



Laboratoire Écologie & Biologie des Interactions  
UMR CNRS 7267  
Equipe Ecologie Evolution Symbiose



## Projet : Amélioration des connaissances sur les espèces aquatiques sensibles

Convention N° 049-06-2021

### Sous la direction scientifique de :

- Frédéric GRANDJEAN (Laboratoire EBI – Université de Poitiers)
- Thomas BAUDRY (Laboratoire EBI – Université de Poitiers)



## Contexte général

Ce projet se place dans le cadre de l'amélioration des connaissances sur trois espèces aquatiques, d'une importance écologique majeure en Martinique, pour lesquelles des plans de sauvegarde sont envisagées très prochainement (inscription sur arrêté ministériel de protection de faune notamment) :

- **Le poisson gale** (*Anablepsoides cryptocallus*) : cette espèce est la seule espèce de poisson d'eau douce endémique stricte de la Martinique. Elle affectionne particulièrement les zones humides, de plus ou moins grandes tailles (fossés, mares et bras morts de cours d'eau), avec de faibles courants et une forte végétalisation des rives. Malgré les fortes pressions anthropiques sur ces milieux (curages ou assèchements) et son statut d'endémique stricte de Martinique pour un poisson d'eau douce, *A. cryptocallus* ne bénéficie pas actuellement de statut de protection. Deux études successives (menées par Biotope (2020) et par Baudry *et al.* (2023)) ont permis de mieux connaître son aire de distribution avec la découverte de nouvelles populations notamment liées à l'utilisation de l'ADN environnemental, sans pour autant être capable d'estimer les densités en présence, ni l'état de santé de ces populations. Ces études ont amélioré de manière considérable les connaissances sur le poisson gale, portant à 10 stations connues (Biotope, 2020) puis 13 (Baudry *et al.*, 2023) (contre seulement 5 auparavant).
- **Le killi des mangroves** (*Kryptolebias marmoratus*) : cette espèce appartient à la famille des Rivulidae et occupe les mangroves du bassin Caraïbéen, du Sud de la Floride et celles du Brésil. Bien que très répandu dans cette zone (Tatarenkov *et al.*, 2007; Avise & Tatarenkov, 2015), cette espèce n'a été détectée que très récemment en Martinique (*Communication personnelle*, Alexandre Arqué et Nicolas Buisson, 2020). Sa présence en Martinique pourrait être un atout supplémentaire pour la protection de son milieu, fortement menacé par les activités anthropiques.
- **L'anguille américaine** (*Anguilla rostrata*) : l'anguille américaine est une espèce catadrome, placée sur liste rouge IUCN depuis 2017 et bénéficiant d'un Plan National d'Action. A ce jour, les suivis des stations mis en place par la Directive Cadre sur l'Eau pour inventorier les communautés piscicoles par pêche électrique ainsi que les piégeages par nasse effectués dans le cadre de l'étude de Baudry *et al.* (2021) n'ont permis de caractériser sa présence que sur très peu de station. Selon Lim *et al.* (2002) qui correspond au dernier inventaire concernant cette espèce, les populations semblent en nette régression. Parmi les causes énoncées, la rupture de continuité écologique, sur de nombreuses rivières de Martinique (avec la construction de seuils et de passages à gués), pourrait être l'une des causes majeures de cette régression : la plupart de ces ouvrages ne sont pas aménagés pour permettre la dévalaison ou montaison de ces espèces amphihalines, les empêchant ainsi de réaliser leur cycle de vie. La pollution des milieux aquatiques peut également avoir un effet néfaste sur la santé de ces espèces. Certaines molécules toxiques, largement utilisées dans l'agriculture ou l'industrie,

sont connues pour être retrouvées dans les milieux aquatiques (et notamment les rivières), où elles vont s'accumuler dans la chaîne trophique. Ces produits peuvent avoir des effets au niveau physiologique (perturbateurs endocriniens) ou encore provoquer des troubles de la reproduction et donc affecter le recrutement des juvéniles.

## Objectifs

Ce projet a deux objectifs principaux :

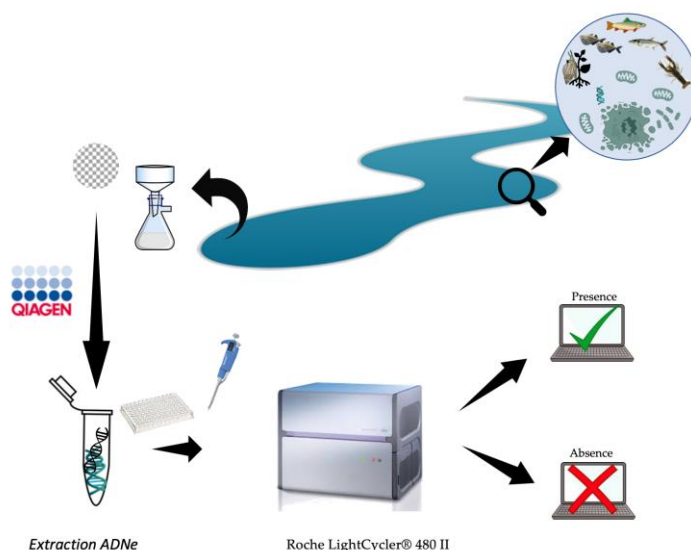
- 1) Améliorer la connaissance sur la distribution de chacune de ces espèces, par l'utilisation de la méthode ADN environnemental (*A. rostrata*) et par pêche traditionnelle (à l'épuisette; *A. cryptocallus* et *K. marmoratus*)
- 2) Améliorer la connaissance sur la diversité génétique de ces espèces grâce au séquençage d'un fragment (*A. rostrata*) ou de la totalité (*K. marmoratus*) du génome mitochondrial et du développement de marqueurs génétiques nucléaires « les marqueurs microsatellites » chez *A. cryptocallus* pour étudier l'isolement des populations. Ceci permettra d'inférer sur l'histoire évolutive de ces espèces (génome mitochondrial) ainsi que les flux migratoires entre populations.

## Méthodologies

### 1. L'ADN environnemental

#### a. Prélèvements ADNe

La méthodologie ADN environnemental (ADNe) se base sur le principe que chaque individu va libérer dans le milieu de l'ADN, issu du mucus, de fragments de peau, d'urine ou de fèces qui va pouvoir être collecté à travers un prélèvement d'eau, puis analysé permettant d'identifier l'espèce à laquelle appartient cet ADN (Ficetola *et al.*, 2008; Thomsen & Willerslev, 2015) (Figure 1).



**Figure 1.** Schéma synthétique de la méthodologie ADN environnemental, du prélèvement d'eau jusqu'à l'identification par PCR quantitative en laboratoire.

Les prélèvements d'eau ont été effectués selon le protocole décrit par Baudry *et al.* (2021). L'eau est collectée d'une berge à l'autre de la rivière dans une bouteille plastique stérile en utilisant des gants (Coward *et al.*, 2018). L'eau est ensuite versée dans une unité de filtration (Nalgene™, Lawson Handley *et al.*, 2019) avec des filtres en nitrocellulose (Sartorius 47mm de diamètre et 0.45µm de taille de pores) et la pompe à vide est engagée (Figure 2). La filtration se fait jusqu'à ce que le filtre soit saturé par les matières en suspension présentes dans l'eau. Le volume est alors noté, le filtre est plié en quatre et préservé dans des tubes remplis d'éthanol absolu de qualité moléculaire. Trois répliques biologiques (trois filtres) sont collectés par station.



**Figure 2.** Unité de filtration Nalgene™ connectée à la pompe à vide, afin de filtrer l'eau pour l'étude ADNe

Pour éviter toute contamination entre station, la totalité du matériel est décontaminé en utilisant de la Javel 20% après chaque station et rincé abondamment à l'eau du robinet. Aussi, un échantillon de contrôle (1000 mL d'eau distillée) est filtré de la même manière que décrite précédemment avant chaque prélèvement de terrain constituant ainsi un contrôle négatif entre chaque station afin d'éviter les possibles faux positifs entre stations. Tous les échantillons sont stockés dans une glacière jusqu'au retour au laboratoire, où ils seront stockés à -20°C avant analyses.

### *b. Extraction d'ADNe*

Toutes les extractions d'ADNe (à partir des filtres, N = 150) sont réalisées dans des salles dédiées à cet effet, où les paillasse sont désinfectées chaque nuit par traitement UV, afin d'éviter tout risque de contamination. Les outils (ciseaux et pinces) sont également stérilisés entre chaque échantillon, en utilisant de la Javel 30%.

