

El Complejo de Especies de la Mojarra Común en Dos
Lagunas Cratéricas Nicaragüenses

The Midas Cichlid Species Complex in Two
Nicaraguan Crater Lakes



Cuaderno N° 12
Colección Naturaleza

Behavioral, Morphological and Genetic Evidence of Divergence of the Midas Cichlid Species Complex in Two Nicaraguan Crater Lakes

Evidencias Comportamental, Morfológica, y Genética de Divergence en el Complejo de Especies de la Mojarra Común en Dos Lagunas Cratéricas Nicaragüenses

Kenneth R. McKaye^{1,2}, Jay R. Stauffer Jr³, Eric P. van den Berghe⁴, Rene Vivas¹, Lorenzo J. Lopez Perez¹, Jeffrey K. McCrary^{1,5}, Roxana Waid¹, Ad Konings⁶, Woo-Jai Lee⁷, Thomas D. Kocher⁷

Abstract

Resumen

The Midas Cichlid complex has long been proposed to contain a multitude of species, although the results of several attempts to identify species and clarify taxonomic status have been disputed. Here we demonstrate results of studies in breeding habitat selection, feeding ecology, and microsatellite genetics of three newly described species in Lake Xiloá, Nicaragua, and conclude that these species are clearly distinct following the biological species concept. Furthermore, using microsatellite genetic data we demonstrate that these species are all distinct from forms of the Midas Cichlid species complex occurring in Lake Apoyo. The three described species from Lake Xiloá assortatively mated and differed in habitat preferences. This suggests that the processes of radiation of species in Lake Apoyo and Lake Xiloá are separate, and that similar morphologies between taxa of different lakes are due to convergent evolution. In addition, sympatric speciation may be occurring in each of Nicaragua's crater lakes. The Great Lakes Basin of Nicaragua, therefore, provides a unique opportunity to study the process of evolution occurring in rapidly evolving species. We recommend urgently

El complejo de especies de la mojarra común ha sido propuesto contener una multitud de especies, aunque los resultados de varios intentos a identificar especies y aclarar el estado taxonómico del complejo han sido disputados. Aquí, demostramos resultados de estudios en la selección de hábitat de apareamiento, la ecología de alimentación, y la genética microsatelital, de tres especies nuevamente descritas de la laguna de Xiloá, Nicaragua, y concluimos que estas especies son claramente distintas, siguiendo el concepto biológico de especies. Además, utilizando datos genéticos microsatelitales, demostramos que estas especies son distintas de las formas del complejo de la mojarra común encontradas en la laguna de Apoyo. Las tres especies descritas de la laguna de Xiloá se aparearon asociativamente y difirieron en preferencias por hábitat. Esto sugiero que los procesos de radiación de especies en la lagunas de Xiloá y de Apoyo son separados, y que las morfologías semejantes de los taxa en diferentes lagunas se deben a la evolución convergente. Adicionalmente, especiación simpátrica puede estar sucediendo en cada una de las lagunas cratéricas de Nicaragua. La cuenca de los Grandes Lagos de Nicaragua, por ende, ofrece una oportunidad única para estudiar el proceso de evolución en especies que evolucionan rápidamente. Recomendamos urgentemente que se tomen medidas de conservación hacia los miembros de este complejo de especies.

Introducción

Los peces cíclidos (familia Cichlidae) han sido objeto de considerable cantidad de investigaciones ecológicas, evolucionarias, y etológicas. Sin duda, su especiación explosiva, sus especializaciones alimen-

¹University of Central America, Managua, Nicaragua

²Appalachian Laboratory, UMCES, 301 Braddock Rd, Frostburg, MD 21532 U.S.A

³School of Forest Resources, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802 U.S.A.

⁴Ave Maria College of the Americas, San Marcos, Carazo, Nicaragua

⁵Conservation Management Institute, College of Natural Resources, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061 USA

⁶Cichlid Press, P.O. Box 13608, El Paso, TX 79913 USA

⁷Department of Zoology, University of New Hampshire, Durham, NH 03824 U.S.A.

that steps be taken toward the conservation of the members of this species complex.

Introduction

Cichlid fishes have been the focus of considerable ecological, evolutionary, and behavioral research. Undoubtedly, the cichlids' explosive speciation, unique feeding specializations, diverse mating systems, and their great importance as a protein source in tropical countries have all been factors stimulating research interest in this group (Fryer and Iles, 1972; Keenleyside, 1991; Barlow, 2000; Coleman, 2001). Unfortunately, many of these research efforts have been slowed and results often are confused by the uncertain systematic status of some of the cichlids being examined. The majority of Lake Malawi's fauna, for example, is undescribed (Stauffer *et al.*, 1997). Many species from Lake Victoria became extinct, due to the introduction of exotic fishes, before they were formally described (Witte *et al.*, 1992). Furthermore, the cichlid species within the Great Lakes Basin of Nicaragua are now seriously threatened by the introduction of African "tilapia" (McKaye *et al.*, 1995, 1998a). Introductions are being made and proposed throughout the country without even knowing the species composition of individual water bodies (McCrary *et al.*, 2001).

Direct underwater observations show that the species of the Midas Cichlid species complex assortatively mate by color and shape, and that their habitat preferences and nest forms differ (Barlow, 1976; McKaye and Barlow, 1976; Stauffer *et al.*, 1995; Murry *et al.*, 2001; Vivas and McKaye, 2001). The close genetic similarities (McKaye *et al.*, 1998b) and reproductive isolation of these morphs suggest that intralacustrine speciation might have occurred in both lakes Xiloá and Apoyo, Nicaragua (McKaye, 1980; McKaye *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2000). Similar examples of intralacustrine speciation of cichlids, within crater lakes, have been reported in West Cameroon lakes (Lowe-McConnell, 1991). In Lake Barombi Mbo (Trewavas *et al.*, 1972), lakes Kotto and Mboandong (Corbet *et al.*, 1973), Lake Bermin (Stiassny *et al.*, 1992), and Lake Ejagham (Schliewen *et al.*, 2002), endemic species evidently evolved sympatrically within these lakes from ancestral populations.

Sympatric speciation occurs when one founder population divides into two separate populations or Evolutionary Significant Units (Stauffer *et al.*, 1995) that have separate evolutionary trajectories while maintaining their sympatric distribution. To infer that incipient sympatric speciation might be occurring, one must therefore encounter two or more phenotypically discernible populations of monophyletic origin (McKaye, 1980; Stauffer *et al.*, 1995; Schliewen *et al.*, 2002). McKaye

et al., los diversos sistemas de apareamiento, y su gran importancia como fuente de proteína en países tropicales, todos han jugado papeles en el impulso de investigación sobre este grupo (Fryer y Iles, 1972; Keenleyside, 1991; Barlow, 2000; Coleman, 2001). Desafortunadamente, muchos de estos esfuerzos han sido retardados y sus resultados muchas veces se han confundido, por el estado sistemático incierto de algunos de los cíclidos examinados. La mayoría de la ictiofauna del lago de Malawi, por ejemplo, es inédita (Stauffer *et al.*, 1997). Muchas especies en el lago Victoria se extinguieron, a causa de la introducción de peces exóticos, antes de que fueran formalmente descritas. Además, las especies de cíclidos en la cuenca de los Grandes Lagos de Nicaragua, se encuentran bajo amenaza por la introducción de "tilapias" africanas (McKaye *et al.*, 1995, 1998a). Introducciones de peces se están haciendo y proponiendo sin conocimiento de las composiciones ícticas de los cuerpos de agua (McCrary *et al.*, 2001).

Observaciones subacuáticas directas demuestran que los varios miembros del complejo de especies de la mojarra común se aparean asociativamente por color y forma, y que sus preferencias en hábitat y formas de nidos difieren (Barlow, 1976; McKaye y Barlow, 1976; Stauffer *et al.*, 1995; Murry *et al.*, 2001; Vivas y McKaye, 2001). Las estrechas semejanzas genéticas (McKaye *et al.*, 1998b) y el aislamiento reproductivo entre estas formas sugieren que especiación intralacustrina puede haber sucedido en ambas lagunas Xiloá y Apoyo, Nicaragua (McKaye, 1980; McKaye *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2000). Ejemplos similares de especiación intralacustrina en peces cíclidos, han sido reportados en lagos en Camerún occidental (Lowe-McConnell, 1991). En lago Barombi Mbo (Trewavas *et al.*, 1972), los lagos Kotto y Mboandong (Corbet *et al.*, 1973), lago Bermin (Stiassny *et al.*, 1992) y lago Ejagham (Schliewen *et al.*, 2002), especies endémicas evidentemente evolucionaron de manera simpátrica dentro de estos lagos, a partir de poblaciones ancestrales.

La especiación simpátrica sucede cuando una población fundadora se divide en dos poblaciones separadas, o Unidades Evolutivamente Significativas (UES; Stauffer *et al.*, 1995), que tienen trayectorias evolutivas separadas mientras mantienen su distribución simpátrica. Para inferir que especiación simpátrica incipiente puede estar sucediendo, uno debe encontrar dos o más poblaciones, fenotípicamente discernibles, de origen monofilético (McKaye, 1980; Stauffer *et al.*, 1995; Schliewen *et al.*, 2002). McKaye (1980) propuso primero que la especiación simpátrica en peces cíclidos puede estar sucediendo dentro de las lagunas cratéricas de Nicaragua. Sin embargo, identificar, y mucho menos determinar, los mecanismos de especia-

(1980) first proposed that sympatric speciation of cichlid fishes might be occurring within the crater lakes of Nicaragua. Identifying, let alone determining the mechanisms of speciation and the processes involved in rapidly evolving species is difficult and subject to multiple interpretations (Mayr, 1963, 1970; McKaye, 1991; Albertson *et al.*, 1999; Barlow, 2000; Schlieuwen *et al.*, 2002).

In order to study realistically the process of sympatric speciation, one must recognize natural populations and localities where reproductive isolation processes are presently occurring (McKaye, 1980; Owen *et al.*, 1990; Schlieuwen *et al.*, 2002). Direct observations and comparative analysis utilizing morphological, behavioral, and molecular techniques will then provide the best opportunity to understand the selective processes and ecological circumstances leading to divergence in populations. The Great Lakes Basin of Nicaragua (Fig. 1) presents perhaps one of the best prospects to examine the evolution of closely related species in isolated bodies of waters. Within the Great Lakes Basin there are the two large lakes, Managua and Nicaragua, and the rivers flowing in and out of them, more than 8 volcanic crater lakes, and other isolated bodies of waters.

Barlow and Munsey (1976) were the first to note that multiple species of the Midas Cichlid species complex occurred in a single crater lake, Lake Apoyo, but the species that they described, *Amphilophus zaliosus*, was not accepted by Villa (1982) who believed that it was simply a variant of *Amphilophus citrinellus*. This paper will present genetic data comparing several taxa (ESUs Stauffer *et al.*, 1995) from Lake Apoyo including *A. zaliosus*, and will compare it to the new species described from Lake Xiloá (Stauffer and McKaye, 2002). Also ecological data on three new species of the Midas Cichlid species complex from Lake Xiloá (Stauffer *et al.*, 1995; Stauffer and McKaye, 2002) will be presented. This new information supports our hypothesis that rapid, sympatric speciation among the Midas Cichlid species complex has been a general phenomenon throughout its natural range (McKaye, 1980; McKaye *et al.*, 1998b, 2001).

