each cluster has a colour code (blue, green and red for cluster 1, 2 and 3, respectively) and an inertia ellipse (dots represent individual genotypes). b), c) and d) Contingency tables between popsites and clusters for k=3, k=2 and k=4, respectively. Square size takes into account the number of individuals.

128x142mm (300 x 300 DPI)

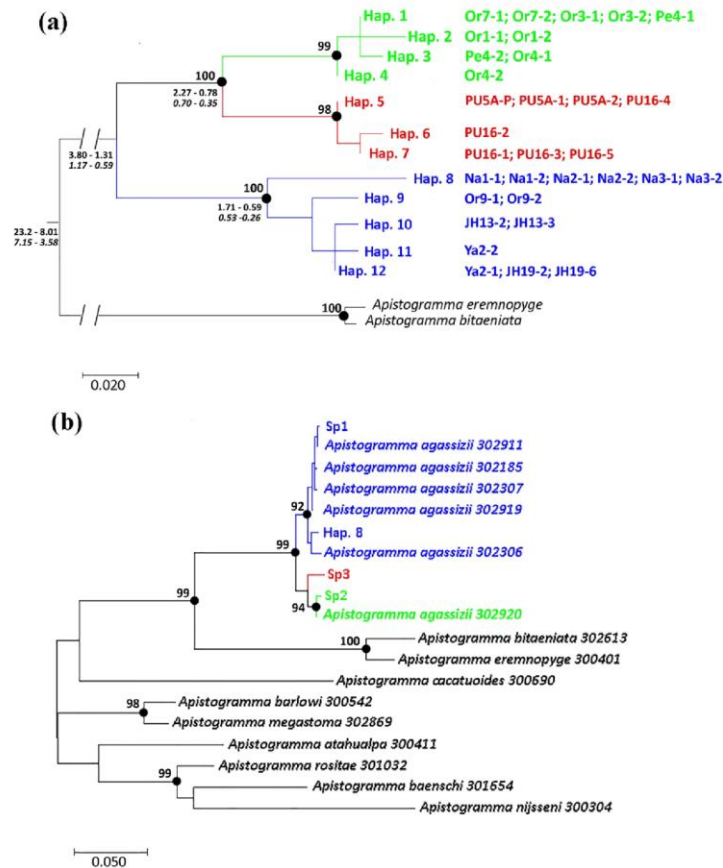


Figure 5. Maximum likelihood trees of COI gene. a) Tree of haplotypes, including 32 *Apistogramma* specimens of *agassizii* phenotype from the Loreto region (Peruvian Amazon) and rooted with two species outgroups (*A. eremnopyge* and *A. bitaeniata*) using the TN93+G model (LogL= -1541.89). Each haplotype is identified with a colour corresponding to a clade: Hap. 1 to 4, clade 2 (green); Hap. 5 to 7, clade 3 (red) and Hap. 8 to 12, clade 1 (blue). Below the nodes, datations (Ma) are presented : in bold datation estimated from Genner et al. (2007) taking in to account the Gondwana fragmentation (left) and data fossil (right); in italic bold datation estimated from DiBattista et al. (2013) taking in to account a mutation rate of 1% (left) and 2% (right). b) Tree of species. The 3 entities (species Sp1-clade 1 in blue, Sp2-clade 2 in red, Sp3-clade 3 in green) and the Haplotype 8 from species Sp1 (clade 1) are placed in the genus *Apistogramma* partial phylogeny of Tougard et al. (2017), using the TN93+G model (LogL= -2821.79). Both trees are drawn to scale, with branch lengths measured in number of substitution per site. Bootstrap values established after 1000 replicates are indicated with black circle when value is >90. Real tree are as shown, they have the same topology as the bootstrap consensus tree.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

157x194mm (300 x 300 DPI)

<http://mc.manuscriptcentral.com/aqc>

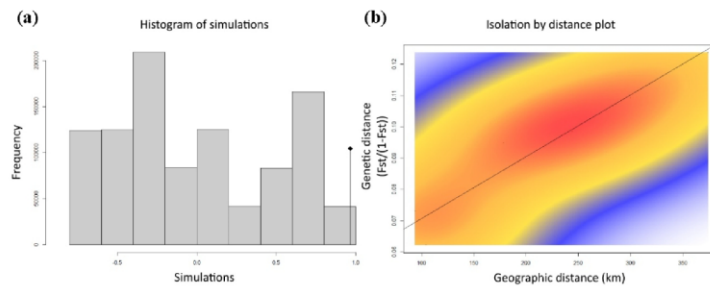


Figure 6. a) Data distribution simulated from Mantel correlation under the null hypothesis of no isolation by distance. The dot represents the observed correlation. b) Relationship between the geographic distance (following the river channels) and the genetic distance of Rousset (1997) between popsites from specie Sp1. p-value = 0.042 based on 1000000 permutations.

156x61mm (220 x 220 DPI)

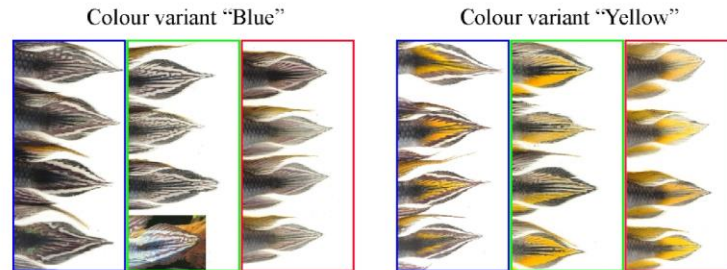
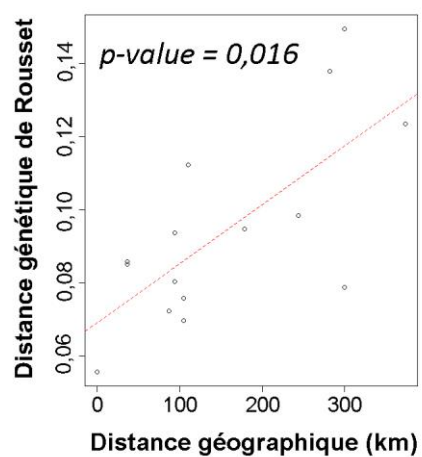
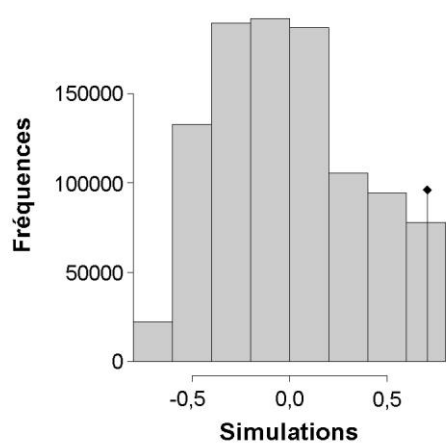
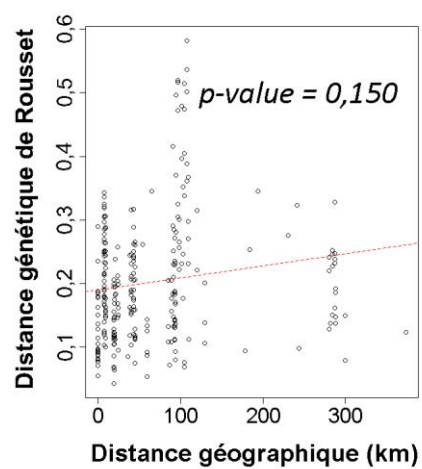
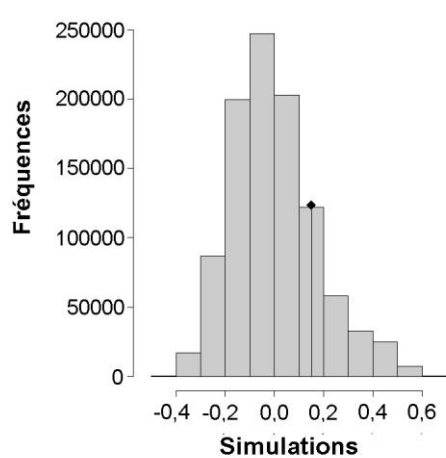