L'extrait d'ADN à partir des filtres se fait également avec le kit commercial Qiagen DNeasy® Blood and Tissue Kit, suivant le protocole modifié par Baudry *et al.* (2021). Brièvement, le filtre est coupé en deux (l'autre moitié servant d'échantillon de secours, en cas de besoin), puis en petits morceaux, dans un tube Eppendorf 2 mL. Lors de chaque étape, jusqu'à l'étape de lavage (AW1), chaque quantité de réactif sera multipliée par 2.5 et enfin l'élution finale (Buffer AE) se fera dans 2 x 40 µL. Ces modifications permettent d'augmenter les rendements d'extraction dans le cadre de protocoles destinés aux analyses ADNe.

Les rendements d'extraction sont ensuite mesurés grâce au spectrophotomètre NanoDrop® 1000 et les échantillons d'ADN isolés sont placés à -20°C, jusqu'aux analyses.

### c. Amplifications ADNe et analyses

Les amplifications ADNe se font par PCR quantitative (en temps réel), grâce à un thermocycleur Roche LightCycler® 480 II aux conditions optimales déterminées. Deux réplicas par filtre sont réalisés, ce qui correspond à six amplifications par station (trois filtres par station et deux réplicas par filtre).

Chaque réaction se fait dans 25 µL de volume final : 12.5µL de TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies, Applied Biosystems), 2.5 µL de chaque amorce, 1 µL de sonde, 1.5 µL d'eau stérile et 5 µL d'échantillon testé. Chaque plaque de 96 puits contient 4 échantillons contrôle (réactif auquel de l'eau est ajouté) afin d'attester d'une possible contamination durant l'amplification. Les témoins négatifs *in-situ* (eau distillée filtrée entre chaque station) sont, quant à eux, traités en dupliqua.

Des courbes standard, générées en procédant à des dilutions en série à partir d'ADN extrait directement des individus, sont également intégrées afin de vérifier la qualité des produits amplifiés. Conventionnellement, un signal est considéré comme positif lorsque le nombre de cycles d'amplification (Ct Value) n'excède pas 42 (Agersnap *et al.*, 2017) et le site est considéré comme abritant l'espèce ciblée si un réplica sur les six testés est positif (Bedwell & Goldberg, 2020).

La sensibilité de la méthode est déterminée, selon les Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) Guidelines définies par (Bustin *et al.*, 2009), en calculant les Limites de Détection (LOD) et de Quantification (LOQ), grâce à la méthode de Klymus *et al.* (2019). Pour cela, les mêmes dilutions en série que celles utilisées précédemment sont analysées en 10 réplicas et les résultats sont intégrés dans le modèle de Klymus *et al.* (2019), avec les paramètres « Best » dans les fonctions *LOD.FCT* et *LOQ.FCT*, avec un seuil de 0.7 dans la fonction *LOQ.threshold* et un intervalle de confiance de 95%. Brièvement, la LOD correspond à la concentration minimale à laquelle l'ADNe peut être détecté et la LOQ correspond à la concentration minimale à partir de laquelle une quantification est possible (Mauvisseau *et al.*, 2019).

## 2. Étude génétique

### a. Capture des individus et prélèvement d'ADN

Les captures des individus, notamment du poisson gale (*A. cryptocallus*) et du killi (*K. marmoratus*) ont été réalisées de deux manières différentes : de manière passive, en déposant une épumette appâtée au fromage pendant quelques minutes dans une zone calme, proche de la berge et des racinaires (Figure 3A), soit de manière active, en allant fouiller les différents substrats et racinaires, jugés propices à l'accueil des individus (Figure 3B).





**Figure 3.** A) Pêche passive à l'épuisette appâtée au fromage et déposée au bord de la rivière. B) Pêche active, à l'épuisette, en fouillant les racinaires et substrats. C) Individus *Anablepsoides cryptocallus* capturés et stockés dans un aquarium de terrain, en attendant d'être prélevés. D) Prélèvement de mucus, au moyen d'un coton tige.

Une fois capturés, les individus sont stockés dans un aquarium de terrain (Figure 3C), avant le prélèvement de mucus, au moyen d'un coton-tige (Figure 3D). Cette méthode de prélèvement s'avère être particulièrement intéressante, car elle permet de collecter suffisamment d'ADN pour réaliser des analyses génétiques, sans pour autant mutiler les spécimens, comme ce peut être le cas lors d'un prélèvement de bout de nageoire, classiquement effectué chez les poissons.

Concernant l'anguille américaine (*A. rostrata*), sa capture s'avère compliquée. Plusieurs tentatives ont été réalisées à la nasse, de manière opportuniste, lors des travaux de thèse menés par Thomas Baudry (2019-2022). Une seule anguille avait été capturée sans que des prélèvements soient effectués (rivière Galion à Bassignac). D'autres inventaires ont été mis en place récemment par pêche électrique, dans le cadre d'un projet de métabarcoding financé par l'Office Français pour la Biodiversité (OFB), l'Office de l'Eau de Martinique (ODE) et la Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Martinique (DEAL) (voir *Projet InCrust*). Ils ont permis de valider d'un part les données obtenues par ADNe et d'autre part de faire des prélèvements de mucus.

### b. Extraction d'ADN (à partir des coton-tiges)

Tout comme pour les filtres, les extractions d'ADN à partir des coton-tiges (N = 175) sont réalisées dans des salles dédiées à cet effet, où les paillasses sont désinfectées chaque nuit par traitement UV, afin d'éviter tout risque de contamination. Les outils (ciseaux et pinces) sont également stérilisés entre chaque échantillon, en utilisant de la Javel 30%.

Brièvement, en suivant le protocole de Baudry *et al.* (2021), le coton est découpé en morceau et placé dans un tube à sec, pendant 15 min, afin d'évaporer l'éthanol. L'extraction d'ADN se fait ensuite grâce au kit commercial Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit, en suivant les

recommandations du fabricant. Les rendements d'extraction sont ensuite mesurés grâce au spectrophotomètre NanoDrop® 1000 et les échantillons d'ADN isolés sont placés à -20°C, jusqu'aux analyses.

### c. Séquençage mitochondrial

Le séquençage d'une portion du gène mitochondrial se fait par la méthode dite « Sanger », permettant d'obtenir les séquences ADN, de manière individuelle pour chaque échantillon, par PCR (Polymerisation Chain Reaction). Pour cela, l'ADN de chaque individu est amplifié par PCR en utilisant le couple d'amorces universelles ciblant un fragment d'environ 350 paires de bases du gène mitochondrial Cytochrome b (H15149/L14841) (Kocher *et al.*, 1989), en suivant le protocole de Baudry *et al.* (2020). Les amplicons sont ensuite séquencés grâce au séquenceur automatique ABI PRISM 3130xl (PE Applied Biosystems, Foster City, USA), sur le plateau technique du laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions (Poitiers).

Nous avons eu l'opportunité de réaliser un séquençage complet de l'ADN mitochondrial d'un specimen au département *School of Life and Environmental Sciences* de l'Université de Deakin (Australie), qui possède une expertise dans ce domaine.

Les séquences génétiques, une fois générées, sont assemblées, nettoyées et analysées grâce au logiciel informatique Geneious Pro (Kearse *et al.*, 2012).

### d. Séquençage et analyses microsatellites

La recherche de microsatellites a été réalisée via la plateforme de séquençage de l'INRAE à Bordeaux, en appliquant la méthode SSRseq très récemment développée par Lepais *et al.* (2020). 48 loci microsatellites ont été obtenus (séquencés > 20X), dont 25 loci polymorphes validés, et très peu de données manquantes (< 5%) (parmi les plus faibles reportés par la méthode).