Site Descriptions

Lake Xiloá (Fig. 2). This crater lake, located at the center of the volcanic chain of the Pacific region of Nicaragua, in the Chiltepe Peninsula, is described by Stauffer and McKaye in this volume (pages 2 and 4).

Lake Apoyo (Fig. 3). This lake has an area of 21.1 km², and mean and maximum depths are 142 m and 200 m (BANIC, 1977) making it the largest and deepest of Nicaragua's crater lakes (Waid *et al.*, 1999). It oc-

ción y los procesos involucrados en la evolución rápida de especies, es siempre difícil y sujeto a múltiples interpretaciones (Mayr, 1963, 1970; McKaye 1991; Albertson *et al.*, 1999; Barlow, 2000; Schlieuwen *et al.*, 2002).

Para estudiar objetivamente el proceso de especiación simpátrica, uno debe reconocer las poblaciones naturales y las localidades donde los procesos de aislamiento reproductivo actualmente están sucediendo (McKaye, 1980; Owen *et al.*, 1990; Schlieuwen *et al.*, 2002). A través de observaciones directas y análisis comparativos utilizando técnicas morfológicas, etológicas, y moleculares, tendremos mejor oportunidad para entender los procesos selectivos y las circunstancias ecológicas que resultan en divergencia de poblaciones. La cuenca de los Grandes Lagos de Nicaragua (Fig. 1) presenta quizás uno de las mejores perspectivas en el estudio de la evolución de especies monofiléticas en cuerpos de agua aislados. Dentro la cuenca se encuentran los dos lagos grandes, Xolotlán y Cocibolca, con los ríos que entran y salen de ellos, y más de 8 lagunas volcánicas cratéricas y otros cuerpos de agua aislados.

Barlow y Munsey (1976) fueron los primeros en anotar que múltiples especies del complejo de especies de la mojarra común se encuentran en una sola laguna cratérica, la laguna de Apoyo, pero la especie que ellos describieron nuevamente de esta laguna, *Amphilophus zaliosus*, no fue aceptada por Villa (1982), quien creía que esta era simplemente una variante de *Amphilophus citrinellus*. Este artículo presenta datos genéticos, comparando varias taxa (UES; Stauffer *et al.*, 1995) de la laguna de Apoyo, incluyendo *A. zaliosus*, y compara esta especie con tres especies nuevas descritas de la laguna de Xiloá (Stauffer y McKaye, 2002).. También, datos ecológicos sobre las tres especies nuevas del complejo de especies de la mojarra común de la laguna de Xiloá (Stauffer *et al.*, 1995; Stauffer y McKaye 2002) son presentados. Esta nueva información apoya a nuestra hipótesis que especiación simpátrica rápida entre el complejo de especies de la mojarra común ha sido un fenómeno general a lo largo de su rango natural (McKaye, 1980; McKaye *et al.*, 1998b, 2001).

Descripciones de sitios

Laguna de Xiloá (Fig. 2). Esta laguna cratérica, ubicada en el centro de la cadena volcánica de la región del Pacífico de Nicaragua, en la península de Chiltepe (Fig. 1), ha sido descrita por Stauffer y McKaye (2002) en este volumen.

Laguna de Apoyo (Fig. 3). Esta laguna tiene un área superficial de 21.1 km², y profundidades media y máxi-

cupies a high-rimmed crater with walls rising up to 400 m above its surface (Incer, 1975). It was formed by a collapse after several eruptions fewer than 25,000 years ago (BANIC, 1977; Bice, 1985). Most of the shoreline is gently sloping with both sandy and rocky beaches. Lake Apoyo shows residual volcanic activity and thermal waters at its southern end (BANIC, 1977). Its water can be classified as alkaline (pH=8.1) and hard (268 ppm as CaCO_3). Its water is among the most saline (conductivity=4,095 μS) of the crater lakes. Lake Apoyo is an oligotrophic lake (Barlow *et al.*, 1976).

Materials and Methods

Cloning of microsatellite loci: Total genomic DNA was extracted from a male Midas Cichlid (Lake Masaya

ma de 142 m y 200 m, (BANIC, 1977), haciéndola la más grande y más profunda de las lagunas cratéricas de Nicaragua (Waid *et al.*, 1999). Ocupa un cráter con orilla empinada, con paredes que llegan hasta 400 m por encima de su superficie (Incer, 1975). Fue formada por un colapso después de varias erupciones hace menos de 25,000 años (BANIC, 1977; Bice, 1985). La orilla de la laguna es principalmente de inclinación liviana, con playas en algunas partes arenosas, en otras rocosas. La laguna demuestra actividad volcánica residual con aguas termales en su lado sureño (BANIC, 1977). Su agua se clasifica como alcalina (pH=8.1) y dura (268 ppm como CaCO_3). Su agua está entre las más salobres (conductividad=4,095 μS) de las lagunas cratéricas. La Laguna de Apoyo es oligotrófica (Barlow *et al.*, 1976). Ambas Apoyo y Xiloá han sostenido una faja de vegetación sumergida (*Chara* sp.) en aproxima-



Fig 1. Map of the Pacific region of Nicaragua showing the localities discussed in the text.

Fig. 1. Mapa de la región del Pacífico de Nicaragua, demostrando los lugares mencionados en el texto.



Fig. 2. A view from the southeastern shore of Lake Xiloá.

Fig. 2. Una vista desde la orilla sur-este de la laguna de Xiloá.



Fig.3. A view of the southern section of Lake Apoyo .

Fig. 3. Una vista de la parte meridional de la laguna de Apoyo.

stock, hereafter referred to as cf. *citrinellus*) donated by Ron Coleman at the University of California Berkeley. Approximately 3 µg of DNA was digested with Sau3AI overnight. The resulting DNA fragments were size fractionated on a 1% agarose gel, and the fragments 300-800bp in size recovered by gelase digestion (Sigma Chemical) followed by extraction 1x with phenol/chloroform and 1x with chloroform. The DNA was then recovered by ethanol precipitation. The pBluescript vector was digested with BamHI, and then dephosphorylated with CIAP (Promega) before ligation to the recovered fragments. Clones were transferred to nylon membranes and the microsatellite loci were identified with a CA₁₀ oligo labeled with P³². Hybridization was performed at 42° C overnight and the membranes were washed twice at 42° C for 10 min and once at 47° C briefly. The positive clones were sequenced using M13 reverse transcriptase and T7 primers and primers designed for loci with more than 10 repeat units. Sequences of the loci have been deposited in GenBank Acc (#G75332 - G75334).

Microsatellite genotyping: Conditions for PCR amplification were the same for all three markers. The reaction cocktail contained 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% Triton X-100, 2.4 mM MgCl₂, 0.16 mM each dNTP, 2µM each primer and about 30 ng of DNA in a 25 µl reaction volume. After incubation at 95° C for 2 min, 26 thermal cycles were performed, each consisting of 93° C for 1 min, 55° C for 1 min and 72° C for 2 min. About 3 µl of the total reaction volume were loaded on an automated sequencer (ABI 373) and the allele sizes were analyzed with the GeneScan software (ABI). Allele frequencies and F-statistics were calculated using GENEPOP 3.1 (Raymond and Rousset, 1995).

Seasonality and Depth Distribution of Breeding Pairs: Four permanent study sites were established in Lake Xiloá (see Hale, 2000: sites A,B,C,D; Fig. 4). Fixed transects, that follow the depth contour along the lake's bottom at intervals of 3 m from depths of 1.5 m to 28.5 m, were filmed semi-weekly using an underwater video camera. Two of the sites

damente 2-7 metros de profundidad, que se ha desaparecido recientemente de la laguna de Apoyo, posteriormente a la introducción de tilapias en la laguna (McCrary *et al.*, 2001).

Materiales y Métodos

Clonación de Loci Microsatelital: ADN total genómico fue extraído de una mojarra común masculina (de la laguna de Masaya), donada por Ron Coleman de la Universidad de California en Berkeley. Aproximadamente 3 µg de ADN fue digerido con Sau3AI una noche. Los fragmentos de ADN resultantes fueron fraccionados por tamaño en una gel de 1% agarosa, y los fragmentos de 300-800 bp fueron recuperados por digestión con gelasa (Sigma Chemical), seguido por extracción 1x con fenol/cloroformo y 1x con cloroformo. El ADN fue entonces, recuperado por precipitación con etanol. El vector pBluescript fue digerido con BamHI, luego desfosforilado con CIAP (Promega) antes de ligación a los fragmentos recuperados. Clones fueron transferidos a membranas de nylon y los loci fueron identificados con un CA₁₀ oligo marcado con P³². La hibridación fue ejecutada en 42° C una noche y las membranas fueron lavadas dos veces en 42° C por 10 minutos y una vez en 47° C brevemente. La secuencias de los clones positivos fueron determinadas utilizando retrotranscriptasa M13 y primadores T7 y otros primadores diseñados para loci con más de 10 repeticiones. Secuencias de los loci han sido depositadas en GenBank (cuentas #G75332 - G75334).

Genotipificación de microsatélites: Las condiciones para amplificación con PCR fueron idénticas para los tres marcadores. La mezcla de reacción contenía 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% Triton X-100, 2.4 mM MgCl₂, 0.16 mM cada dNTP, 2 mM cada primador y aproximadamente 30 ng de ADN en un volumen de reacción de 25 µl. Después de incubación a 95° C por 2 minutos, se ejecutaron 26 ciclos térmicos, cada uno consistiendo de 93° C por 1 min, 55° C por 1 min, y 72° C por 2 min. Aproximadamente 3 µl del volumen total de reacción fueron

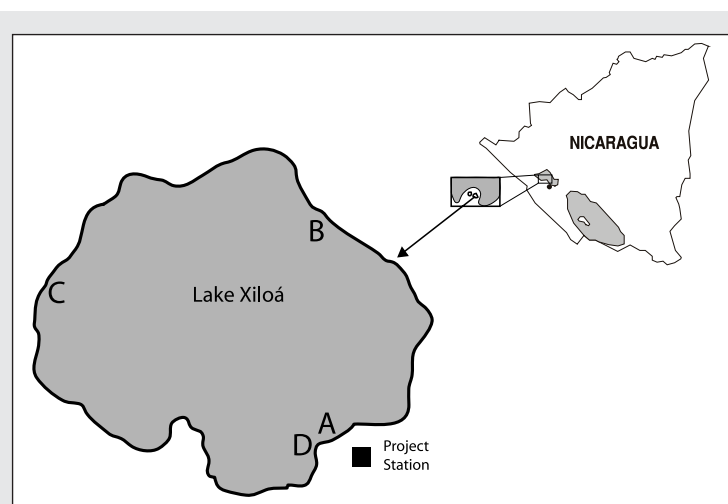


Fig 4. The location of the four permanent study sites that were established in Lake Xiloá (A, B, C, and D).

Fig. 4. La ubicación de los cuatro sitios de estudio permanentes en la laguna de Xiloá (A, B, C, y D).