Figure 7. Colour morph "Blue" and "Yellow" of *Apistogramma* cf. *agassizii* from different localities. Colour code used in boxes are the same as those used in all the other figures: blue for species Sp1, green for species Sp2 and red for species Sp3. The last picture in the "blue" colour morph of species Sp2 is a pattern from the Ampiyacu River identified by Koslowski (2002). Specific phenotypes identified a posteriori for each of the 3 species, on colour pattern of the caudal fin are: All males of Sp1 have a blue (white in picture) "V"-shaped band between two relatively wide dark bands (distal and proximal) at the submarginal part of the caudal. By contrast, the blue band is particularly visible. The dark proximal band is not always clearly defined, so it partially mixes with blue (blue colour morph) or yellow (yellow colour morph) patterns distributed down to the proximal part of the caudal fin. In species Sp2, the thin blue "V"-shaped band is very irregular in blue individuals while it is non-existent or sparse in yellow individuals. Individuals of this specie exhibit only one dark band on the distal part of the caudal fin. All blue males have very well defined blue patterns on the central and proximal part of the caudal fin. These patterns tend to merge with the blue stripe giving a "lace" pattern. These blue patterns are generally absent or spotted in yellow individuals. This colour pattern have been identified by Koslowski (2002). In species Sp3, for the blue colour morph, the blue "V"-shaped band always seems to be present; it is thin, straight and always seems to be between two dark bands (distal and proximal). While in the yellow colour morph, the blue band may be absent and the proximal dark band is absent. In blue males, the blue patterns of the central and proximal part of the caudal are diffuse and tend to follow the rays of the fin. In yellow males, the colour is solid.

128x51mm (300 x 300 DPI)

Annexe 8. Relation entre distance géographique et distance génétique de Rousset pour **a)** l'ensemble de clusters, **b)** les clusters appartenant aux microbassins A, B H et I.



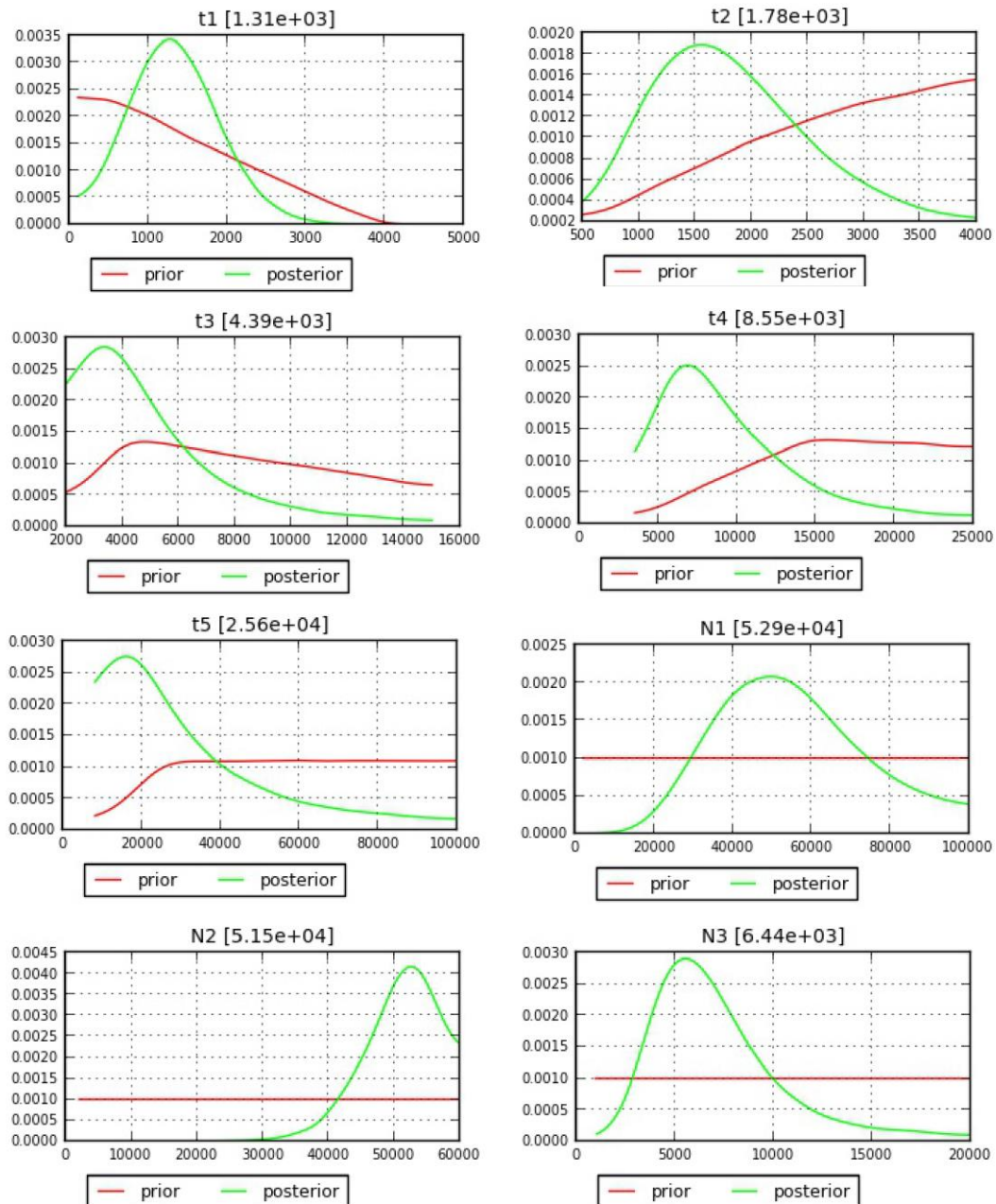
Annexe 9 : Valeurs des statistiques résumées observées et proportion des simulées < observé. Les valeurs en rouge sont distribuées dans les queues de distributions. *= p-value (0,05 – 0.01) ; **= p-value (0,01 – 0.005)