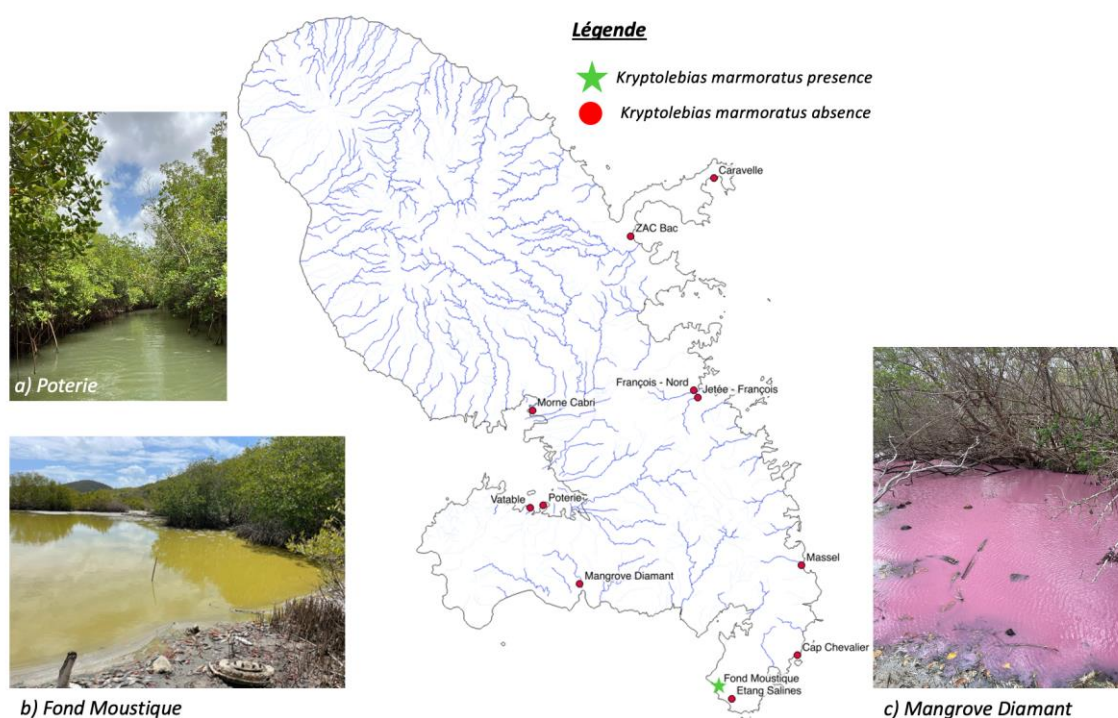
Le nombre total d'allele (TNA), le nombre moyen d'allele (MNE), l'index de polymorphisme (PIC) et les taux d'hétérozygotie attendue (HE) et observée (H0) ont été calculés avec Excel-microsatellite-toolkit version 3.1 (Park, 2001). L'indice de fixation de Wright (FIS) pour l'ensemble des microsatellites a été calculé avec le logiciel FSTAT version 2.9.4 (Goudet, 2003). Les tests exacts pour estimer l'équilibre d'Hardy-Weinberg ont été effectués avec les chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC) simulation (5000 iterations, 100 batches et un dememorization number de 10,000) du logiciel GENEPOP version 4.7.5 (Rousset, 2008).

La structure génétique ainsi que la proportion de mélange ont été estimés avec l'algorithme Bayésien du logiciel STRUCTURE version 2.3.4 (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000) pour 10 réplifications de  $K = 1$  à  $K = 11$ . La période d'apprentissage a été effectuée avec 25,000 itérations suivi par 100,000 MCMC répétitions pour chaque run. La valeur  $K$  a été déterminée par la probabilité logarithmique des  $(\ln P(D))$  basée sur le taux de variation de  $\ln P(D)$  entre 2  $K$  successifs (Earl, 2012). La valeur optimale de  $K$  a été prédite selon la méthode de simulation Evanno *et al.* (2005), en utilisant le logiciel STRUCTURE HARVESTER version 0.6.94 (Earl, 2012).



### Le killi des mangroves (*Kryptolebias marmoratus*)

Bien que très répandu au niveau de la zone Caraïbienne (Tatarenkov *et al.*, 2017), le killi des mangroves semble être beaucoup plus rare en Martinique. Il a été capturé sur une unique station (Anse Moustique) en 2020 et signalé sur trois autres (Morne Cabri, Etang des Salines et ZAC Bac) par des sources extérieures, sans pouvoir les recapturer (Figure 4). Ceci pourrait s'expliquer par un biais d'échantillonnage car la probabilité de capture reste faible et ou par une possible confusion morphologique avec une autre espèce, la golomine, partageant son environnement (*Poecilia vivipara*). Bien que l'on est observé une fermeture de la mangrove de l'Anse Moustique au Carême 2022 provoquant l'asphyxie de nombreux spécimens de poisson (Figure 4b), 3 spécimens de *K. marmoratus* ont été capturé au cours du mois de juin suivant.



**Figure 4.** Cartographie des stations pêchées à l'épuisette à la recherche du killi des mangroves (*Kryptolebias marmoratus*) ainsi que des photographies de son habitat préférentiel. a) Village de la Poterie ; b) Fond Moustique, où l'espèce a été capturée à plusieurs reprises ; et c) la mangrove rose du Diamant.

Une portion du gène mitochondrial (Cytb) a été séquencé grâce aux amorces généralistes et la molécule totale du génome mitochondrial est en cours de d'assemblage au département *School of Life and Environmental Sciences* de l'Université de Deakin (Australie). Ces résultats permettront d'alimenter les bases de données de référence mais également d'en savoir plus sur l'histoire évolutive de cette espèce, en les alignant sur les résultats déjà obtenus dans d'autres régions du monde (Tatarenkov *et al.*, 2017) (Figure 5).



Le projet en cours (*InCrust*), visant à développer la méthodologie métabarcoding pour des inventaires de biodiversité permettra peut-être de mettre en évidence de nouvelles zones de présence de cette espèce à l'avenir.

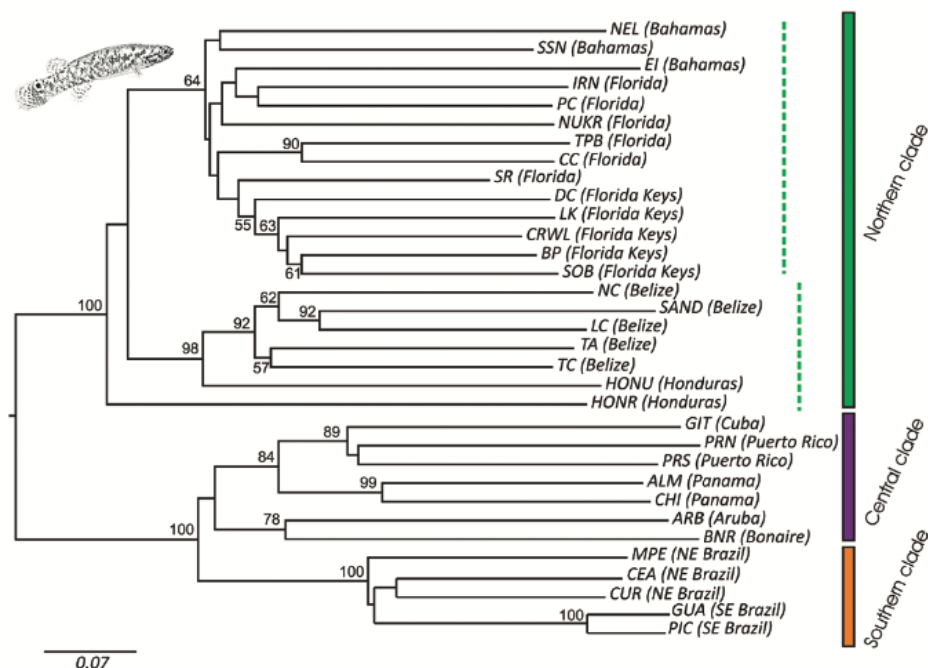
### Séquences génétiques obtenues grâce au séquençage Sanger et les amorces FishCOI

#### *Kmarmoratus\_AnseMoustique1*

>CTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCAGGGGAGAACATAGCCCACGAAAGCAGTTATTATTAC  
GAGTAGAAGTAAGATTACTCCTGCGCTTCATGCTTCTTTGTTAAGGTAAGAGCCATAGTAAAGACCTC  
GCCCCGATGTGAAGATAGATGCAAATAAAAAAGAAAGAAGCGCCGTTTGCCTGAATACTTTCGAATTAG  
TCACCCATAATTTACGTCTCGGCAAATATGTACGACTGAAGAAAAGCTGTTGAGATGTCAGAGGTGT  
AGTGTRTTGCAAGAAATARGCCTGTKARAATTTGGAGGGCTAAGCRGAGACTTAGGAGGGAGCCAAA  
ATTCATCATGC (349 bp)

#### *Kmarmoratus\_AnseMoustique2*

>CAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCAGGGGAGAACATAGCCCACGAAAGCAGTTATTATTACGAG  
TAGAAGTAAGATTACTCCTGCGCTTCATGCTTCTTTGTTAAGGTAAGAGCCATAGTAAAGACCTCGCC  
CGATGTGAAGATAGATGCAAATAAAAAAGAAAGAAGCGCCGTTTGCCTGAATACTTTCGAATTAGTCA  
CCCATAATTTACGTCTCGGCAAATATGTACGACTGAAGAAAAGCTGTTGAGATGTCAGAGGTGTAGT  
GTATTGCAAGAAATAGGCCTGTTAAAATTTGGAGGGCTAAGCAGAGACTTAGGAGGGAGCCAAAATT  
TCATCATGCTGAGATGTTGGA (358 bp)