Locus: UNH011										
Population	Alleles									Genes
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Apoyo										
Apoyo amarillo	0.000	0.026	0.026	0.000	0.026	0.632	0.000	0.289	0.000	38
<i>A. cf. citrinellus</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.063	0.125	0.000	0.750	0.063	16
Chancho	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.471	0.000	0.529	0.000	34
Short	0.000	0.000	0.029	0.014	0.071	0.457	0.071	0.357	0.000	70
<i>A. zalius</i>	0.036	0.000	0.000	0.036	0.554	0.125	0.000	0.214	0.036	56
Xiloá										
<i>A. amarillo</i>	0.000	0.000	0.440	0.540	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	50
<i>A. xiloensis normal</i>	0.000	0.000	0.521	0.417	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000	48
<i>A. xiloensis gold-oro</i>	0.000	0.000	0.554	0.446	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	56
<i>A. 'fat lips'</i>	0.000	0.000	0.833	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	6
<i>A. sagittae</i>	0.043	0.043	0.761	0.109	0.043	0.000	0.000	0.000	0.000	46
<i>A. sagittae gold-oro</i>	0.000	0.000	0.722	0.278	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	18

Table 1a: Allele frequencies for locus UNH011.

Cuadro 1a. Frecuencias de alelos para locus UNH011.

Locus: UNH012																		
Population	Alleles																	Genes
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Apoyo																		
Apoyo amarillo	0.000	0.000	0.053	0.000	0.632	0.000	0.000	0.000	0.105	0.158	0.026	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	38
<i>A. cf. citrinellus</i>	0.000	0.063	0.000	0.000	0.563	0.000	0.125	0.000	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	16
Chancho	0.000	0.000	0.000	0.000	0.294	0.000	0.000	0.029	0.676	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	34
Short	0.000	0.000	0.000	0.030	0.773	0.030	0.000	0.000	0.091	0.045	0.000	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	66
<i>A. zalius</i>	0.036	0.304	0.000	0.000	0.393	0.000	0.125	0.000	0.054	0.071	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	56
Xiloá																		
<i>A. amarillo</i>	0.096	0.000	0.096	0.019	0.115	0.096	0.077	0.115	0.385	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	52
<i>A. xiloensis normal</i>	0.040	0.040	0.000	0.000	0.560	0.040	0.080	0.100	0.080	0.020	0.000	0.020	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	50
<i>A. xiloensis gold-oro</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.483	0.033	0.083	0.050	0.133	0.017	0.017	0.133	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	60
<i>A. 'fat lips'</i>	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.333	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	6
<i>A. sagittae</i>	0.217	0.000	0.000	0.000	0.043	0.152	0.000	0.304	0.174	0.000	0.000	0.000	0.043	0.000	0.022	0.022	0.022	46
<i>A. sagittae gold-oro</i>	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	18

Table 1b: Allele frequencies for locus UNH012

Cuadro 1b. Frecuencias de alelos para locus UNH012.

Locus: UNH013																		
Population	Alleles																	Genes
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Apoyo																		
Apoyo amarillo	0.026	0.000	0.684	0.053	0.000	0.158	0.000	0.000	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	38
<i>A. cf. citrinellus</i>	0.000	0.000	0.813	0.000	0.188	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	16
Chancho	0.029	0.000	0.794	0.000	0.000	0.118	0.029	0.000	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	34
Short	0.000	0.114	0.643	0.029	0.014	0.114	0.014	0.043	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	70
<i>A. zalius</i>	0.000	0.000	0.796	0.037	0.074	0.074	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	54
Xiloá																		
<i>A. amarillo</i>	0.000	0.038	0.000	0.000	0.019	0.154	0.154	0.077	0.442	0.038	0.019	0.058	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	52
<i>A. xiloensis normal</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.104	0.000	0.042	0.125	0.083	0.146	0.208	0.104	0.104	0.063	0.021	0.000	48
<i>A. xiloensis gold-oro</i>	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.067	0.183	0.000	0.050	0.367	0.050	0.067	0.100	0.017	60
<i>A. 'fat lips'</i>	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000	0.000	0.000	4
<i>A. sagittae</i>	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.100	0.225	0.050	0.100	0.000	0.475	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	40
<i>A. sagittae gold-oro</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.188	0.125	0.313	0.125	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	16

Table 1c: Allele frequencies for locus UNH013

Cuadro 1c. Frecuencias de alelos para locus UNH013.

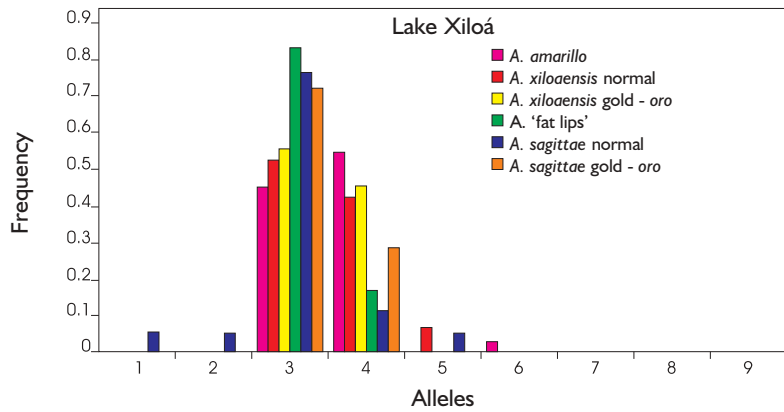
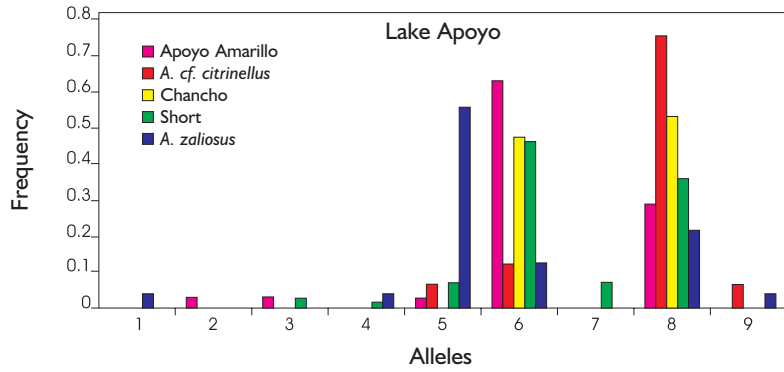


Fig. 5. Allele frequencies for locus UNH011.

Fig. 5. Frecuencias de alelos para locus UNH011.

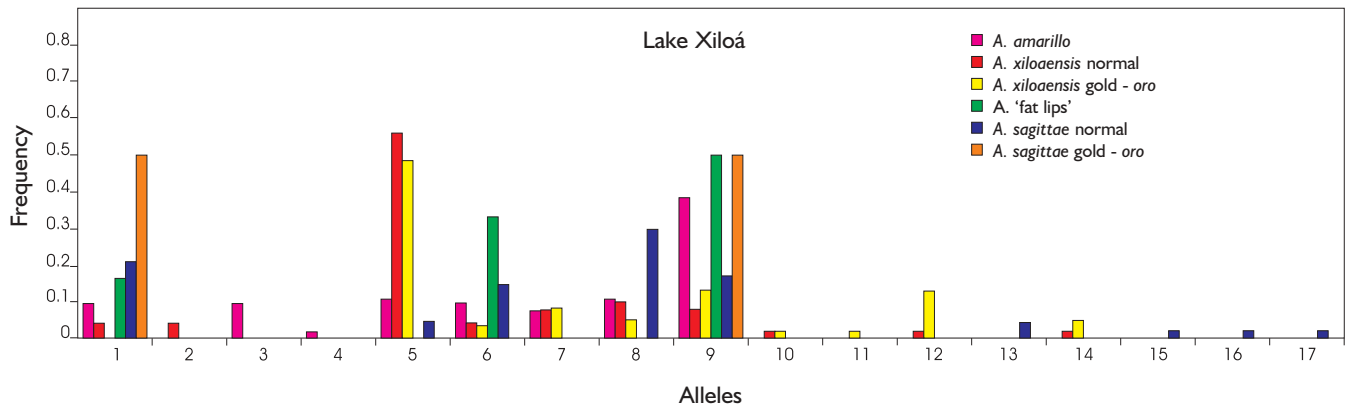
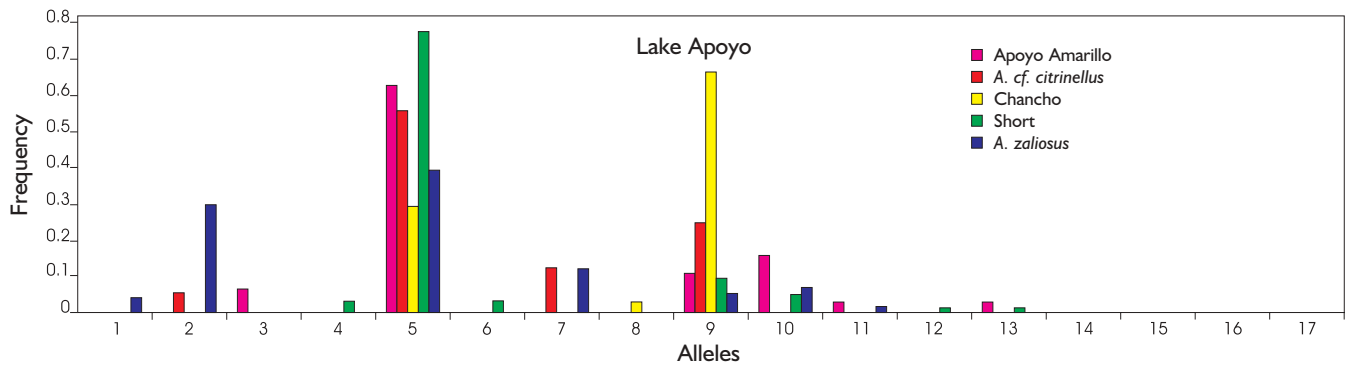


Fig. 6. Allele frequencies for locus UNH012.

Fig. 6. Frecuencias de alelos para locus UNH012.