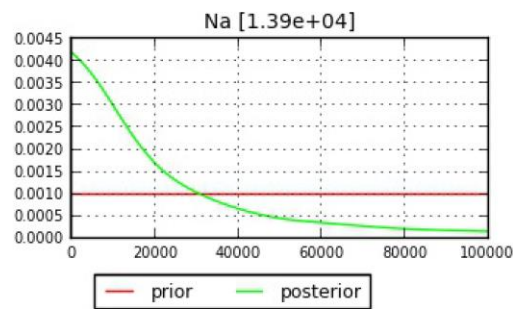
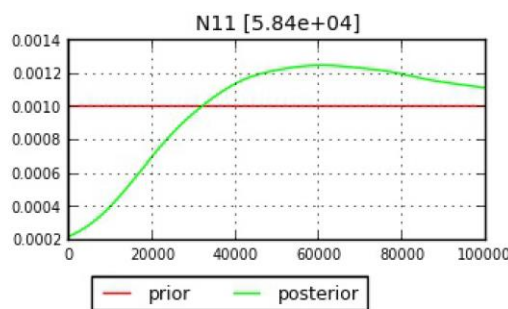
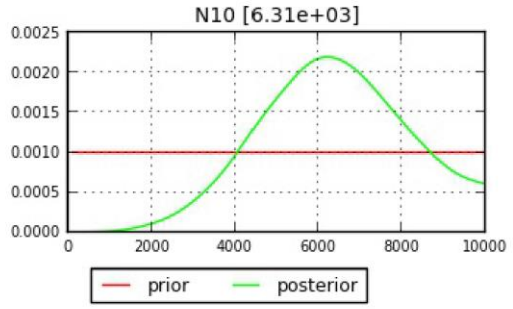
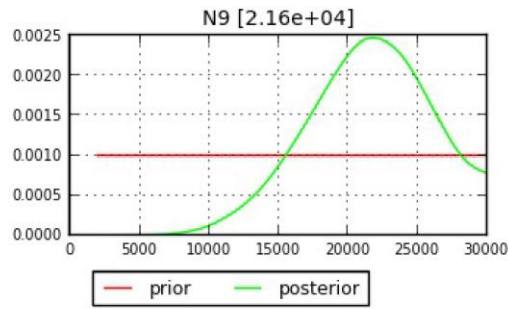
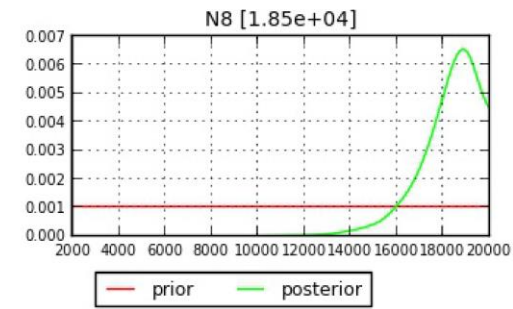
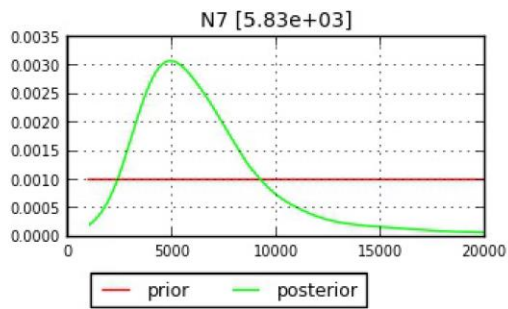
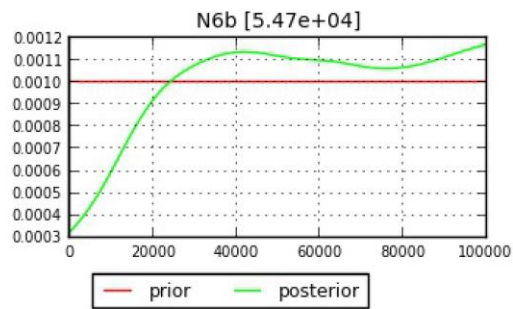
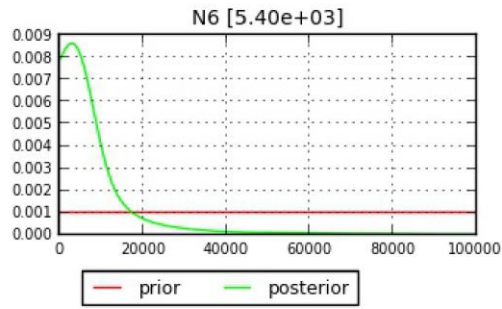
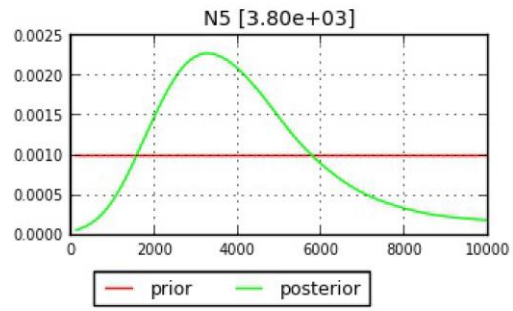
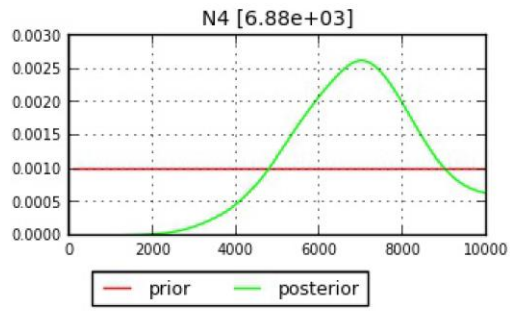
Statistique résumée	Valeur observée	Proportion (simulé < observé)			Statistique résumée	Valeur observée	Proportion (simulé < observé)		
		Scénario 5	Scénario 7	Scénario 4			Scénario 5	Scénario 7	Scénario 4
NAL 1 1	13.8000	0.6030	0.5025	0.6135	FST 1 6&9	0.1213	0.2980	0.4940	0.1590
NAL 1 2	18.5000	0.6070	0.5070	0.7030	FST 1 6&10	0.2382	0.2375	0.4060	0.1210
NAL 1 3	10.4000	0.5460	0.4860	0.4760	FST 1 7&8	0.1241	0.4870	0.6350	0.1265
NAL 1 4	9.8000	0.4485	0.3655	0.5510	FST 1 7&9	0.1740	0.8425	0.9245	0.4725
NAL 1 5	7.9000	0.5635	0.4650	0.6195	FST 1 7&10	0.2374	0.5855	0.6875	0.3360
NAL 1 6	8.8000	0.7380	0.5270	0.7340	FST 1 8&9	0.0896	0.4025	0.5530	0.1640
NAL 1 7	8.4000	0.5245	0.4005	0.6410	FST 1 8&10	0.2340	0.4465	0.5835	0.2545
NAL 1 8	11.3000	0.5795	0.4890	0.6630	FST 1 9&10	0.2285	0.4630	0.5565	0.2565
NAL 1 9	12.5000	0.5955	0.5285	0.6335	LIK 1 1&2	2.7973	0.8065	0.7855	0.4960
NAL 1 10	7.1000	0.5935	0.4415	0.6280	LIK 1 1&3	3.5373	0.7080	0.6470	0.5425
HET 1 1	0.7645	0.5275	0.4160	0.5425	LIK 1 1&4	3.7236	0.7570	0.7205	0.4910
HET 1 2	0.7571	0.4725	0.3855	0.5990	LIK 1 1&5	3.5527	0.5855	0.5330	0.3905
HET 1 3	0.7005	0.5380	0.4740	0.5715	LIK 1 1&6	3.0066	0.4340	0.4845	0.3885
HET 1 4	0.6750	0.4380	0.3740	0.5605	LIK 1 1&7	3.0644	0.5295	0.5045	0.3240
HET 1 5	0.6786	0.6085	0.5450	0.7040	LIK 1 1&8	2.7299	0.5130	0.4960	0.4835
HET 1 6	0.6947	0.7465	0.5855	0.7985	LIK 1 1&9	2.9586	0.6770	0.6465	0.6025
HET 1 7	0.6426	0.3790	0.2815	0.5000	LIK 1 1&10	4.0556	0.5370	0.4790	0.4135
HET 1 8	0.7329	0.6025	0.4965	0.6680	LIK 1 2&1	2.5289	0.5845	0.5360	0.4260
HET 1 9	0.7267	0.5365	0.4365	0.6155	LIK 1 2&3	2.5617	0.4625	0.3670	0.6795
HET 1 10	0.4433	0.3040	0.1995	0.4400	LIK 1 2&4	2.6474	0.4970	0.4130	0.5945
VAR 1 1	68.9912	0.6470	0.5730	0.6875	LIK 1 2&5	2.8464	0.4635	0.3810	0.5655
VAR 1 2	61.1275	0.5730	0.4980	0.6720	LIK 1 2&6	2.5665	0.2260	0.2430	0.1080
VAR 1 3	50.7082	0.5460	0.4950	0.6320	LIK 1 2&7	2.6679	0.5375	0.4790	0.6225
VAR 1 4	21.1204	0.2440	0.1940	0.3410	LIK 1 2&8	2.3071	0.2735	0.2305	0.1355
VAR 1 5	36.3443	0.4510	0.3660	0.5470	LIK 1 2&9	2.6412	0.4690	0.3920	0.2820
VAR 1 6	49.5798	0.6490	0.5420	0.7460	LIK 1 2&10	3.5155	0.4760	0.4050	0.4125
VAR 1 7	47.0437	0.5220	0.4320	0.6340	LIK 1 3&1	2.5523	0.6030	0.5615	0.4350
VAR 1 8	60.2779	0.6160	0.5520	0.6810	LIK 1 3&2	1.8509	0.4900	0.3990	0.5865
VAR 1 9	31.8749	0.3580	0.2910	0.4230	LIK 1 3&4	2.7908	0.5780	0.4800	0.6440
VAR 1 10	44.3326	0.7270	0.6570	0.8120	LIK 1 3&5	2.7997	0.4415	0.3510	0.5375
MGW 1 1	0.4678	0.0230*	0.0245*	0.0055**	LIK 1 3&6	2.5658	0.2365	0.2525	0.1175
MGW 1 2	0.5968	0.0165*	0.0125*	0.0075**	LIK 1 3&7	2.3262	0.3830	0.3125	0.4465
MGW 1 3	0.5049	0.2485	0.2775	0.0645	LIK 1 3&8	2.3825	0.3140	0.2750	0.1680