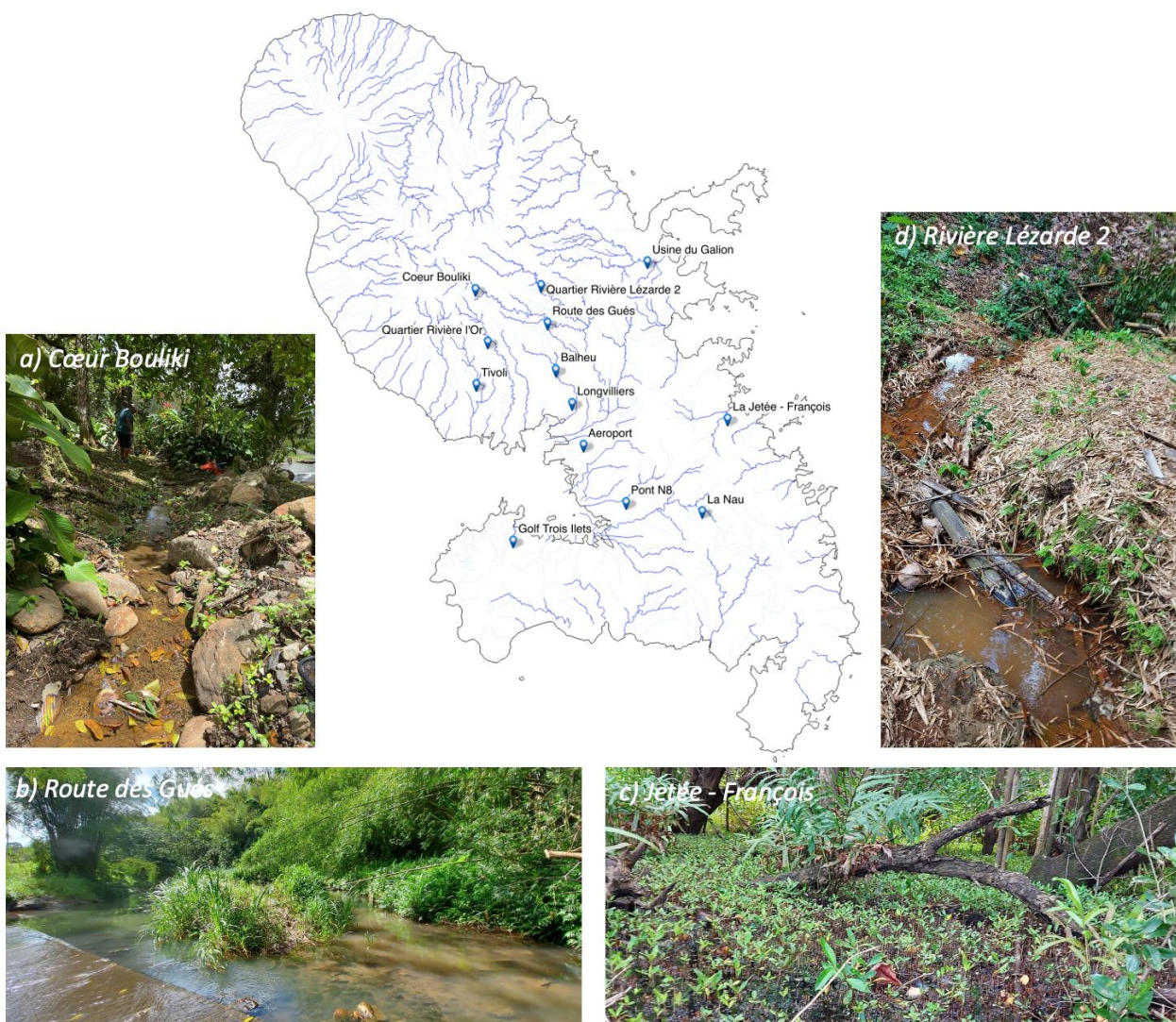
**Figure 5.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse de 33 populations de killi des mangroves (*Kryptolebias marmoratus*) à travers le bassin caribéen (du Sud de la Floride au Nord du Brésil). Tatarenkov et al. (2017) mettent en évidence ici la présence de trois clades principaux et l'alignement de nos résultats avec ces données nous permettrons d'inférer sur l'histoire évolutive des spécimens présents en Martinique.



### Le poisson gale (*Anablepsoides cryptocallus*)

La précédente étude « *Etude de la répartition du poisson gale (*Anablepsoides cryptocallus*), endémique de Martinique, par la technique ADN environnemental* » a permis de mettre en évidence sa présence sur 27 sites, grâce à la technique ADNe. Celle-ci a fait l'objet d'un rapport publié sur l'observatoire de l'eau de Martinique, ainsi que d'un article scientifique dans une revue internationale, spécialisée dans la conservation des espèces en milieu aquatique (*Aquatic conservation : Marine and freshwater ecosystems*).

Ceci a permis d'identifier de nouvelles stations et d'orienter les prélèvements pour l'étude génétique. Au total, 168 individus ont été capturés sur 13 stations, avec un nombre d'individu compris entre 1 individu (Aval Galion) et 20 individus (Balheu – Station nouvellement décrite en 2022) (Figure 6).



**Figure 6.** Cartographie des 13 stations échantillonnées pour l'étude génétique du poisson gale (*Anablepsoides cryptocallus*) ainsi que des photographies de son habitat. a) Cœur Bouliki ; b) Route des Gués ; c) Jetée – François ; et d) Quartier Rivière Lézarde 2.

### Variabilité des loci microsatellites

La méthode de prélèvement non-destructrice s'avère efficace, avec de bons rendements en termes d'extraction d'ADN ( $> 30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) et de séquençage.

Au total, 206 allèles ont été observés dans les populations de *A. cryptocallus*, avec une moyenne de  $8.24 (\pm 4.59)$  allèles par locus (Table 1). Le locus ACRY\_012 montre le plus grand nombre d'allèle (27). L'index de polymorphisme (PIC) par locus est compris entre 0.058 (ACRY\_047) et 0.864 (ACRY\_012) avec une moyenne de  $0.504 (\pm 0.192)$  (Table 1). Le coefficient de consanguinité dans les populations (FIS) par locus est compris entre -0.138 (ACRY\_041) et 0.116 (ACRY002 and ACRY\_010), avec une moyenne de  $0.018 (\pm 0.071)$ . Tous les loci sont à l'équilibre d'Hardy-Weinberg avant et après correction de Bonferroni (Table 1).

### Diversité génétique des populations

Notre analyse indique que les populations de Bouliki ( $1.64 \pm 0.76$ ) et la Lézarde ( $1.64 \pm 0.81$ ) montrent le plus faible nombre d'allèles, tandis que les populations du Balheu ( $4.20 \pm 2.12$ ) et Ducos ( $4.20 \pm 1.78$ ) ont la plus forte valeur  $N_a$  (Table 2). L'hétérozygotie attendue (HE) est plus forte que l'hétérozygotie observée (HO) dans 4 des 11 populations (Aéroport, Bouliki, Golf and LaNau). Pour l'ensemble des populations, l'hétérozygotie moyenne observée est de  $0.375 (\pm 0.135)$ , allant de 0.180 ( $\pm 0.026$ ) pour la population de Bouliki à  $0.577 (\pm 0.024)$  pour la population de Ducos. Les valeurs de FIS sont négatives dans 7 populations (Balheu, Blanche, Ducos, François, Lézarde, Longvilliers and Tivoli) sur les 11 étudiées, comprises entre -0.091 (Longvilliers) et 0.078 (Aéroport). Seule la population du Golf dévie significativement de l'équilibre d'Hardy-Weinberg avant et après correction de Bonferroni (Table 2).

**Table 1.** Indices de diversité des 25 loci utilisés dans cette étude. (FS : Taille des fragments ; TNA : Nombre total d'allèles ; MNE : Nombre moyen d'allèles effectifs entre population ; PIC : Polymorphism Index Content ;  $F_{IT}$  : overall inbreeding coefficient ;  $F_{IS}$  : Wright's inbreeding coefficient ; dHWE : variation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg, et dHWE(Bc) variation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg après correction de Bonferroni (NS : Non Significatif).