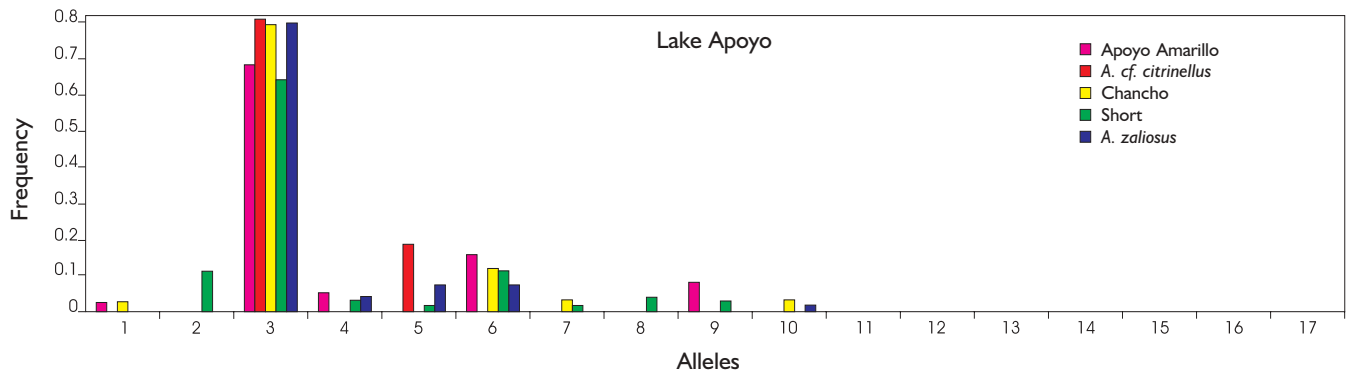


Fig. 7. Allele frequencies for locus UNH013.

were established in 1990, one in 1991, and the fourth in 1992. Three of the sites contained transects 30 m in length, while the fourth had 20 m transects. A diver swam above each transect line and videotaped all fish 2 m to either side of the line. Each transect covered a 60 m² (3 sites) and 40 m² (1 site) area, respectively. When the diver encountered a pair of breeding fish, he paused and taped the pair for 5-10 seconds. Analysis of these videos provided the number of pairs at each respective depth. Fish used for stomach analysis were captured by SCUBA divers chasing them into block nets. Furthermore, during the wet season, August to December 1997 (Vivas and McKaye, 2001), a total of 521 fish pairs were counted on transects in four different locations (Fig. 4) from the long-term video transect sites. These sites were specifically chosen to represent 4 different habitat types, rock, weed, sand and rock/weed during the five months of the breeding season.

Results

Alleles: Allele frequencies for each form in the two lakes are given in Table 1a, b, and c. A total of 43 alleles

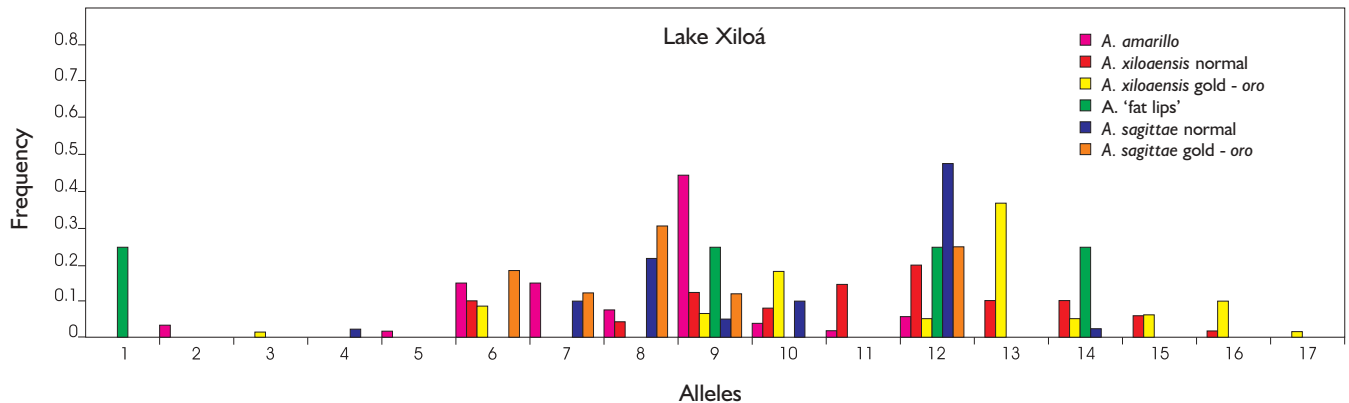


Fig. 7. Frecuencias alelos para locus UNH013.

cargados en un secuenciador automatizado (ABI 373) y los tamaños de los alelos fueron analizados con el software GeneScan (ABI). Frecuencias de alelos y F-estadísticas (Fst), fueron calculadas utilizando GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset, 1995).

Temporalidad y Distribución Batimétrica de Pares: Cuatro sitios permanentes de estudio fueron establecidos en la laguna de Xiloá (véase Hale, 2000; sitios A,B,C,D; Fig. 4). Dos de los sitios fueron establecidos en 1990, uno en 1991, y el cuarto en 1992. Transectos fijos que siguen el contorno a el fondo de la laguna en intervalos de 3 m, en profundidades desde 1.5 m hasta 28.5 m, fueron filmados quincenalmente, utilizando una cámara de video subacuática. Tres de los sitios contienen transectos de largo de 30 m, mientras el cuarto tiene transectos de 20m. Un buzo nadó por encima de cada línea de transecto y filmó cada pez dentro de 2 m de cada lado de la línea. Los transectos cubren áreas de 60 m² (3 sitios) y 40 m² (1 sitio), respectivamente. Cuando el buzo encontró una pareja de peces en apareamiento, él se detuvo y filmó la pareja por 5-10 segundos. Análisis de estos videos suministraron el número de parejas en cada respecti-

Population	Amarillo	A.cf. citrinellus	Chancho	Short
A. cf. citrinellus	0.1302			
Chancho	0.1409	0.1223		
Short	0.0058	0.0857	0.1583	
A. zaliosus	0.1625	0.1314	0.2312	0.1513

Table 2. Mean pair-wise F_{st} for populations in Lake Apoyo.

Population	A. amarillo	A. xiloaensis normal	A. xiloaensis gold - oro	A. 'fat lips'	A. sagittae normal
A. xiloaensis normal	0.0884				
A. xiloaensis gold - oro	0.1114	0.0176			
A. 'fat lips'	0.0094	0.0508	0.1185		
A. sagittae normal	0.1441	0.1234	0.1734	-0.0049	
A. sagittae gold - oro	0.0818	0.1452	0.1839	-0.0283	0.0619

Table 3. Mean pair-wise F_{st} for populations in Lake Xiloá.

Xiloá	Apoyo				
	Amarillo	A. cf. citrinellus	Chancho	Short	A. zaliosus
A. amarillo	0.3280	0.3458	0.3415	0.3374	0.3320
A. xiloaensis normal	0.2679	0.2954	0.3567	0.2540	0.2771
A. xiloaensis gold - oro	0.2956	0.3232	0.3648	0.2831	0.3071
A. sagittae normal	0.3855	0.4016	0.4153	0.3868	0.3698
A. sagittae gold - oro	0.4127	0.4379	0.4205	0.4140	0.3958

Table 4. Mean pair-wise F_{st} for comparisons between lakes.

Cuadro 2. F_{st} por pares promediados para poblaciones en la laguna de Apoyo.

▼ Cuadro 3. F_{st} por pares promediados para poblaciones en la laguna de Xiloá.

Cuadro 4. F_{st} por pares promediados para comparaciones entre las lagunas.

va profundidad. Los peces usados para el análisis de contenidos estomacales y la morfología de la mandíbula faríngea fueron capturados por buzos atrapándolos en redes chinchorros. Además, durante el tiempo de invierno Agosto-Diciembre 1997 (Vivas y McKaye, 2001), un total de 521 parejas de peces fueron contadas en transectos en cuatro lugares distintos de los transectos de largo plazo (Fig. 4). Estos sitios fueron elegidos específicamente para representar cuatro diferentes tipos de hábitat: piedras, vegetación, arena, y piedra/vegetación, durante los cinco meses de tiempo de apareamiento.

Resultados

Genética: Las frecuencias de alelos para cada forma en las dos lagunas se encuentran en Cuadros 1a, b, y c. Un total de 43 alelos fueron observados entre los tres loci. La diversidad genética parece mayor en la laguna de Xiloá que en la de Apoyo. La heterozigocidad media global es de 0.50 para los taxa en la laguna de Apoyo y 0.63 para los taxa en la laguna de Xiloá. Un total de 40 alelos fueron encontrados de la laguna de Xiloá, mientras solamente 32 se observaron en las muestras de la laguna de Apoyo.

Las frecuencias de alelos son claramente diferentes entre las dos lagunas. Para locus UNH011, todas los taxa de la laguna de Apoyo fueron dominadas por alelos considerablemente más largos que los alelos observados en la laguna de Xiloá (Fig. 5). Tamaños similares de alelos se observaron entre las dos lagunas para locus UNH012 (Fig. 6), pero los

were observed among the three loci. Genetic diversity appears greater in Lake Xiloá than in Lake Apoyo. The overall average heterozygosity is 0.50 for taxa in Lake Apoyo and 0.63 for taxa in Lake Xiloá. A total of 40 alleles was observed from Lake Xiloá, while only 32 were observed from Lake Apoyo.

Allele frequencies are clearly different between the two lakes. For locus UNH011, all of the Lake Apoyo taxa are dominated by alleles considerably longer

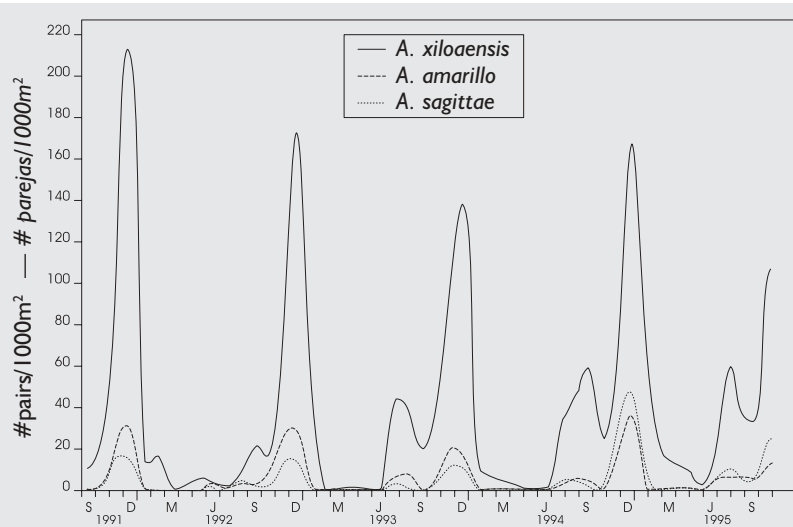


Fig. 8. The breeding seasonality of the three new species over a period of four years.

Fig. 8. Temporadas de apareamiento de las tres especies nuevas sobre un período de cuatro años.

than the alleles observed in Lake Xiloá (Fig. 5). Similar allele sizes are observed between lakes for locus UNH012 (Fig. 6), but the Lake Xiloá taxa generally have longer alleles for locus UNH013 (Fig. 7). These observations are reinforced by the F_{st} values. Comparisons of taxa from different lakes always yield an F_{st} greater than 0.25. Comparisons within lakes all show F_{st} values less than 0.25, and typically less than 0.15 (Tables 2-4).

There is also clear evidence of differentiation among taxa within lakes. F_{st} values for Lake Apoyo clearly indicate that *A. zaliosus* (Figs. 11-12, 20-21), "Chancho" (Figs. 13-14) and *A. cf. citrinellus* are distinct taxa ($F_{st} > 0.10$). "Short" (Figs. 16-17) is highly similar to "Apoyo amarillo" (Fig. 18), but both these taxa appear distinct from *A. cf. citrinellus* (Lake Masaya). In Lake Xiloá the taxonomic units appear to be *A. amarillo* (Figs 26-27), normal/gold *A. xiloensis* (Figs. 24-25), *A. sagittae* normal/gold (Figs. 22-23, 28-29) (3 taxa in all). We sampled too few "fat lips" (Fig. 19, 30-31) to comment on this morphotype.