MGW 1 4	0.3828	0.0165*	0.0160*	0.0085**	LIK 1 3&9	2.5736	0.4430	0.3880	0.2610
MGW 1 5	0.3503	0.1035	0.1180	0.0505	LIK 1 3&10	3.3232	0.4190	0.3385	0.3425
MGW 1 6	0.3223	0.0865	0.0365*	0.0415*	LIK 1 4&1	2.5783	0.5995	0.5560	0.4550
MGW 1 7	0.4667	0.3520	0.3585	0.2710	LIK 1 4&2	1.6784	0.3510	0.2920	0.4525
MGW 1 8	0.4860	0.1130	0.1225	0.0715	LIK 1 4&3	2.5180	0.4385	0.3555	0.6585
MGW 1 9	0.5543	0.1715	0.2115	0.0865	LIK 1 4&5	2.3701	0.4765	0.4030	0.5885
MGW 1 10	0.4880	0.2495	0.2850	0.1310	LIK 1 4&6	2.0815	0.1010	0.1065	0.0420*
N2P 1 1&2	22.9000	0.6690	0.6045	0.6995	LIK 1 4&7	2.3692	0.3870	0.3300	0.4525
N2P 1 1&3	18.1000	0.6370	0.5530	0.5980	LIK 1 4&8	2.1356	0.2060	0.1800	0.0870
N2P 1 1&4	17.4000	0.5915	0.4935	0.5995	LIK 1 4&9	2.6359	0.4745	0.4040	0.2885
N2P 1 1&5	16.3000	0.5945	0.5045	0.5855	LIK 1 4&10	3.5668	0.5075	0.4335	0.4545
N2P 1 1&6	17.0000	0.6540	0.5525	0.6770	LIK 1 5&1	2.4312	0.5265	0.4835	0.3930
N2P 1 1&7	17.0000	0.6170	0.5200	0.6255	LIK 1 5&2	2.0140	0.5835	0.5240	0.7115
N2P 1 1&8	17.8000	0.6070	0.5260	0.6470	LIK 1 5&3	2.6348	0.5070	0.4240	0.7095
N2P 1 1&9	19.8000	0.6945	0.6335	0.7045	LIK 1 5&4	2.5226	0.7215	0.6370	0.7995
N2P 1 1&10	17.2000	0.6545	0.5500	0.6625	LIK 1 5&6	2.5224	0.2295	0.2480	0.1120
N2P 1 2&3	20.1000	0.6155	0.5275	0.7015	LIK 1 5&7	2.6798	0.5485	0.5085	0.6305
N2P 1 2&4	19.8000	0.5965	0.5050	0.7020	LIK 1 5&8	2.3404	0.2975	0.2510	0.1590
N2P 1 2&5	19.7000	0.6215	0.5290	0.7100	LIK 1 5&9	2.7863	0.5605	0.4910	0.3610
N2P 1 2&6	20.0000	0.6115	0.5155	0.6865	LIK 1 5&10	3.7849	0.6120	0.5565	0.5590
N2P 1 2&7	19.8000	0.6180	0.5250	0.7175	LIK 1 6&1	2.5186	0.6080	0.5955	0.6855
N2P 1 2&8	20.8000	0.6220	0.5270	0.6645	LIK 1 6&2	1.9408	0.2725	0.2480	0.1020
N2P 1 2&9	21.9000	0.6520	0.5715	0.6895	LIK 1 6&3	2.5565	0.3015	0.2335	0.1690
N2P 1 2&10	20.1000	0.6270	0.5290	0.7190	LIK 1 6&4	2.5102	0.2540	0.2030	0.1170
N2P 1 3&4	14.6000	0.5260	0.4540	0.5855	LIK 1 6&5	2.5922	0.2265	0.1705	0.1210
N2P 1 3&5	13.3000	0.5460	0.4635	0.5595	LIK 1 6&7	2.4209	0.2830	0.2280	0.1345
N2P 1 3&6	14.3000	0.6115	0.4915	0.5690	LIK 1 6&8	2.1368	0.2480	0.2335	0.2160
N2P 1 3&7	13.4000	0.5300	0.4400	0.5575	LIK 1 6&9	2.5743	0.4755	0.4385	0.3890
N2P 1 3&8	16.0000	0.5910	0.5075	0.5680	LIK 1 6&10	3.8991	0.4820	0.4210	0.3800
N2P 1 3&9	16.7000	0.5930	0.5225	0.5745	LIK 1 7&1	2.7133	0.6865	0.6370	0.5220
N2P 1 3&10	13.3000	0.5600	0.4590	0.5375	LIK 1 7&2	1.9250	0.5325	0.4520	0.6385
N2P 1 4&5	12.5000	0.5070	0.4210	0.6090	LIK 1 7&3	2.4460	0.4125	0.3195	0.6235
N2P 1 4&6	12.8000	0.4815	0.3575	0.5365	LIK 1 7&4	2.6387	0.4940	0.3975	0.5715
N2P 1 4&7	13.6000	0.5185	0.4295	0.6500	LIK 1 7&5	2.6188	0.3710	0.2900	0.4540
N2P 1 4&8	15.2000	0.5125	0.4385	0.5680	LIK 1 7&6	2.4132	0.1795	0.1875	0.0910
N2P 1 4&9	16.3000	0.5585	0.4770	0.5895	LIK 1 7&8	2.1651	0.2130	0.1785	0.0940
N2P 1 4&10	13.6000	0.5635	0.4545	0.6390	LIK 1 7&9	2.7107	0.5050	0.4420	0.3190
N2P 1 5&6	12.1000	0.5755	0.4285	0.5975	LIK 1 7&10	3.2892	0.3900	0.3090	0.3275
N2P 1 5&7	12.0000	0.5465	0.4265	0.6400	LIK 1 8&1	2.4865	0.5900	0.5645	0.6260
N2P 1 5&8	14.1000	0.5485	0.4605	0.5870	LIK 1 8&2	2.0148	0.3365	0.2820	0.1340