Locus	FS (bp)	TNA	MNE	PIC	$F_{IT}$	$F_{IS}$	dHWE	dHWE(Bc)
ACRY002	101-109	9	1.60	0.531	0.399	0.116	NS	NS
ACRY_003	101-113	11	1.52	0.536	0.427	0.032	NS	NS
ACRY_006	101-107	7	1.59	0.451	0.296	-0.024	NS	NS



ACRY_007	101-112	12	1.98	0.703	0.279	-0.098	NS	NS
ACRY_008	101-106	5	1.19	0.158	0.160	0.011	NS	NS
ACRY_010	101-104	4	1.43	0.476	0.532	0.116	NS	NS
ACRY_012	101-128	27	2.44	0.864	0.289	-0.017	NS	NS
ACRY_014	101-109	9	1.53	0.610	0.491	0.000	NS	NS
ACRY_015	101-110	10	1.99	0.715	0.328	-0.031	NS	NS
ACRY_017	101-106	6	1.62	0.546	0.285	-0.123	NS	NS
ACRY_019	101-109	7	1.64	0.604	0.424	0.049	NS	NS
ACRY_020	101-105	5	1.76	0.615	0.321	-0.058	NS	NS
ACRY_022	102-108	7	1.68	0.571	0.275	-0.047	NS	NS
ACRY_024	101-107	7	2.05	0.617	0.231	-0.065	NS	NS
ACRY_035	101-106	6	1.58	0.460	0.248	-0.057	NS	NS
ACRY_036	101-105	5	1.24	0.234	0.218	0.012	NS	NS
ACRY_037	101-108	8	1.81	0.533	0.166	-0.020	NS	NS
ACRY_041	101-106	6	1.27	0.254	0.041	-0.138	NS	NS
ACRY_043	101-110	10	1.27	0.318	0.269	0.008	NS	NS
ACRY_047	101-103	3	1.04	0.058	0.216	0.098	NS	NS
ACRY_050	101-112	12	2.19	0.730	0.327	0.051	NS	NS
ACRY_051	101-107	7	1.67	0.500	0.272	-0.008	NS	NS
ACRY_053	101-107	7	1.66	0.471	0.142	-0.134	NS	NS
ACRY_055	101-106	6	1.27	0.334	0.417	-0.083	NS	NS
ACRY_057	101-110	10	2.24	0.710	0.247	-0.046	NS	NS
<b>Mean</b>		8.24	1.65	0.504	0.292	-0.018		
<b>Standard Deviation</b>		4.59	0.35	0.192	0.112	0.071		

**Table 2.** Variabilité génétique de chaque population de *Anablepsoides cryptocallus*, en termes de tailles d'échantillons ( $N$ ), nombre moyen d'allèles ( $N_a$ ), hétérozygotie observée ( $H_o$ ) et attendue ( $H_E$ ), Wright's inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ), variation par rapport à l'équilibre de Hardy–Weinberg ( $dHWE$ ) et variation par rapport à l'équilibre de Hardy–Weinberg après correction de Bonferroni ( $dHWE(Bc)$ ). (NS: Non Significant; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Population	$N$	$N_a (\pm SD)$	$H_o (\pm SD)$	$H_E (\pm SD)$	$F_{IS}$	$dHWE$	$dHWE(Bc)$
------------	-----	----------------	----------------	----------------	----------	--------	------------

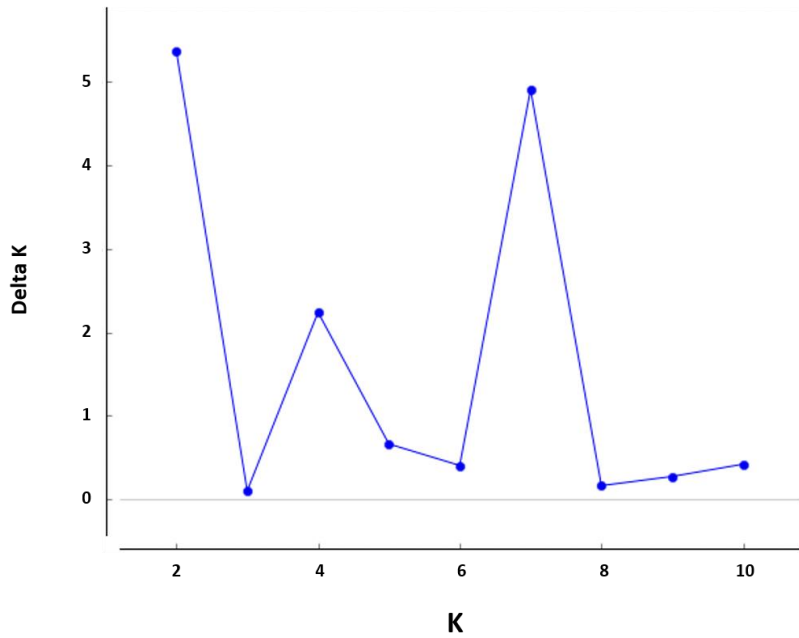


Aéroport	13	2.72 ( $\pm$ 1.28)	0.332 ( $\pm$ 0.026)	0.359 ( $\pm$ 0.047)	0.078	NS	NS
Balheu	18	4.20 ( $\pm$ 2.12)	0.520 ( $\pm$ 0.024)	0.511 ( $\pm$ 0.040)	-0.019	NS	NS
Blanche	12	2.24 ( $\pm$ 1.05)	0.360 ( $\pm$ 0.028)	0.335 ( $\pm$ 0.051)	-0.079	NS	NS
Bouliki	9	1.64 $\pm$ 0.76)	0.180 ( $\pm$ 0.026)	0.182 ( $\pm$ 0.044)	0.013	NS	NS
Ducos	17	4.20 ( $\pm$ 1.78)	0.577 ( $\pm$ 0.024)	0.552 ( $\pm$ 0.036)	-0.045	NS	NS
François	10	2.32 ( $\pm$ 0.99)	0.335 ( $\pm$ 0.030)	0.310 ( $\pm$ 0.051)	-0.085	NS	NS
Golf	14	2.96 ( $\pm$ 1.17)	0.381 ( $\pm$ 0.026)	0.403 ( $\pm$ 0.047)	0.057	***	**
LaNau	10	2.60 ( $\pm$ 1.15)	0.443 ( $\pm$ 0.032)	0.456 ( $\pm$ 0.053)	0.030	NS	NS
Lézarde	12	1.64 ( $\pm$ 0.81)	0.185 ( $\pm$ 0.023)	0.177 ( $\pm$ 0.046)	-0.044	NS	NS
Longvilliers	16	4.04 ( $\pm$ 1.72)	0.541 ( $\pm$ 0.025)	0.497 ( $\pm$ 0.045)	-0.091	NS	NS
Tivoli	17	2.08 ( $\pm$ 1.18)	0.268 ( $\pm$ 0.022)	0.256 ( $\pm$ 0.049)	-0.048	NS	NS

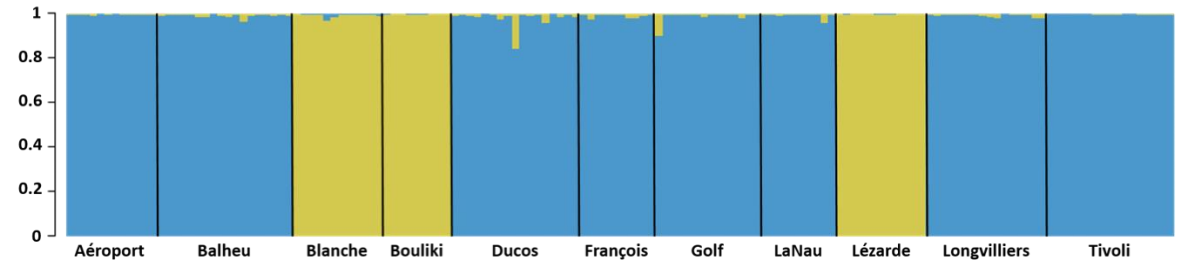
Suivant les critères d'Evanno *et al.* (2005) et les résultats du logiciel STRUCTURE, deux structurations semblent être possibles : K=2 (montrant la plus forte valeur de  $\Delta K = 5.37$ ) et K=7 (très proche, avec un  $\Delta K = 5$ ) (Figure 7).

Concernant le premier scénario (K=2), les populations de Blanche, Bouliki et Lézarde appartiennent au même groupe génétique (en jaune dans la Figure 8), le second groupe comprenant l'ensemble des autres populations, à savoir Aéroport, Balheu, Ducos, François, Golf, LaNau, Longvilliers et Tivoli (en bleu sur la Figure 8).

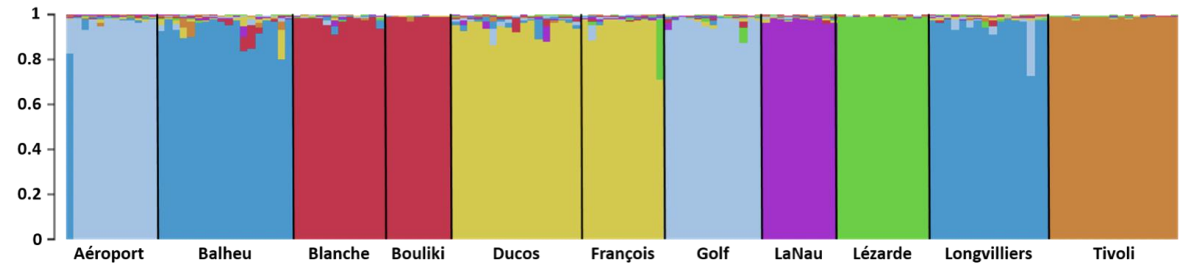
Si l'on se réfère à la structuration avec K=7 groupes, 4 groupes se distinguent, comprenant respectivement Aéroport et Golf (bleu clair), Balheu et Longvilliers (bleu foncé), Blanche et Bouliki (rouge), Ducos et François (jaune), puis 3 autres groupes comprenant chacun une seule population, LaNau (violet), Tivoli (orange) et Lézarde (vert) (Figure 9).