Seasonality and Depth Distribution: Breeding seasonality was similar for the three Xiloá species (Fig. 8). There was an an-

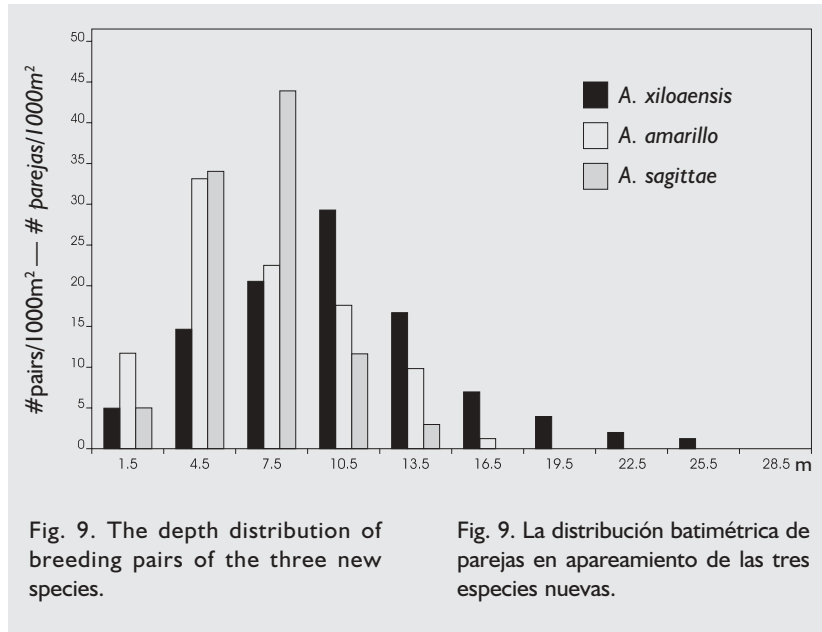


Fig. 9. The depth distribution of breeding pairs of the three new species.

Fig. 9. La distribución batimétrica de parejas en apareamiento de las tres especies nuevas.

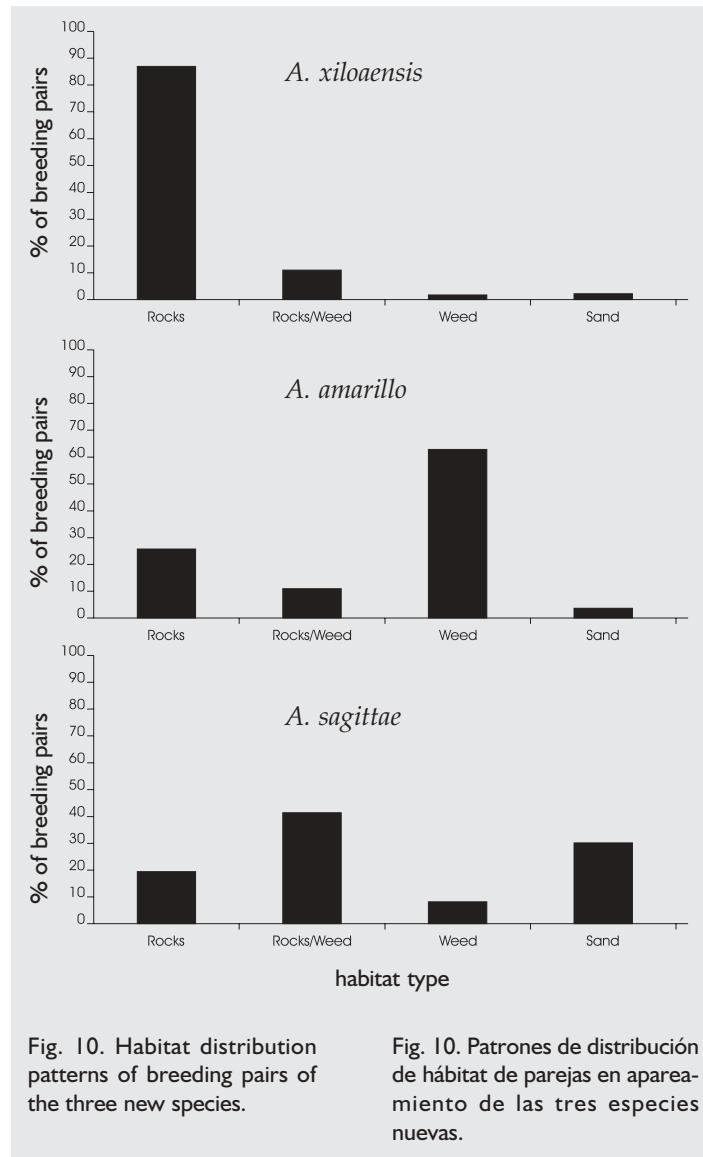


Fig. 10. Habitat distribution patterns of breeding pairs of the three new species.

Fig. 10. Patrones de distribución de hábitat de parejas en apareamiento de las tres especies nuevas.

taxa de la laguna de Xiloá contienen alelos generalmente más largos para locus UNH013 (Fig. 7). Los valores de F_{st} refuerzan estas observaciones. Comparaciones de los taxa de diferentes lagunas siempre rinden un F_{st} mayor de 0.25, mientras las comparaciones entre taxa en la misma laguna todas demuestran valores menores de 0.25, y típicamente menor de 0.15 (Cuadros 2-4).

También hay evidencia clara de diferenciación entre los taxa dentro de cada laguna. Los valores de F_{st} para la laguna de Apoyo indican claramente que *A. zaliosus* (Figs. 11-12, 20-21), "Chancho" (Figs. 13-14), y *A. cf. citrinellus* son taxa distintos ($F_{st} > 0.10$). "Short" (Figs. 16-17) es muy similar a "Apoyo amarillo" (Fig. 18), pero ambos taxa parecen distintas de *A. cf. citrinellus* (Laguna de Masaya). En la laguna de Xiloá, las unidades taxonómicas parecen ser *A. amarillo* (Figs. 26-27), normal/oro *A. xiloensis* (Figs. 24-25), *A. sagittae* normal/oro (Figs. 22-23, 28-29) (3 taxa todos contados). Recolectamos demasiado pocos ejemplares de "fat lips" (Fig. 19, 30-31) para comentar sobre este morfotipo.

Temporalidad y Distribución Batimétrica:— Temporalidad de apareamiento fue similar para



Fig. 11. A breeding pair of *Amphilophus zaliosus* in Lake Apoyo.

Fig. 11. Una pareja en apareamiento de *Amphilophus zaliosus* en la laguna de Apoyo.



Fig. 12. A breeding individual *Amphilophus zaliosus* in Lake Apoyo. Note the streamlined form of this predator.

Fig. 12. Un individuo en apareamiento de *Amphilophus zaliosus* en la laguna de Apoyo. Nótese la forma aereodinámica de este depredador.



Fig. 13. A fry-guarding individual of *Amphilophus* "chancho" in Lake Apoyo.

Fig. 13. Un individuo de *Amphilophus* "chancho" cuidando alevines en la laguna de Apoyo.



Fig. 14. A breeding individual of *Amphilophus* "chancho".

Fig. 14. Un individuo en apareamiento de *Amphilophus* "chancho".

nual breeding peak from October to December and a second, smaller breeding peak in July and August. The breeding densities for each species were, however, considerably different. *Amphilophus xiloaensis* has the highest breeding density at the transects with the other two species breeding at lower densities (Fig. 8).

The three species differed significantly in depth distribution of breeding pairs ($X^2 = 411.40$, $df = 27$, $P < 0.05$), although there was considerable overlap (Fig. 9). The modal breeding depth of *A. amarillo* was 4.5 m, of *A. sagittae* was 7.5 m, and that of *A. xiloaensis* was 10.5 m. *Amphilophus xiloaensis* was found as deep as 25.5 m. There were no *A. sagittae* pairs observed deeper than 13.5 m and no *A. amarillo* pairs below 16.5 m.

Habitat Selection during 1997 breeding season:

There were 113 pairs of *A. amarillo*, 173 *A. xiloaensis*, and 235 *A. sagittae*. All three species varied significantly in habitat utilization (Fig. 10, ANOVA, $F = 17.79$, $df = 6$, $P < 0.05$).

When analyzing habitat type by species, significant differences were found on each of the four habitat types. *Amphilophus xiloaensis* utilized the rocks significantly more (ANOVA, $F = 11.70$, $df = 2$, $P < 0.05$), than *A. sagittae* and *A. amarillo*. *Amphilophus sagittae* utilized the rocks/weeds habitat type significantly more (ANOVA, $F = 14.89$, $df = 2$, $P < 0.05$), than any other species. *Amphilophus sagittae* was also found significantly more on the sand (ANOVA, $F = 5.92$, $df = 2$, $P < 0.05$) than any other species (Fig. 9). *Amphilophus amarillo* (ANOVA, $F = 22.82$, $df = 3$, $P < 0.05$) utilized the weed beds significantly more than any of the other habitat type.

No significant differences in the time of breeding were found among the species during this five-month period ($X^2 = 8.70$, $df = 8$, $P > 0.05$). All three species shared a breeding peak during the month of Novem-

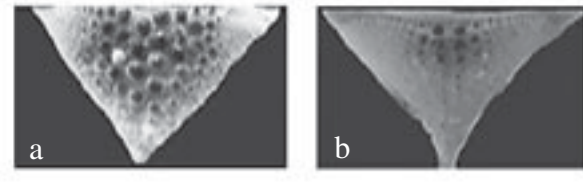


Fig. 15. Two different forms of lower pharyngeal bones found in the Midas Cichlid species complex in Lake Xiloá: a. molariform, b. papilliform.

Fig. 15. Dos diferentes formas de los huesos inferiores faríngeos encontrados en el complejo de especies de la mojarra común en la laguna de Xiloá: a. molariforme; b. papiliforme.

Species	n	% Snails % Conchas	% Fish fry % Alevines	% Eggs % Huevos	% Empty % Vacíos
<i>A. xiloaensis</i>	45	44.4%	0%	0%	55.6%
<i>A. sagittae</i>	45	0%	46.6%	2.2%	51.2%
<i>A. amarillo</i>	45	77.8%	0%	0%	22.2%

Table 5. Total percent of dietary items from stomach content analysis.

Cuadro 5. Porcentaje total de contenidos estomacales.

Species	n	% Papilliform % Papiliforme	% Molariform % Molariforme
<i>A. xiloaensis</i>	45	4.4%	95.6%
<i>A. sagittae</i>	45	97.8%	2.2%
<i>A. amarillo</i>	45	24.4%	75.6%

Table 6. Total percent of papilliform and molariform PJA types found in all species.