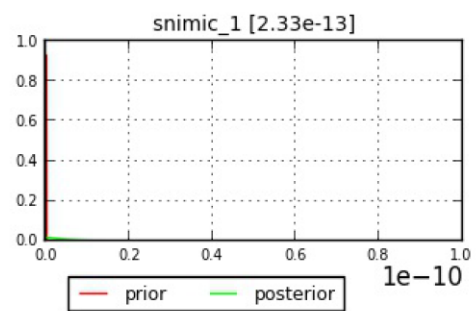
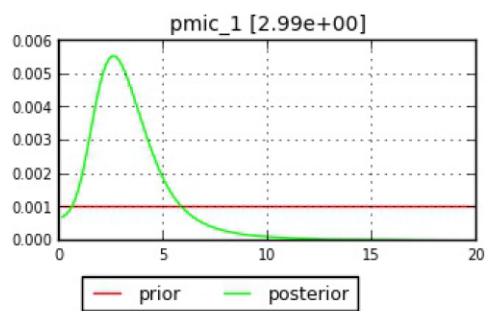
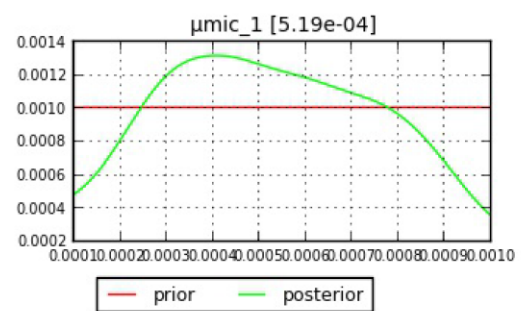
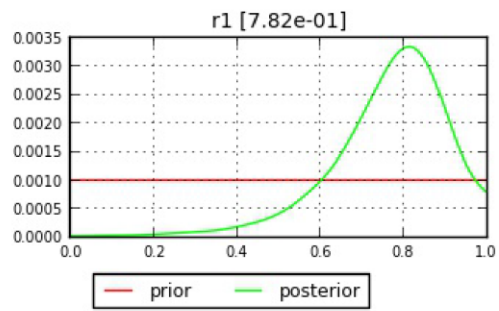
N2P 1 5&9	15.3000	0.5725	0.5025	0.6025	LIK 1 8&3	2.7193	0.3425	0.2840	0.2045
N2P 1 5&10	12.4000	0.6235	0.5140	0.6895	LIK 1 8&4	2.7479	0.3490	0.2675	0.1485
N2P 1 6&7	12.3000	0.5610	0.4020	0.6165	LIK 1 8&5	2.7555	0.2820	0.2260	0.1395
N2P 1 6&8	14.5000	0.5930	0.4775	0.6685	LIK 1 8&6	2.5681	0.2640	0.2755	0.2100
N2P 1 6&9	15.5000	0.6140	0.5020	0.6530	LIK 1 8&7	2.4894	0.2895	0.2420	0.1320
N2P 1 6&10	13.0000	0.6730	0.5030	0.7105	LIK 1 8&9	2.4795	0.4240	0.3745	0.3270
N2P 1 7&8	14.1000	0.5140	0.4175	0.5755	LIK 1 8&10	3.7121	0.3925	0.3630	0.2660
N2P 1 7&9	15.5000	0.5660	0.4775	0.5995	LIK 1 9&1	2.7921	0.7690	0.7560	0.7245
N2P 1 7&10	12.5000	0.5940	0.4535	0.6840	LIK 1 9&2	2.6406	0.7170	0.7070	0.4055
N2P 1 8&9	16.7000	0.5805	0.5165	0.6285	LIK 1 9&3	3.2251	0.5630	0.5000	0.4100
N2P 1 8&10	14.4000	0.5775	0.4665	0.6280	LIK 1 9&4	3.5365	0.6870	0.6445	0.4135
N2P 1 9&10	15.8000	0.6140	0.5290	0.6485	LIK 1 9&5	3.5368	0.5880	0.5275	0.3850
H2P 1 1&2	0.7776	0.5045	0.4140	0.5530	LIK 1 9&6	2.9788	0.4175	0.4655	0.3095
H2P 1 1&3	0.7404	0.5375	0.4695	0.5335	LIK 1 9&7	2.9540	0.4870	0.4620	0.2955
H2P 1 1&4	0.7185	0.4765	0.4015	0.5575	LIK 1 9&8	2.6879	0.5040	0.4690	0.3840
H2P 1 1&5	0.7422	0.5985	0.5180	0.6360	LIK 1 9&10	3.9058	0.4940	0.4190	0.3530
H2P 1 1&6	0.7687	0.6330	0.5190	0.7035	LIK 1 10&1	2.5006	0.4460	0.3430	0.3760
H2P 1 1&7	0.7443	0.4585	0.3705	0.4715	LIK 1 10&2	1.8427	0.3780	0.2490	0.2720
H2P 1 1&8	0.7812	0.5880	0.4920	0.6175	LIK 1 10&3	2.5259	0.4140	0.2770	0.3850
H2P 1 1&9	0.7834	0.5850	0.5035	0.6225	LIK 1 10&4	2.9189	0.5630	0.4160	0.4490
H2P 1 1&10	0.6241	0.3305	0.2410	0.4170	LIK 1 10&5	3.0725	0.5310	0.4015	0.4510
H2P 1 2&3	0.7491	0.4925	0.4205	0.5980	LIK 1 10&6	2.8653	0.2965	0.2660	0.2020
H2P 1 2&4	0.7307	0.4530	0.3645	0.5750	LIK 1 10&7	2.6035	0.4585	0.3615	0.3625
H2P 1 2&5	0.7489	0.5150	0.4225	0.6325	LIK 1 10&8	2.4194	0.2590	0.2010	0.1580
H2P 1 2&6	0.7609	0.4705	0.3900	0.5205	LIK 1 10&9	2.2793	0.2290	0.1640	0.1365
H2P 1 2&7	0.7492	0.4510	0.3665	0.5795	DAS 1 1&2	0.1860	0.4450	0.5315	0.5380
H2P 1 2&8	0.7677	0.4705	0.3905	0.5155	DAS 1 1&3	0.1858	0.4515	0.5345	0.5355
H2P 1 2&9	0.7800	0.5115	0.4250	0.5515	DAS 1 1&4	0.1765	0.4175	0.4855	0.5050
H2P 1 2&10	0.7024	0.3875	0.2965	0.4575	DAS 1 1&5	0.1747	0.4130	0.4840	0.4965
H2P 1 3&4	0.7280	0.4730	0.4085	0.5945	DAS 1 1&6	0.1893	0.4400	0.5075	0.4290
H2P 1 3&5	0.7294	0.5155	0.4425	0.6120	DAS 1 1&7	0.1964	0.4950	0.5685	0.5845
H2P 1 3&6	0.7274	0.4945	0.4435	0.4990	DAS 1 1&8	0.1812	0.4095	0.4800	0.4035
H2P 1 3&7	0.7159	0.4770	0.4015	0.5495	DAS 1 1&9	0.1634	0.3465	0.4035	0.3695
H2P 1 3&8	0.7391	0.5155	0.4565	0.5045	DAS 1 1&10	0.2320	0.6535	0.7225	0.7210
H2P 1 3&9	0.7489	0.5250	0.4660	0.5305	DAS 1 2&3	0.2284	0.5195	0.5945	0.3975
H2P 1 3&10	0.6627	0.3510	0.2655	0.3995	DAS 1 2&4	0.2388	0.5540	0.6370	0.4300
H2P 1 4&5	0.7119	0.4930	0.4300	0.6095	DAS 1 2&5	0.2288	0.5060	0.6050	0.3945
H2P 1 4&6	0.7050	0.4335	0.3695	0.5125	DAS 1 2&6	0.2233	0.5930	0.6525	0.6720
H2P 1 4&7	0.6955	0.4115	0.3455	0.5275	DAS 1 2&7	0.2415	0.5595	0.6410	0.4425
H2P 1 4&8	0.7177	0.4590	0.3775	0.5190	DAS 1 2&8	0.2123	0.5495	0.6205	0.6275