**Figure 7.** Delta K ( $\Delta K$ ) estimant le nombre de groupe (K) optimal, basé sur la méthode d'Evanno et al. (2005).



**Figure 8.** Structuration génétique, issu du logiciel STRUCTURE, pour un K=2, par une analyse de 148 individus sur 11 populations. Chaque population est délimitée par une ligne verticale et l'axe des ordonnées montre les coefficients d'assignation aux 2 groupes.



**Figure 9.** Structuration génétique, issu du logiciel STRUCTURE, pour un K=7, par une analyse de 148 individus sur 11 populations. Chaque population est délimitée par une ligne verticale et l'axe des ordonnées montre les coefficients d'assignation aux 7 groupes.

## Discussion des résultats

Les 25 marqueurs microsatellites mis au point ne montrent aucun écart par rapport à l'équilibre d'Hardy-Weinberg et sont donc parfaitement utilisables pour une étude de génétique des populations.

Ils montrent un taux de polymorphisme de faible à fort, avec un nombre d'allèles compris entre 3 et 27. Seule la population « Golf » montre un taux de consanguinité faiblement significatif, qui peut être dû à une faible taille de population ( $F_{is} = 0.05$ ). Les autres populations sont à l'équilibre ce qui est en accord avec l'hypothèse de grandes tailles de populations, limitant ainsi les phénomènes de dérive génétique au sein de celles-ci et pouvant donc réduire la variabilité génétique. L'analyse de structuration montre l'existence de deux groupes faiblement différenciés, avec une sous-structure présentant 9 groupes. Ces résultats sont en accord avec une évolution indépendante des populations due à un isolement des populations, appartenant à des bassins hydrographiques différents. Par exemple, les populations de Blanche et Bouliki, ainsi que Balheu et Longvilliers, appartiennent aux mêmes groupes, ce qui s'explique par leur appartenance au même bassin hydrographique. Ces résultats laissent supposer qu'il existe des flux de gènes entre ces populations à l'intérieur des bassins, et donc des migrations d'individus entre ces stations. Ces données sont intéressantes car elles mettent en évidence de premiers indices sur le comportement de *A. Cryptocallus*, notamment sur ses capacités de déplacement. Les distances de dispersion au sein d'un même bassin semblent, à minima, de 5km sur la rivière Blanche, comprenant les stations Bouliki et Blanche, et de plus de 3 km sur la rivière Longvilliers, comprenant les deux stations Balheu et Longvilliers.

La proximité génétique des populations de Ducos et François, ainsi que Golf et Aéroport, appartenant à des bassins versants différents, résulte probablement d'introductions anthropiques. En effet, le poisson gale est une espèce très appréciée en aquariophilie, car les mâles présentent des colorations variées, et cette activité est connue pour être la source de nombreuses introductions dans le milieu naturel, *via* des relâchers de spécimens. La station Aéroport est connue pour être une station historique de poisson gale, ce qui n'est pas le cas de la population du Golf, qui appartient au même groupe génétique. De plus, cette station (Golf) abrite de nombreuses espèces introduites (*Xiphophorus hellerii*, *Cherax quadricarinatus*, *Oreochromis mossambicus*, *Poecilia reticulata*) ce qui renforce notre hypothèse. D'un point de vue de génétique de la conservation, les populations de *A. cryptocallus* analysées semblent présenter des particularités génétiques propres et chacune devrait faire l'objet d'une attention particulière.

## L'anguille américaine (*Anguilla rostrata*)



### Tests méthodologiques

La méthode ADN environnemental a été développée pour cette espèce, en se basant sur les expérimentations menées par Chin *et al.* (2021), sur *A. rostrata*, aux Etats-Unis. Les amorces et la sonde utilisées ciblent un fragment de 156 paires de bases, du gène codant pour le cytochrome b :

Aros\_cytb\_506F (5'-CAGTCGACAACGCCACATTG-3')

Aros\_cytb\_656R (5'-GGGATTTTGTCTGCGTCGGA-3')

Aros\_cytb\_568 (6FAM 5'-GCCGGGGCCACAATGCTTCACCT-3' MGBNFQ)

Dans cette étude, les auteurs ont testé la spécificité des amorces, d'abord *in-silico*, c'est-à-dire grâce à des alignements de séquences sur logiciel, sur 97 autres espèces de poissons co-occurrentes, puis *in-vitro* sur 8 espèces co-occurrentes dans le fleuve du Bronx. Aucune amplification aspécifique n'a été reportée.

Tout d'abord, ces amorces ont été testées *in-vitro*, par alignement sur Geneious Pro (Kearse *et al.*, 2012), sur toutes les espèces (poissons et crustacés) retrouvées en Martinique, et se sont révélées spécifiques d'*A. rostrata*. Les autres espèces du genre *Anguilla* ont également été testées, pour éviter toute ambiguïté sur leur spécificité (Figure 10). Le set expérimental, et plus particulièrement la sonde fluorescente (en rouge sur la figure 10), semble bien spécifique à *A. rostrata*.



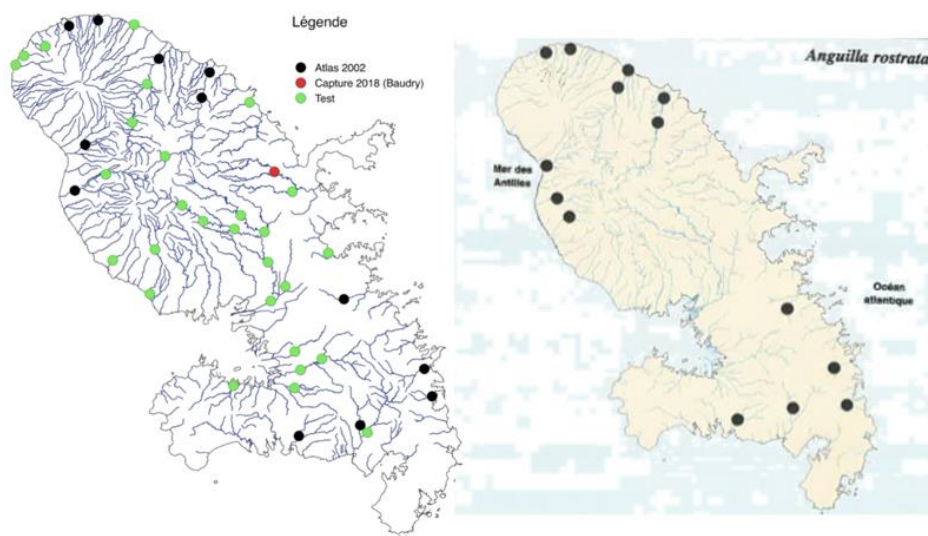
**Figure 10.** Alignement des séquences génétiques (cytochrome b) obtenus à partir d'individus du genre *Anguilla*, sous Geneious Pro. Les séquences ont été rapatriées à partir de GenBank et les numéros d'accèsion sont notés entre parenthèse à côté des noms d'espèces. Le set d'amorces et de sonde est visible en vert foncé (Forward), vert clair (Reverse) et rouge (Sonde fluorescente). Les annotations jaunes représentent des « mismatch » avec la base de référence, c'est-à-dire une erreur d'amplification (ici, 2 mismatches étaient autorisés dans les paramètres).



Les amorces montrant une haute-fidélité *in-silico*, elles ont ensuite été utilisées en PCR quantitative (test *in-vitro*) sur des extraits d'ADN isolés à partir d'échantillons de tissus de poissons collectés en Martinique (*Poecilla reticulata*, *Agonostomus monticola*, *Sycidium punctatum* et *plumieri*, *Oreochromis mossambicus*, *Eleotris perniger*, *Xiphophorus hellerii*), ainsi que sur des extraits d'ADN issus d'échantillons d'autres espèces du genre *Anguilla* (*A. anguilla*, *A. marmorata*, *A. mossambica*), fournis par le Muséum National d'Histoire Naturelle (Eric Feunteun, de la station de Dinard). Concernant les espèces co-occurentes en Martinique, aucune amplification aspécifique n'a été relevée. En revanche, les amorces semblent s'hybrider avec l'ADN extrait à partir des trois autres espèces d'anguilles testées, mais à des valeurs de Ct bien supérieures à celles de *A. rostrata* (> 38 pour les autres *Anguilla* vs. < 25 pour *A. rostrata*). Pour rappel, plus les valeurs de Ct obtenues sont faibles, plus l'amplification ADNe est efficace. L'utilité des amorces n'est donc pas à remettre en cause dans cette étude, étant donné que seule notre espèce cible (*A. rostrata*) est présente en Martinique.