Cuadro 6. Porcentaje total de tipos de aparatos mandibulares faríngeos encontrados en las especies.

las tres especies en la Laguna de Xiloá (Fig. 8). Había un pico en el apareamiento desde Octubre hasta Diciembre y un segundo pico más pequeño en Julio y Agosto. Las densidades en el apareamiento para cada especie, sin embargo, fueron considerablemente distintas. *Amphilophus xiloaensis* es la forma dominante en la laguna con las otras dos formas en densidades mucho más bajas (Fig. 8). Las tres especies difirieron significativamente en distribución batimétrica de parejas en apareamiento ($X^2 = 411.40$, $g.l. = 27$, $P < 0.05$), aunque había considerable traslape (Fig. 9). Todas exhibieron distribuciones de apareamiento distintas (*A. xiloaensis* a *A. amarillo* $X^2 = 217.14$, $g.l. = 18$, $P < 0.05$; *A. xiloaensis* a *A. sagittae* $X^2 = 4280.19$, $g.l. = 18$, $P < 0.05$; y *A. amarillo* a *A. sagittae* $X^2 = 325.47$, $g.l. = 18$, $P < 0.05$). La profundidad de apareamiento modal de *A. amarillo* fue de 4.5 m, de *A. sagittae* fue

de 7.5 m, y la de *A. xiloaensis* fue de 10.5 m. *Amphilophus xiloaensis* en nidos fue encontrado hasta profundidad de 25.5 m. No hubo parejas de *A. sagittae* observadas a mayor profundidad de 13.5 m y no hubo parejas de *A. amarillo* por debajo de 16.5 m.

Selección de Hábitat Durante la Temporada de Apareamiento de 1997: Registramos 113 parejas de *A. amarillo*, 173 de *A. xiloaensis*, y 235 de *A. sagittae*. Todas las especies variaron significativamente en utilización de hábitat (Fig. 10, ANOVA, $F = 17.79$, $g.l. = 6$, $P < 0.05$).

Al analizar tipo de hábitat por especie, diferencias significativas se encontraron en cada uno de los cuatro tipos de hábitat. *Amphilophus xiloaensis* utilizó las rocas significativamente más (ANOVA, $F = 11.70$, $g.l. = 2$, $P < 0.05$, $P < 0.05$) que *A. sagittae* y *A. amarillo*. *Amphilophus sagittae* utilizó el tipo de hábitat rocas/vegetación significativamente más (ANOVA, $F = 14.89$, $g.l. = 2$, $P < 0.05$, $P < 0.05$) que las otras especies.

ber. This breeding peak is consistent within the different habitat types and the long-term video transects in other parts of the lake.

Diet and jaw morphology: Significant dietary differences were found among the species ($X^2 = 49.00$, $df = 2$, $P < 0.05$). *Amphilophus xiloaensis* and *A. amarillo* fed on snails, whereas the *A. sagittae* fed on fish fry and fish eggs. There were no significant differences between dietary items found in *A. xiloaensis* and *A. amarillo* ($X^2 = 0.20$, $df = 1$, $P > 0.05$). However, significant differences were found between dietary items found among *A. sagittae* with both *A. xiloaensis* ($X^2 = 29.85$, $df = 1$, $P < 0.05$), and *A. amarillo* ($X^2 = 28.85$, $df = 1$, $P < 0.05$) (Table 5).

Significant differences were found among all species in relation to pharyngeal jaw apparatus (PJA) type ($X^2 = 89.09$, $df = 2$, $P < 0.05$). Significant differences were found between *A. xiloaensis* and *A. sagittae* ($X^2 = 78.44$, $df = 1$, $P < 0.05$). *Amphilophus xiloaensis* has a molariform PJA type (Fig. 15a), more than any other PJA type, whereas *A. sagittae* has a papilliform (Meyer, 1990) PJA type (Fig. 15b), more than any other PJA type. *Amphilophus amarillo* showed significant differences when compared with *A. xiloaensis* and *A. sagittae* ($X^2 = 7.28$, $df = 1$, $P < 0.05$ and $X^2 = 50.91$, $df = 1$, $P < 0.05$, respectively). *Amphilophus amarillo* has a molariform type of PJA, more than any other type (Table 6).

Discussion

Behavior can provide direct evidence of reproductive isolation or cohesion of taxa in a sympatric situation. Behavioral studies have been instrumental in recognizing novel entities, assigning population to taxa, and estimating phylogenetic relationships among taxa (Trewavas, 1983; Brooks and McLennan, 1991; Wenzel, 1992; Stauffer *et al.*, 1993). This *in situ* study demonstrates that the *A. citrinellus* taxa in Lake Xiloá, Nicaragua, previously referred to as ESUs (Stauffer *et al.*, 1995; Murry *et al.*, 2001) are, in reality, sibling species (Stauffer and McKaye, 2002). These sibling species, all breed at the same time (Fig. 8), but they feed on different items (Table 5), utilize different habitat for nests (Fig. 10), and have varying fry survivorship (Vivas and McKaye, 2001). Bimodal quantitative character distributions in both mate choice, food and habitat exploitation, along with assortative mating, are necessary first conditions for most models of sympatric speciation to be applicable (Maynard Smith, 1966; Kondrashov and Mina, 1986; Doebeli, 1996; Dieckman and Doebeli, 1999).

All three species exhibited a breeding peak during the month of November. This breeding peak was consistent across the different habitat types. The species,

Amphilophus sagittae fue encontrado de manera significativamente más frecuentemente sobre la arena (ANOVA, $F = 5.92$, $g.l. = 2$, $P < 0.05$, $P < 0.05$) que las otras especies (Fig. 10). *Amphilophus amarillo* (ANOVA, $F = 22.82$, $g.l. = 3$, $P < 0.05$) utilizó los lechos de vegetación significativamente más ($P < 0.05$) que cualquier otro tipo de hábitat.

No encontramos diferencias significativas en la temporada de apareamiento entre las especies durante este período de cinco meses ($X^2 = 8.70$, $g.l. = 8$, $P > 0.05$). Las tres especies compartieron un pico en el apareamiento durante el mes de Noviembre. Esta sincronía en apareamiento es consistente entre todos los tipos de hábitat en las áreas de estudio tanto como en los transectos de video de largo plazo en otras partes de la laguna.

Dieta y Morfología de Mandíbula Faríngea: Diferencias significativas en dieta fueron encontradas entre las especies ($X^2 = 49.00$, $g.l. = 2$, $P < 0.05$). *Amphilophus xiloaensis* y *A. amarillo* se alimentaron con moluscos, mientras *A. sagittae* se alimentó con alevines y huevos de peces. No hubo diferencias significativas entre los contenidos estomacales encontrados en *A. xiloaensis* y *A. amarillo* ($X^2 = 0.20$, $g.l. = 1$, $P > 0.05$). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre *A. sagittae* y ambas *A. xiloaensis* ($X^2 = 29.85$, $g.l. = 1$, $P < 0.05$), y *A. amarillo* ($X^2 = 28.85$, $g.l. = 1$, $P < 0.05$) (Cuadro 5).

Se encontraron diferencias significativas entre todas las especies con relación al tipo de aparato de la mandíbula faríngea ($X^2 = 89.09$, $g.l. = 2$, $P < 0.05$). Diferencias significativas se encontraron entre *A. xiloaensis* y *A. sagittae* ($X^2 = 78.44$, $g.l. = 1$, $P < 0.05$). *Amphilophus xiloaensis* tiene un tipo de mandíbula faríngea molariforme (Fig. 15a), más que de otro tipo, mientras *A. sagittae* tiene un tipo papiliforme (Fig. 15b) (Meyer, 1990), más que de otro tipo. *Amphilophus amarillo*, que tiene principalmente un tipo molariforme, tuvo diferencias significativas en su tipo de mandíbula faríngea cuando fue comparada con *A. xiloaensis* y *A. sagittae* ($X^2 = 7.28$, $g.l. = 1$, $P < 0.05$), ($X^2 = 50.91$, $g.l. = 1$, $P < 0.05$), respectivamente (Cuadro 6).

Discusión

El comportamiento puede brindar evidencia directa de aislamiento reproductivo o cohesión de taxa en una situación simpátrica. Los estudios de comportamiento han sido instrumentales en reconocimiento de entidades novedosas, asignación de poblaciones a taxa, y a la estimación de relaciones filogenéticas entre taxa (Trewavas, 1983; Brooks y McLennan, 1991; Wenzel, 1992). El presente estudio *in situ* demuestra que los



Fig. 16. A breeding individual of *Amphilophus* "short" in Lake Apoyo.

Fig. 16. Un individuo en apareamiento de *Amphilophus* "short" en la laguna de Apoyo.



Fig. 17. A pair of *Amphilophus* "short" guarding fry in Lake Apoyo.

Fig. 17. Una pareja de *Amphilophus* "short" cuidando alevines en la laguna de Apoyo.



Fig. 18. A pair of *Amphilophus* “Apoyo amarillo” in Lake Apoyo.

Fig. 18. Una pareja de *Amphilophus* “Apoyo amarillo” en la laguna de Apoyo.



Fig. 19. *Amphilophus* “fat lips” is far less common than the other three species of the Midas Cichlid complex in Lake Xiloá.

Fig. 19. *Amphilophus* “fat lips” es mucho menos abundante que las otras tres especies del complejo de especies de la mojarra común en la laguna de Xiloá.

though breeding at the same time, nest in different habitats. *Amphilophus xiloensis* is found primarily in rocky reefs, *A. sagittae* is most abundant in the rocks/weeds and sandy areas, and *A. amarillo* is widely spread among the weed beds (Fig. 10). Furthermore, there are significant differences in their depth distribution where they coexist. In the rocky habitat, *A. xiloensis* bred the deepest at a mean depth of 16.5m, followed by *A. amarillo* and *A. sagittae* at 13.5m and 7.5m respectively (Fig. 9; Vivas and McKaye, 2001).

The feeding ecology of these taxa also varied among this species complex in Lake Xiloá. *Amphilophus xiloensis* and *A. amarillo* fed on snails, whereas *A. sagittae* ate fish fry, eggs and other softer prey (Table 5). *Amphilophus xiloensis* and *A. amarillo* have shorter blunter snouts, wider heads and deeper and shorter bodies than *A. sagittae* (Stauffer and McKaye, 2002). These features are common among fishes with highly pinnate hypertrophied jaw muscles (Liem and Kaufman, 1984). The above anatomical structures make *A. xiloensis* and *A. amarillo* better adapted for snail feeding. On the other hand, *A. sagittae* displays a different external morphology. They have longer and shallower bodies and heads, and thus have jaw muscles operated mostly by parallel smaller fibred muscles (Liem and Kaufman, 1984). These are adapted characteristics of piscivorous fishes. The different morphological interspecific variants in the morphometrics and adaptation to preferred diets have exerted a crucial impact in the development and formation of the pharyngeal jaw apparatus. Interestingly, *A. amarillo* occasionally feeds on the eggs of the large cichlid species *Parachromis dovii* (McKaye and Van den Bergh, 1996). Meyer (1990) showed that the morphology of the pharyngeal jaw apparatus is phenotypically plastic and not necessarily under full genetic control. In the case of the Xiloá species it is therefore possibly related to the type of food eaten and might not be a direct consequence of a lineage specific morphological character.