H2P 1 4&9	0.7359	0.5065	0.4255	0.5590	DAS 1 2&9	0.1837	0.4585	0.5310	0.5455
H2P 1 4&10	0.6805	0.3890	0.3060	0.4685	DAS 1 2&10	0.2729	0.6400	0.7400	0.6430
H2P 1 5&6	0.7245	0.5660	0.4865	0.6025	DAS 1 3&4	0.2274	0.5195	0.5905	0.3900
H2P 1 5&7	0.7122	0.5235	0.4470	0.6355	DAS 1 3&5	0.2322	0.5295	0.6025	0.4045
H2P 1 5&8	0.7373	0.5530	0.4965	0.5845	DAS 1 3&6	0.2212	0.5840	0.6335	0.6645
H2P 1 5&9	0.7560	0.5915	0.5205	0.6155	DAS 1 3&7	0.2496	0.5885	0.6555	0.4810
H2P 1 5&10	0.6621	0.4075	0.3170	0.4870	DAS 1 3&8	0.2042	0.5210	0.5925	0.6085
H2P 1 6&7	0.7237	0.4910	0.3930	0.5340	DAS 1 3&9	0.1907	0.4755	0.5525	0.5650
H2P 1 6&8	0.7414	0.5595	0.4490	0.6240	DAS 1 3&10	0.3186	0.7500	0.8200	0.7480
H2P 1 6&9	0.7614	0.5930	0.4920	0.6535	DAS 1 4&5	0.2450	0.4725	0.5480	0.3610
H2P 1 6&10	0.6100	0.3220	0.2385	0.4165	DAS 1 4&6	0.2262	0.6030	0.6510	0.6675
H2P 1 7&8	0.7369	0.4540	0.3805	0.4760	DAS 1 4&7	0.2592	0.6180	0.6815	0.5190
H2P 1 7&9	0.7617	0.5240	0.4445	0.5460	DAS 1 4&8	0.2042	0.5215	0.5920	0.6070
H2P 1 7&10	0.6020	0.3010	0.2105	0.3915	DAS 1 4&9	0.1721	0.4095	0.4775	0.5015
H2P 1 8&9	0.7650	0.5455	0.4630	0.5810	DAS 1 4&10	0.2660	0.6280	0.7215	0.6330
H2P 1 8&10	0.6420	0.3430	0.2490	0.4125	DAS 1 5&6	0.2126	0.5605	0.6065	0.6320
H2P 1 9&10	0.6583	0.3455	0.2490	0.3930	DAS 1 5&7	0.2364	0.5390	0.6160	0.4305
V2P 1 1&2	65.2195	0.6010	0.5210	0.6450	DAS 1 5&8	0.2016	0.5175	0.5700	0.5885
V2P 1 1&3	58.6843	0.5940	0.5240	0.6260	DAS 1 5&9	0.1723	0.4125	0.4765	0.4925
V2P 1 1&4	30.2501	0.3100	0.2530	0.3890	DAS 1 5&10	0.2699	0.6480	0.7320	0.6465
V2P 1 1&5	47.8541	0.5010	0.4220	0.5450	DAS 1 6&7	0.2162	0.5695	0.6295	0.6445
V2P 1 1&6	60.4149	0.6000	0.5190	0.6620	DAS 1 6&8	0.2343	0.6005	0.6485	0.5895
V2P 1 1&7	59.6451	0.5640	0.4880	0.6130	DAS 1 6&9	0.1902	0.4420	0.5125	0.4915
V2P 1 1&8	65.2700	0.6150	0.5500	0.6670	DAS 1 6&10	0.2648	0.7350	0.7900	0.7845
V2P 1 1&9	47.1605	0.4580	0.3850	0.5100	DAS 1 7&8	0.2145	0.5605	0.6240	0.6360
V2P 1 1&10	60.5201	0.6480	0.5790	0.7010	DAS 1 7&9	0.1695	0.4115	0.4705	0.4815
V2P 1 2&3	57.6617	0.5670	0.4910	0.6530	DAS 1 7&10	0.2942	0.6940	0.7875	0.6970
V2P 1 2&4	41.0575	0.4140	0.3300	0.5210	DAS 1 8&9	0.1982	0.4770	0.5390	0.4990
V2P 1 2&5	52.4374	0.5210	0.4300	0.6190	DAS 1 8&10	0.2413	0.6745	0.7405	0.7320
V2P 1 2&6	59.4618	0.5490	0.4770	0.6200	DAS 1 9&10	0.2448	0.6815	0.7540	0.7560
V2P 1 2&7	60.6141	0.5750	0.4900	0.6760	DM2 1 1&2	14.5369	0.7310	0.7640	0.4540
V2P 1 2&8	61.7026	0.5670	0.4910	0.6290	DM2 1 1&3	27.2433	0.7790	0.7750	0.6170
V2P 1 2&9	53.6199	0.4890	0.4140	0.5530	DM2 1 1&4	10.5432	0.5080	0.4370	0.3010
V2P 1 2&10	62.8632	0.6250	0.5230	0.6890	DM2 1 1&5	16.0382	0.5740	0.5150	0.4070
V2P 1 3&4	43.9024	0.4530	0.3630	0.5540	DM2 1 1&6	8.2993	0.3480	0.3450	0.3140
V2P 1 3&5	51.0869	0.5250	0.4520	0.6120	DM2 1 1&7	14.3757	0.5720	0.5540	0.3860
V2P 1 3&6	53.9071	0.5440	0.4820	0.6030	DM2 1 1&8	6.4515	0.3970	0.3900	0.3910
V2P 1 3&7	52.1106	0.5340	0.4590	0.6210	DM2 1 1&9	8.4364	0.4890	0.4930	0.4240
V2P 1 3&8	55.3578	0.5480	0.4870	0.5970	DM2 1 1&10	36.7258	0.5510	0.5190	0.4740
V2P 1 3&9	50.3719	0.4970	0.4370	0.5480	DM2 1 2&3	8.5912	0.6480	0.5770	0.7770
V2P 1 3&10	56.9821	0.5900	0.5180	0.6590	DM2 1 2&4	15.3001	0.8080	0.7630	0.8390
V2P 1 4&5	28.7498	0.3005	0.2600	0.4190	DM2 1 2&5	9.5951	0.5680	0.5160	0.6480