### Stratégie d'échantillonnage

Au total, 42 stations ont été échantillonnées (Figure 11) dont 12 connues pour abriter l'anguille (11 stations provenant de l'Atlas de 2002 (Lim *et al.*, 2002) + 1, correspondant à une observation récente 2021), auxquelles s'ajoutent 27 stations jugées propices à la présence de cette espèce. Certaines rivières comme la Lézarde, le Lorrain et la Capot ont fait l'objet de plusieurs prélèvements en raison de la présence de passages à gué ou chaussées. Ces ouvrages rompent la continuité écologique et par conséquent la dispersion des espèces et les prélèvements, d'amont en aval, nous permettant donc d'évaluer les capacités de franchissement des anguilles.



**Figure 11.** Cartographie de présence de *Anguilla rostrata* en Martinique en 2002 (Lim *et al.*, 2002), suivant les prospections par pêche électrique (à droite); et des points de prélèvement ADN environnemental : en noir, les points suivant l'inventaire de 2002, en rouge, point où *A. rostrata* a été capturée à la nasse en 2018, et en vert, les stations « test » où la présence de l'anguille n'a jamais été observée.

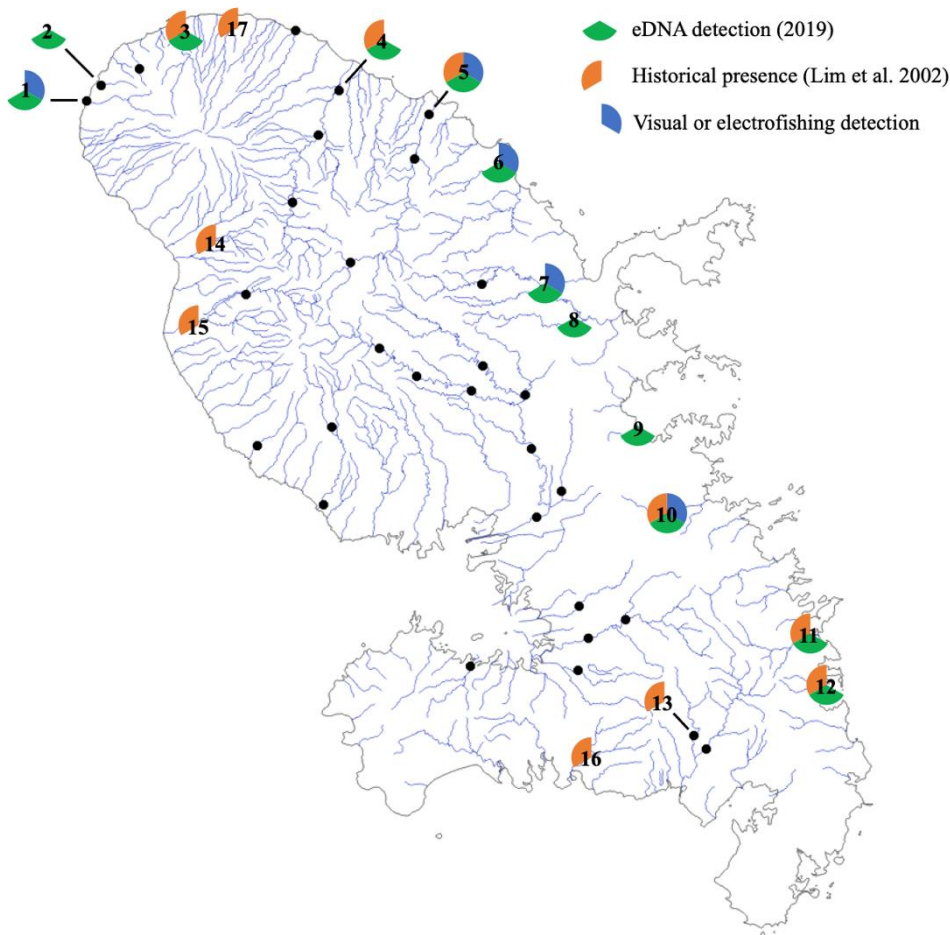
## Résultats et discussion

L'anguille américaine a été détectée sur 12 stations, avec des intensités de signaux ADNe variables (1 réplica qPCR et Ct = 40.87 pour Bassignac vs. 6 réplicas qPCR positifs sur 6 et une valeur de Ct moyenne = 36.745 pour Céron) (Figure 12 et Tableau 3). Ce nombre de 12 stations positives correspond à celui obtenu par Lim *et al.* (2002), lors des prospections par pêche électrique, menées dans le but de réaliser l'Atlas des poissons et crustacés d'eau douce de Martinique. Cependant, la méthodologie ADNe a permis de confirmer la présence de cette espèce sur 6 des 11 stations historiques (Grand'Rivière, Capot, Séguineau, François, Vauclin et Paquemar). L'absence de détection pour les 5 autres (Pont Madeleine, Saint-Pierre, Carbet, Oman et Macouba) est à approfondir (Figure 12 et Tableau 3). En revanche, 6 nouvelles stations ont été mise en évidence : Ceron, Couleuvre, Fonds Saint-Jacques, Bassignac, Fonds Desforts, Robert. Pour deux d'entre elles (Céron et Fonds Saint-Jacques), des pêches électriques effectuées cette année (Avril 2023) dans le cadre d'un projet *Incrust* ont confirmé leur présence. Des captures ont également été effectuées sur la station Séguineau, déjà connue pour abriter l'anguille en 2002. Ces mêmes pêches, sur les stations Pont Madeleine, Carbet et Oman (décrites en 2002), n'ont cependant pas permis de capturer *A. rostrata*. Toutes ces stations positives sont retrouvées sur la façade Atlantique et Nord-Caraïbes, ce qui peut s'expliquer de plusieurs manières :

- 1) Bien que les anguilles soient des espèces effectuant des migrations très importantes, l'exposition Atlantique de ces stations peut faciliter leur remontée dans les rivières, avec une ouverture directe sur les couloirs de migration vers la mer des Sargasses.
- 2) Ces rivières, notamment dans le Nord Atlantique sont très encaissées et peuvent être plus difficilement accessibles, rendant la pression de pêche et l'anthropisation des milieux moins fortes. Au contraire, les rivières de la côte Caraïbes ont subi une anthropisation forte (construction de gués et de chaussée) et l'embouchure de la rivière du Carbet est bien connue pour être l'une de zones de pêche aux titiris principale sur le territoire, pouvant impacter le recrutement des civelles.

Cette étude a permis mettre à jour la carte de distribution d'*A. rostrata* en Martinique, à partir de la méthodologie ADNe développée par Chin *et al.* (2021), et d'orienter les prospections pour la capture de cette espèce. Cette méthodologie s'est avérée être très efficace pour la détection de l'anguille, plus facile à mettre en place et moins coûteuse que la méthode par pêche électrique, mais elle n'a pas permis l'étude de ses exigences écologiques (pH, température, oxygène). En effet, aucune détection n'a été relevée en zone amont (de la rivière Lézarde, Capot et Lorrain) et cela nous laisse penser que les gués et chaussées ont un effet néfaste pour le franchissement des anguilles.

Cet outil ADNe s'avère donc être efficace pour la détection d'*A. rostrata* dans les Antilles et une étude globale au niveau des petites Antilles permettrait d'avoir une idée plus précise sur les traits d'histoire de vie de cette espèce. Il serait par exemple possible d'éclaircir les limites de dispersion de l'anguille, dans la partie Sud de son aire de répartition, en déployant la méthodologie sur l'île de Sainte-Lucie (limite Sud où l'espèce n'a jamais été contactée), ou encore d'investiguer l'état de santé des autres populations des petites Antilles, à la Dominique et en Guadeloupe



**Figure 12.** Cartographie des résultats de distribution de l'Anguille américaine (*Anguilla rostrata*) en Martinique, grâce à la méthode ADN environnemental (ADNe). Les points noirs représentent les stations échantillonnées (négatives) et les diagrammes de couleurs représentent les stations où l'anguille a été détectée : en vert, par ADNe, en orange, lors de l'inventaire mené par Lim et al. (2002) et en bleu visuellement (à la nasse ou par pêche électrique). Chaque station est numérotée et les résultats des analyses sont reportés dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Résultats des analyses PCR (ADNe) pour les 17 stations où l'anguille (*Anguilla rostrata*) a été détectée, depuis 2002. Chaque station est numérotée et nommée. La proportion de répliques de PCR quantitative (qPCR) sur 6 est rapportée, ainsi que la moyenne des Cycle threshold (Ct) (plus celle-ci est faible, plus la détection est forte)