The pharyngeal jaw apparatus (PJA) of *A. xiloensis* and *A. amarillo* species are of the molariform type, 95.6% and 75.6% respectively (Table 6). These two species, with molariform PJA type, were found only to eat snails. *Amphilophus sagittae*, on the other hand, has a more papilliform PJA type, which allows this species to be more efficient at eating softer dietary items such as fish eggs and fish fry. The central molariform teeth, however, could allow them to handle smaller snails. The variation in PJA types and adaptations to different trophic niches among the species might have been important in the exploration of various habitat types for breeding grounds. Among the most important factors that might have contributed to the ecological isolation of these taxa are differences in food utilization, compe-

taxa de *A. citrinellus* en la laguna de Xiloá, Nicaragua, previamente llamadas UES (Stauffer *et al.*, 1995; Murry *et al.*, 2001) son, en realidad, especies HERMANAS (Stauffer y McKaye, 2002). Estas especies hermanas, todas se aparean en el mismo tiempo (Fig. 8), pero se alimentan de distintos elementos (Cuadro 5), utilizan diferentes hábitats para nidos (Fig. 10), y tienen diferentes tasas de reclutamiento (Vivas y McKaye, 2001). Distribuciones características cuantitativas de forma bimodal en selección de pareja, explotación de alimentos y hábitat, juntos con apareamiento asociativo, son condiciones primarias necesarias para que la mayoría de los modelos de especiación sean aplicables (Maynard Smith, 1966; Kondrashov y Mina, 1986; Doebeli, 1996; Dieckmann y Doebeli, 1999).

Todas las tres especies exhibieron un pico de apareamiento durante el mes de Noviembre. Además, este pico fue consistente por todos los tipos de hábitats. Las especies, aunque apareándose en la misma temporada, anidan en hábitats distintos. *Amphilophus xiloensis* se encuentra principalmente en los arrecifes pedregosos, *A. sagittae* es más abundante en las rocas/vegetación y en áreas arenosas, y *A. amarillo* está ampliamente distribuida a lo largo de los lechos de vegetación (Fig. 10). También hubo diferencias significativas en su distribución batimétrica donde coexisten. En las rocas, *A. xiloensis* se apareó más en aguas más profundas, a una profundidad modal de 16.5 m, seguida por *A. amarillo* y *A. sagittae* a 13.5 m, y 7.5 m, respectivamente (Fig. 9; Vivas y McKaye, 2001).

La ecología de alimentación de estos taxa también demostró variación entre este complejo de especies en la laguna de Xiloá. *Amphilophus xiloensis* y *A. amarillo* se alimentaron de conchas, mientras *A. sagittae* se alimentó de alevines y huevos de peces, y otras, presas más suaves (Cuadro 5). *Amphilophus xiloensis* y *A. amarillo* tienen hocicos más cortos y despuntados, cabezas más anchas, y cuerpos más profundos y menos largos que *A. sagittae* (Stauffer y McKaye, 2002). Estas facciones son comunes entre peces con hipertrofiados músculos mandibulares altamente ligeros (Liem y Kaufman, 1984). Las estructuras anatómicas mencionadas arriba hacen *A. xiloensis* y *A. amarillo* mejor adaptadas a comer conchas. Por otro lado, *A. sagittae* demuestra una morfología externa diferente. Individuos de esta especie tienen cuerpos y cabezas más largos y menos profundos, y por ende tienen músculos mandibulares principalmente con músculos de fibras paralelas más cortas (Liem y Kaufman, 1984). Estas son características adaptivas de peces piscívoros. Las diferentes variantes morfológicas interespecíficas en la morfométrica y adaptación a las dietas preferidas han ejercido un impacto crucial en el desarrollo y for-

tion for breeding sites (McKaye and Barlow, 1976; McKaye, 1977), high predation pressures in the different habitat types (McKaye, 1977) and different levels of aggressiveness among the taxa of this species complex (Murry *et al.*, 2001).

Barlow and Munsey (1976) recognized a separate form of the Midas Cichlid species complex in Lake Apoyo (Figs. 11-12, 20-21), and named it *A. zaliosus*, the Arrow Cichlid. This species is piscivorous and has a similar shape to *A. sagittae* (Figs. 22-23, 28-29) in Lake Xiloá. It appears to be genetically closer to all other Midas Cichlid species in Lake Apoyo than to *A. sagittae* in Lake Xiloá (McKaye *et al.*, 1998b). Within Lake Apoyo alone, four different forms of Midas Cichlids can be recognized (Figs. 11-14, 16-18, 20-21). Our genetic data (Stauffer *et al.*, 1995; McKaye *et al.*, 1998b) indicate that all of these species are more closely related to each other than to those in Lake Xiloá. This suggests that the radiation of species within Lake Apoyo and Lake Xiloá are separate, and that the similar morphologies are due to convergent evolution (Kocher *et al.*, 1993). It appears that sympatric speciation may indeed be occurring in each of the crater lakes (McKaye, 1980). However, introgression between species could also explain some of these results (McKaye *et al.*, 1998b). Subsequently the genetic similarity of these cichlids in the two lakes has been supported by later research (Wilson *et al.*, 2000).

Owen *et al.* (1990) studied species flocks of rocky-shore dwelling cichlids in Lake Malawi and found that almost every rocky outcrop and island has a unique fauna with endemic color forms and species that evolved in the past two hundred years. Nicaragua is of geologically recent origin. The region was formed in the late cretaceous or early Paleocene (Villa, 1982). This implies that the great basin of Nicaraguan lakes is of recent formation, and so its ichthyofauna. Rapid allopatric and intralacustrine speciation might be taking place within the *Amphilophus* species group. Further careful research examining the behavior, morphology, and genetics of these fishes is required to determine the phylogeny and species composition of this species complex.

The Great Lakes Basin of Nicaragua (Fig. 1) provides a unique opportunity to study the process of evolution occurring in rapidly evolving species. The phenomenon of rapid and separate evolution of complex traits, which distinguish these species, needs to be examined throughout the country. We believe that each crater lake has its own unique suite of species or ESUs on their own evolutionary trajectory. Between 15-30 Midas Cichlid species or ESUs probably exist and need to be identified. This colorful and evolutionarily interesting group of fishes needs to be conserved as a whole and pro-

mación del aparato de la mandíbula faríngea. Un dato muy interesante es que *A. amarillo* eventualmente se alimenta de los huevos de la especie grande de cíclidos *Parachromis dovii* (McKaye y van den Berghe, 1996).

Los aparatos mandibulares faríngeos (AMF) de *A. xiloensis* y *A. amarillo* son del tipo molariforme, 95.6% y 75.6%, respectivamente (Cuadro 6). Estas dos especies se encontraron con dieta únicamente de conchas. *Amphilophus sagittae*, por otro lado, tiene un tipo de AMF más papiliforme, que permite que esta especie sea más eficiente en comer artículos más suaves como huevos y alevines de peces. Sin embargo, los dientes molariformes centrales pueden permitirles manejar conchas más pequeñas. La variación en tipos de AMF y las adaptaciones a diferentes nichos tróficos entre las especies pueden haber sido importantes en la exploración de diferentes tipos de hábitats para sitios de anidación. Entre los factores más importantes que pueden haber contribuido al aislamiento ecológico de estos taxa son diferencias en utilización de alimentos, competencia para sitios de apareamiento (McKaye y Barlow, 1976; McKaye, 1977), presiones altas de predación en los diferentes tipos de hábitats (McKaye, 1977) y diferentes niveles de agresividad entre los taxa dentro de este complejo de especies (Murry *et al.*, 2001).

Barlow y Munsey (1976) reconocieron una forma del complejo de especies de la mojarra común en la laguna de Apoyo (Figs. 11-12, 20-21), y la nombraron *A. zaliosus*, el Cíclido Flecha. Esta especie es piscívora y tiene una forma semejante a la de *A. sagittae* (Figs. 22-23, 28-29) en la laguna de Xiloá. No obstante, parece ser genéticamente más cerca a todas las otras formas en la laguna de Apoyo que a *A. sagittae* en la laguna de Xiloá (McKaye *et al.*, 1998b). Solamente dentro de la laguna de Apoyo, cuatro diferentes formas de mojarra comunes se pueden reconocer (Figs. 11-14, 16-18, 20-21). Nuestros datos genéticos (Stauffer *et al.*, 1995; McKaye *et al.*, 1998b) indican que todas estas especies están más estrechamente relacionadas entre sí que con las de la laguna de Xiloá. Esto sugiere que la radiación de especies en la laguna de Apoyo y la en la laguna de Xiloá son distintas, y que las morfologías semejantes son atribuibles a evolución convergente (Kocher *et al.*, 1993). Parece que especiación simpátrica puede estar sucediendo en cada una de las lagunas cratéricas (McKaye, 1980). Sin embargo, la introgresión entre especies podría explicar algunos de los resultados (McKaye *et al.*, 1998b). Subsecuentemente, la semejanza genética de estos peces cíclidos en las dos lagunas ha sido sostenida por investigación posterior (Wilson *et al.*, 2000).

Owen *et al.* (1990) estudiaron agrupaciones de especies monofiléticas de peces cíclidos que habitan orillas rocosas en el lago de Malawi y encontraron que



Fig. 20. A non-breeding individual of *Amphilophus zaliosus* in Lake Apoyo with an approximate total length of about 12 cm.

Fig. 20. Un individuo fuera de apareamiento de *Amphilophus zaliosus* en la laguna de Apoyo, con un largo total aproximado de 12 cm.



Fig. 21. A fry-guarding female of *Amphilophus zaliosus* in Lake Apoyo.

Fig. 21. Una hembra de *Amphilophus zaliosus*, cuidando alevines, en la laguna de Apoyo.



Fig. 22. A non-breeding individual of *Amphilophus sagittae* in Lake Xiloá with an approximate total length of about 8 cm.

Fig. 22. Un individuo fuera de apareamiento de *Amphilophus sagittae* en la laguna de Xiloá, con un largo total aproximado de 8 cm.



Fig. 23. A breeding pair of *Amphilophus sagittae* in Lake Xiloá defend their offspring.

Fig. 23. Una pareja de *Amphilophus sagittae*, en apareamiento en la laguna de Xiloá, defienden a sus proles.

tected for their intrinsic value as food fishes, as possible candidates for aquaculture and as attractions for ecotourism. These fishes are of importance to the scientific world because they offer the unique opportunity to study the processes of speciation in a highly diversified region under a variety of circumstances. We suggest that the Nicaraguan government and UNESCO work together to designate this unique ecoregion with freshwater sharks, endemic fishes, and abundant bird life as a World Heritage Site. Such distinction would play a significant role in attracting the world's attention to this extraordinary region and acknowledging its value to mankind in general. The economic benefits of ecotourism could be substantial as has been found to be the case in Malawi where Lake Malawi National Park was designated as the first World Heritage Site for its unique freshwater fish fauna.

Special conservation measures must also be applied to protect the endemic species of Nicaragua. The entire native range of the Midas Cichlid species complex is limited to the San Juan River Basin, which encompasses the Nicaraguan Great Lakes system, the volcanic crater lakes in this watershed, and other, smaller, watersheds in the Atlantic versant of Costa Rica, as far south as the Matina River (Bussing, 1998). We estimate that the majority of endemic vertebrates in Nicaragua are freshwater fishes, far exceeding the numbers of other vertebrate groups (Gillespie *et al.*, 2001). The limited range of the entire species complex and the extremely limited ranges of the species (Stauffer and McKaye, 2002), require protection and proper management of the entire Lake Nicaragua Ecoregion. We recommend the registration of the species described above in an appropriate classification in the IUCN "Red List" system and a moratorium on exotic fish introductions in the natural waters where members of the Midas Cichlid species complex are found (McCrary *et al.*, 2001). We consider that the greatest current threat to the diversity of this species complex is the cage cultivation of tilapia, which leads to establishment of escapees which has been correlated with dramatic reductions in numbers of Midas Cichlids in Lake Nicaragua (McKaye *et al.*, 1995; McKaye *et al.*, 1998a).