V2P 1 4&6	26.9985	0.2710	0.2300	0.3600	DM2 1 2&6	7.1214	0.2740	0.2970	0.1400
V2P 1 4&7	32.1721	0.3380	0.2720	0.4550	DM2 1 2&7	17.7162	0.8230	0.8000	0.8530
V2P 1 4&8	31.6399	0.3140	0.2660	0.3960	DM2 1 2&8	5.0500	0.2950	0.2810	0.1590
V2P_1 4&9	24.9020	0.2480	0.2090	0.3130	DM2_1 2&9	10.1547	0.5100	0.5000	0.2950
V2P 1 4&10	36.5307	0.3940	0.3110	0.4920	DM2 1 2&10	34.3869	0.6560	0.6100	0.6450
V2P 1 5&6	40.8807	0.4330	0.3510	0.5050	DM2 1 3&4	40.5880	0.9010	0.8900	0.9380
V2P_1 5&7	47.8403	0.5160	0.4160	0.6180	DM2_1 3&5	26.4482	0.7450	0.6920	0.8380
V2P 1 5&8	45.9046	0.4770	0.3950	0.5240	DM2 1 3&6	20.7281	0.4995	0.5080	0.3440
V2P 1 5&9	36.9588	0.3660	0.2980	0.4260	DM2 1 3&7	12.9611	0.5840	0.5200	0.6840
V2P_1 5&10	56.0481	0.6060	0.5310	0.6750	DM2_1 3&8	12.3579	0.4390	0.4170	0.3010
V2P 1 6&7	53.3988	0.5390	0.4530	0.6020	DM2 1 3&9	26.0015	0.7060	0.6730	0.5540
V2P 1 6&8	56.4092	0.5590	0.4980	0.6370	DM2 1 3&10	38.0012	0.6450	0.5900	0.6500
V2P_1 6&9	39.4215	0.4070	0.3300	0.4785	DM2_1 4&5	10.1784	0.5750	0.5330	0.6630
V2P 1 6&10	56.1800	0.6270	0.5390	0.6890	DM2 1 4&6	5.6827	0.1940	0.1850	0.0990
V2P_1 7&8	56.6486	0.5430	0.4770	0.5960	DM2_1 4&7	34.3363	0.8570	0.8360	0.8830
V2P 1 7&9	43.2085	0.4250	0.3360	0.4710	DM2 1 4&8	14.5634	0.5010	0.4700	0.3190
V2P_1 7&10	49.8602	0.5920	0.4970	0.6650	DM2_1 4&9	5.9093	0.2640	0.2490	0.1430
V2P 1 8&9	45.7391	0.4410	0.3790	0.5110	DM2 1 4&10	43.7771	0.6770	0.6290	0.6580
V2P_1 8&10	60.6115	0.6360	0.5560	0.6800	DM2_1 5&6	4.4073	0.1370	0.1320	0.0770
V2P 1 9&10	47.8668	0.5070	0.4230	0.5580	DM2 1 5&7	36.7770	0.8370	0.8090	0.8640
FST 1 1&2	0.0668	0.8250	0.9070	0.2690	DM2 1 5&8	8.5706	0.3250	0.2790	0.1950
FST_1 1&3	0.1039	0.6425	0.6850	0.3295	DM2_1 5&9	10.1801	0.3760	0.3160	0.2280
FST 1 1&4	0.1314	0.8520	0.8975	0.4215	DM2 1 5&10	67.2876	0.7670	0.7650	0.7690
FST_1 1&5	0.1294	0.5995	0.6405	0.2530	DM2_1 6&7	22.0160	0.5030	0.5110	0.3590
FST 1 1&6	0.1009	0.3040	0.5240	0.2650	DM2 1 6&8	5.2195	0.1840	0.2050	0.1890
FST_1 1&7	0.1268	0.7760	0.8875	0.3610	DM2_1 6&9	3.2775	0.1190	0.1380	0.0910
FST 1 1&8	0.0866	0.6810	0.8350	0.4960	DM2 1 6&10	44.1429	0.5100	0.4850	0.4400
FST_1 1&9	0.1100	0.8810	0.9620*	0.6965	DM2_1 7&8	13.0295	0.4380	0.4440	0.3050
FST 1 1&10	0.2327	0.5635	0.6640	0.3520	DM2_1 7&9	19.6755	0.5890	0.5665	0.4000
FST_1 2&3	0.0566	0.4685	0.4715	0.7490	DM2 1 7&10	19.2059	0.4020	0.3430	0.4200
FST 1 2&4	0.0604	0.5650	0.5615	0.4720	DM2_1 8&9	6.5231	0.3110	0.3260	0.2600
FST_1 2&5	0.0687	0.3295	0.3170	0.3415	DM2 1 8&10	41.8641	0.5540	0.5150	0.4880
FST 1 2&6	0.0642	0.1275	0.2335	0.0220*	DM2_1 9&10	37.8354	0.5370	0.4820	0.4740
FST_1 2&7	0.0749	0.7050	0.7805	0.6155				0.7945	
FST 1 2&8	0.0542	0.2035	0.3205	0.0265*					
FST_1 2&9	0.0907	0.7315	0.8325	0.2305					
FST 1 2&10	0.1651	0.5355	0.6355	0.2820					
FST_1 3&4	0.1101	0.6240	0.5760	0.6915					
FST 1 3&5	0.1013	0.2600	0.2280	0.3755					
FST_1 3&6	0.1040	0.1395	0.2135	0.0535					
FST 1 3&7	0.1028	0.4565	0.4895	0.5560					
FST_1 3&8	0.1005	0.2960	0.3555	0.0965					
FST 1 3&9	0.1188	0.5270	0.5800	0.2300					
FST_1 3&10	0.1512	0.1900	0.2225	0.1115					
FST 1 4&5	0.1028	0.5910	0.5430	0.5820					
FST_1 4&6	0.1153	0.1775	0.2775	0.0500*					
FST 1 4&7	0.1084	0.5515	0.5675	0.4335					
FST_1 4&8	0.1176	0.4840	0.5660	0.0945					
FST 1 4&9	0.1555	0.8165	0.8645	0.3765					
FST_1 4&10	0.2220	0.6350	0.6645	0.3615					
FST 1 5&6	0.1278	0.1265	0.2110	0.0475*					
FST_1 5&7	0.1328	0.4940	0.5215	0.4360					
FST 1 5&8	0.1171	0.2375	0.2890	0.0715					
FST_1 5&9	0.1515	0.5760	0.6245	0.2060					
FST 1 5&10	0.2248	0.4400	0.4955	0.2300					
FST_1 6&7	0.1470	0.3030	0.4825	0.1175					
FST 1 6&8	0.0674	0.0560	0.1360	0.0190*					