Station number	Station name	qPCR positive replicate proportion	Ct mean (± s.d.)
1	Ceron	6/6	36.745 ± 0.71
2	Couleuvre	1/6	39.9
3	Grand'Rivière	5/6	38.55 ± 0.84
4	Capot	2/6	39.96 ± 0.21
5	Seguineau	2/6	38.185 ± 1.39
6	Fonds Saint-Jacques	1/6	36.41
7	Bassignac	1/6	40.87
8	Fonds Desforts	5/6	38.38 ± 1.45
9	Robert	5/6	38.03 ± 0.88
10	François	5/6	35.5 ± 1.33
11	Vauclin	1/6	39.1
12	Pacquemar	1/6	38.25
13	Pont Madeleine – Rivière Pilote	0/6	
14	Saint-Pierre	0/6	
15	Carbet	0/6	
16	Oman	0/6	
17	Macouba	0/6	

## Conclusion générale

La Martinique, au même titre que les autres territoires insulaires tropicaux, abrite une richesse impressionnante en termes de paysages et d'espèces qui les peuplent. Cependant, certaines de ces espèces s'avèrent être très vulnérables et les activités anthropiques grandissantes peuvent avoir un effet néfaste irréversible sur l'état de santé des populations. Ici, notre projet se focalise sur trois espèces sensibles de Martinique, le killi des mangrove (*K. marmoratus*), le poisson gale (*A. cryptocallus*) et l'anguille américaine (*A. rostrata*), pour lesquelles diverses méthodologies ont été développées pour investiguer l'état de santé et la présence des populations sur le territoire.

Le killi des mangroves, bien que très présent au niveau du bassin Caraïben, semble moins répandu au niveau de la Martinique. Une seule population a pour le moment été identifiée, dans la mangrove de l'anse Moustique, au Sud de la Martinique. Le caractère rare de cette espèce au niveau du territoire a été relevé et de futures prospections permettront peut-être de détecter l'espèce sur de nouvelles stations. Des analyses génétiques sont en cours, pour tenter d'en savoir plus sur l'histoire évolutive de cette espèce au niveau des Caraïbes.

Le poisson gale, unique espèce de poisson d'eau douce endémique de Martinique, bénéficie d'une plus large connaissance en termes de distribution au niveau de la Martinique, grâce à deux études récemment menées (publiées en 2019 et 2022-2023). Cette présente étude capitalise donc sur ces résultats déjà obtenus, afin d'investiguer l'état de santé des populations de *A. cryptocallus*, grâce au développement de la méthode « microsattellites ». Globalement, les populations semblent abriter un nombre satisfaisant d'individus, avec des preuves de migrations au sein d'un même bassin versant, démontrant donc une capacité de dispersion de plusieurs kilomètres. Cependant, l'isolement de certaines populations peut être, à termes, néfaste et celles-ci doivent donc faire l'objet d'une attention particulière.

Enfin, l'optimisation de la méthodologie ADNe a permis d'obtenir une nouvelle carte de distribution pour l'anguille américaine (*A. rostrata*) en Martinique, l'ancienne correspondant à l'atlas de Lim *et al.* (2002). L'espèce semble se concentrer sur la façade Atlantique, sur des rivières peu anthropisées, essentiellement en zone aval. Ces données, obtenues grâce à un échantillonnage plus large, montrent cependant une présence de cette espèce « top-prédatrice » sur un nombre restreint de stations. Nous avons pu confirmer sa présence sur certaines stations historiques et en décrire de nouvelles, mais *A. rostrata* semble avoir disparu de certaines rivières initialement prospectées en 2002. Une étude plus globale au niveau des petites Antilles pourrait être envisagée pour investiguer l'état de santé des populations, dans cette zone considérée comme la limite Sud de répartition de *A. rostrata*.



## Références bibliographiques

- Agersnap, S., Larsen, W.B., Knudsen, S.W., Strand, D., Thomsen, P.F., Hesselsøe, M., *et al.* (2017). Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS ONE*, 12(6), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179261>
- Avise, J.C. & Tatarenkov, A. (2015). Population genetics and evolution of the mangrove rivulus *Kryptolebias marmoratus*, the world's only self-fertilizing hermaphroditic vertebrate. *Journal of Fish Biology*, 87(3), 519–538. <https://doi.org/10.1111/jfb.12741>
- Baudry, T., Becking, T., Goût, J.P., Arqué, A., Gan, H.M., Austin, C.M., *et al.* (2020). Invasion and distribution of the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in Martinique. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 421(50). <https://doi.org/10.1051/kmae/2020041>
- Baudry, T., Mauvisseau, Q., Arqué, A., Goût, J.P., Delaunay, C., de Boer, H.J., *et al.* (2023). Environmental DNA survey to detect an endemic cryptic fish, *Anablepsoides cryptocallus*, in tropical freshwater streams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/aqc.3916>
- Baudry, T., Mauvisseau, Q., Goût, J., Arqué, A., Delaunay, C., Smith-ravin, J., *et al.* (2021). Mapping a super-invader in a biodiversity hotspot, an eDNA-based success story. *Ecological Indicators*, 126, 107637. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107637>
- Bedwell, M.E. & Goldberg, C.S. (2020). Spatial and temporal patterns of environmental DNA detection to inform sampling protocols in lentic and lotic systems. *Ecology and Evolution*, 10(3), 1602–1612. <https://doi.org/10.1002/ece3.6014>
- Biotope. (2020). *Étude d'amélioration de la connaissance sur le Poisson gale (Anablepsoides cryptocallus): distribution, état de conservation, mesures et recommandations.*
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., *et al.* (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chin, S.C., Waldman, J., Bednarski, M., Camhi, M., LaBelle, J. & Elizabeth Alter, S. (2021). Relating American Eel Abundance to Environmental DNA Concentration in the Bronx River. *North American Journal of Fisheries Management*, 41, 1141–1150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/nafm.10625>
- Cowart, D.A., Breedveld, K.G.H., Ellis, M.J., Hull, J.M. & Larson, E.R. (2018). Environmental DNA (eDNA) applications for the conservation of imperiled crayfish (*Decapoda: Astacidea*) through monitoring of invasive species barriers and relocated populations. *Journal of Crustacean Biology*, 38(3), 257–266. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruy007>
- Earl, D.A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359–361. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F. & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4(4), 423–5. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Goudet, J. (2003). Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Updated from Goudet (1995).
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., *et al.* (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

- Klymus, K.E., Merkes, C.M., Allison, M.J., Goldberg, C.S., Helbing, C.C., Hunter, M.E., *et al.* (2019). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2(3), 271–282. <https://doi.org/10.1002/edn3.29>
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F.X., *et al.* (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>
- Lawson Handley, L., Read, D.S., Winfield, I.J., Kimbell, H., Johnson, H., Li, J., *et al.* (2019). Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England’s largest lake. *Environmental DNA*, 1(1), 26–39. <https://doi.org/10.1002/edn3.5>
- Lepais, O., Chancerel, E., Boury, C., Salin, F., Manicki, A., Taillebois, L., *et al.* (2020). Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. *PeerJ*, 2020(3), 1–28. <https://doi.org/10.7717/peerj.9085>
- Lim, P., Meunier, F.J., Keith, P.A. & Noël, P.Y. (2002). *Atlas des poissons et des crustacés d’eau douce de la Martinique*.
- Mauvisseau, Q., Tönges, S., Andriantsoa, R., Lyko, F. & Sweet, M. (2019). Early detection of an emerging invasive species: EDNA monitoring of a parthenogenetic crayfish in freshwater systems. *Management of Biological Invasions*, 10, 461–472. <https://doi.org/10.3391/mbi.2019.10.3.04>
- Park, S. (2001). The excel microsatellite toolkit (version 3.1). Animal Genomics Laboratory, UCD, Ireland.
- Pritchard, J., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Rousset, F. (2008). genepop’007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- Tatarenkov, A., Gao, H., Mackiewicz, M., Taylor, D.S., Turner, B.J. & Avise, J.C. (2007). Strong population structure despite evidence of recent migration in a selfing hermaphroditic vertebrate, the mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*). *Molecular Ecology*, 16(13), 2701–2711. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03349.x>
- Tatarenkov, A., Lima, S.M.Q., Earley, R.L., Berbel-Filho, W.M., Vermeulen, F.B.M., Taylor, D.S., *et al.* (2017). Deep and concordant subdivisions in the self-fertilizing mangrove killifishes (*Kryptolebias*) revealed by nuclear and mtDNA markers. *Biological Journal of the Linnean Society*, 122(3), 558–578. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blx103>
- Thomsen, P.F. & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>