Annexe 10. Valeurs des paramètres démographiques obtenus pour le scénario 5, les valeurs entre crochets correspondent aux valeurs modales. Les temps de divergence de t1 à t5 (du plus récent au plus ancien) sont évalués en nombre de générations. Les valeurs qui débutent par N correspondent aux tailles efficaces des populations, r1 = taux de mélange entre les populations B et JK ; μ_{mic} = taux de mutation des locus microsatellites, pmic = le taux de répétition des motifs microsatellites et snimic = le taux d'insertion d'un seul nucléotide







Annexe 11. Configurations et résultats des expérimentations sur le choix de partenaire

Nombre de pontes								
Conditions		JH13	JH16	Total	proba		Ecart binom	commentaire
Led	JH13	2	11	13	0,5	FAUX	0,0095	OUI
	JH16	5	10	15	0,5	FAUX	0,0916	NON
Fluo	JH13	3	10	13	0,5	FAUX	0,0349	OUI
	JH16	3	12	15	0,5	FAUX	0,0139	OUI
UV	JH13	1	10	11	0,5	FAUX	0,0054	OUI
	JH16	1	12	13	0,5	FAUX	0,0016	OUI

Conditions		Sp1	Sp2	Total	proba		Ecart binom	commentaire
UV	Sp1	14	1	15	0,5	FAUX	0,0005	OUI
	Sp2	1	11	12	0,5	FAUX	0,0029	OUI
Led		JH13	JH4	Total	proba		Ecart binom	commentaire
	JH13	7	9	16	0,5	FAUX	0,1746	NON
	JH4	5	6	11	0,5	FAUX	0,2256	NON
UV		JH13	JH18	Total	proba		Ecart binom	commentaire
	JH13	7	5	12	0,5	FAUX	0,1934	NON
	JH18	9	2	11	0,5	FAUX	0,0269	OUI

Nombre total de pontes 157