Waid *et al.* (1999) reported the presence of Midas Cichlids in eight crater lakes in the Great Lakes Basin of Nicaragua. It was during this study that our attention was drawn to the fact that we are dealing with a multitude of Midas Cichlid species within the crater lakes. Undoubtedly a more extensive study throughout the country will reveal an even richer fauna than we now appreciate.

casi cada promontorio rocoso e isla tiene fauna única con patrones de colores endémicos y especies que han evolucionado en los últimos doscientos años. Nicaragua es de origen geológicamente reciente. La región fue formada en el Cretáceo tardío o en el temprano Paleoceno (Villa, 1982). Esto implica que la gran cuenca que lagos nicaragüenses (Fig. 1) es de formación reciente, y por ende su ictiofauna. Especiación rápida alopatrica y también intralacustrina puede estar sucediendo dentro el grupo de especies de *Amphilophus*. Más investigación cautelosa sobre el comportamiento, la morfología y la genética de estos peces es necesario para determinar la filogenética y composición de especies de este complejo.

La cuenca de los Grandes Lagos de Nicaragua provee una oportunidad única a estudiar el proceso evolutivo de especies que evolucionan rápidamente. El fenómeno de evolución rápida y separada de características complejas, que distinguen estas especies, necesita ser examinado a lo largo del país. Creemos que cada laguna cratérica contiene su propio conjunto de especies o UES en su propia linaje evolutivo. Entre 15-30 especies o UES de la mojarra común probablemente existen y necesitan ser identificadas. Este grupo de peces, colorido y tan interesante desde el punto de vista evolutivo, necesita ser conservado y protegido, tanto por su valor intrínseco como para alimentación, posibles candidatos para acuicultura, y atracciones para ecoturismo. Son importantes para el mundo científico por la oportunidad única de estudiar el proceso de especiación en una variedad de circunstancias en una región de alta diversidad. Proponemos que el gobierno nicaragüense y la UNESCO trabajen juntos para designar esta región única con tiburones de agua dulce, peces únicos, y abundancia de aves, como un Sitio de Herencia Mundial. Tal identificación jugaría un papel significativo en atraer la atención del mundo a esta hermosa región y reconocer su valor a la humanidad en general. Los beneficios al ecoturismo pueden ser sustanciales, como ha sido el caso en Malawi donde el Parque Nacional Lago Malawi fue designado como el primer Sitio Mundial de Herencia por su ictiofauna de agua dulce de carácter único.

Medidas especiales de conservación deben ser aplicadas para proteger las especies endémicas de Nicaragua. El rango entero de la mojarra común es limitado a la cuenca del Río San Juan, que abarca el sistema de los Grandes Lagos y las lagunas cratéricas, y otras, y otras más pequeñas cuencas en la vertiente del Atlántico en Costa Rica, hasta el Río Matina (Bussing 1998). Estimamos que la mayoría de los vertebrados endémicos en Nicaragua son peces de agua dulce, excediendo con mucho a los otros grupos (Gillespie *et al.*, 2001). El rango limitado del complejo entero de la

Acknowledgments

This research was supported by grants to K.R. McKaye, E.P. van den Berghe from United States National Science Foundation, United States Agency for International Development. Also, K.R. McKaye, J.K. McCrary and E.P. van den Berghe were supported by the Fulbright program during the course of this research. We particularly wish to thank the Government of Nicaragua and the former Minister of MARENA, Dr. Jaime Incer, for his support in starting this project.

References — Referencias

- ALBERTSON, R. C., J. A. MARKERT, P. D. DANLEY, and T. D. KOCHER. 1999. Phylogeny of a rapidly evolving clade: The cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa. *Proceedings National Academy Science* 96: 5107-5110.
- BANIC. 1977. *Informe Financiero 1976*. Banco Nicaragüense de Industria y Comercio, Managua, Nicaragua. 46pp.
- BARLOW, G.W. 1976. The Midas Cichlids in Nicaragua. pp. 333-358. In: T.B. Thorson (ed.) *Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan lakes*. University of Nebraska, Lincoln.
- BARLOW, G.W. 2000. *The Cichlid Fishes: Nature's Grand Experiment in Evolution*. Perseus, Cambridge, Mass. 335 pp.
- BARLOW, G.W. and J.W. MUNSEY. 1976. The Red Devil-Midas Cichlid species complex in Nicaragua. pp. 359-370. In: T.B. Thorson (ed.) *Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan lakes*. University of Nebraska, Lincoln.
- BARLOW, G. W., J.R. Baylis, and D.A. Roberts. 1976. Chemical analyses of some crater lakes in relation to adjacent Lake Nicaragua. pp. 17-20. In: T.B. Thorson (ed.) *Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan lakes*. University of Nebraska, Lincoln.
- BICE, D. 1985. Quaternary volcanic stratigraphy of Managua, Nicaragua. *Geological Society of America Bull.* 96: 553-566.
- BROOKS, D.R. and D.A. McLENNON. 1991. *Phylogeny, ecology, and behavior*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- BUSSING, W.A. 1998. Freshwater Fishes of Costa Rica. *International Journal Tropical Biology*, 46, suppl. 2: 1-468.
- COLEMAN, R. 2001. (ed.) Cichlid Research: State of the Art. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences* Volume 9.
- CORBET, S.A., J. GREEN, J. GRIFFITH, and E. BETNEY. 1973. Ecological studies on crater lakes in West Cameroon. Lakes Kotto and Mboandong. *Journal of Zoology*. 170: 309-324.
- mojarra común y los rangos extremadamente limitados de las especies individuales (Stauffer y McKaye, 2002), exigen protección y manejo adecuado de la eco-región del Lago Cocibolca entero. Recomendamos que se registren las especies descritas anteriormente en una clasificación apropiada en el sistema "Lista Roja" de la UICN y una moratoria en las introducciones de peces exóticos en las aguas naturales donde la mojarra común se encuentra (McCrary *et al.*, 2001). Consideramos que la amenaza actual mayor a la diversidad en este complejo de especies es el cultivo en jaulas de la tilapia, que precede el establecimiento de individuos escapados, lo que has sido asociado con reducciones dramáticas en números de mojarra en el lago Cocibolca (McKaye *et al.*, 1995, 1998a), y con la destrucción de hábitat en la laguna de Apoyo (McCrary *et al.*, 2001).
- Waid *et al.*, (1999) reportaron la presencia de la mojarra común en cada una de las ocho lagunas cratéricas estudiadas en la cuenca de los Grandes Lagos de Nicaragua. Fue durante este estudio que nuestra atención se dirigió al concepto de que podemos encontrar múltiples especies en las lagunas cratéricas. Sin duda, un estudio más comprensivo por todo el país revelará una fauna aún más rica que ahora apreciamos.

Reconocimientos

La presente investigación fue apoyada por subvenciones a K.R. McKaye y a E.P. van den Berghe de la National Science Foundation de Estados Unidos, y de la Agencia para el Desarrollo Internacional de Estados Unidos. También, K.R. McKaye, J.K. McCrary y E.P. van den Berghe recibieron el apoyo del programa Fulbright durante el transcurso de esta investigación. Queremos agradecer particularmente al Gobierno de Nicaragua y al ex-Ministro de Recursos Naturales y el Medio Ambiente, el Dr. Jaime Incer, por su apoyo en la iniciación de este proyecto.



Fig. 24. Both male and female of this breeding pair *Amphilophus xiloaensis* are of the gold morph.

Fig. 24. Ambos macho y hembra de esta pareja de *Amphilophus xiloaensis* son del morfotipo "oro".



Fig. 25. This specimen of *Amphilophus xiloaensis* is either changing its color pattern or is only partly of the gold morph.

Fig. 25. Este individuo de *Amphilophus xiloaensis* es o cambiando su patrón de colores o presente solamente parcialmente la morfología "oro".



Fig. 26. This brood-guarding female *Amphilophus amarillo* was photographed in April when breeding in this species is rarely observed.

Fig. 26. Esta hembra cuidando alevines, de *Amphilophus amarillo*, fue fotografiada en Abril, cuando anidación en esta especie es poco observada.



Fig. 27. At the peak of the breeding season male *Amphilophus amarillo* seem to be more protective of their offspring and remain close to the brood.

Fig. 27. En el pico de la temporada de apareamiento, machos de *Amphilophus amarillo* parecen más protectores de sus proles, y se mantienen cerca de la cría.

- DIECKMANN, U. and M. DOEBELI. 1999. On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* 400: 354 - 357.
- DOEBELI, M.A. 1996. A quantitative genetic competition model for sympatric speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 893-909.
- FRYER, G. and T.D. ILES. 1972. *The Cichlid Fishes of the Great Lakes of Africa*. Oliver and Boyd, London.
- GILLESPIE, T.W., K.E. NICHOLSON, J.K. MCCRARY. 2001. Patterns of vertebrate species richness and conservation in Nicaragua. *Natural Areas Journal* 21: 159-167.
- HALE, J. 2000. *The Reproductive Biology of a Cichlid Fish from Lake Xiloá, Nicaragua*. Master's Thesis. Frostburg State University, Maryland.
- INCER, J. 1975. *Geografía Ilustrada de Nicaragua*. Editora y Distribuidora Nicaragüense, S.A., Managua, Nicaragua. 255 pp.
- KEENLEYSIDE, M.H.A. 1991. *Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology and Evolution*. Chapman and Hall, London. 378 pp.
- KOCHER, T.D., J.A. CONROY, K.R. MCKAYE, and J.R. STAUFFER. 1993. Similar morphologies of cichlid fish in lakes Tanganyika and Malawi are due to convergence. *Molecular Phylogenetics & Evolution* 2(2): 158-165.
- KONDRASHOV A.S. and M.V. MINANOT V. MINAM, 1986. Sympatric speciation. When is it possible? *Biological Journal Linnean Society* 2: 201-233.
- LIEM, K.F. and L.S. KAUFMAN. 1984. Intraspecific macroevolution: Functional biology of the polymorphic cichlid species *Cichlasoma minckleyi*. pp 203-215. In: Echelle, A.A. and I.L. Kornfield (eds) *Evolution of Fish Species Flocks*. University of Maine Press, Orono.
- LOWE-McCONNELL, R.H. 1991. Ecology of cichlids in South American and African waters, excluding the African Great Lakes. p. 60-83. In: Keenleyside, M.H.A. (ed.) *Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology, and Evolution*. Chapman & Hall, London.
- MAYNARD SMITH, J. 1966. Sympatric speciation. *American Naturalist* 100: 637-650.
- MAYR, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- MAYR, E. 1970. *Populations, Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- MCCRARY, J.K., E.P. VAN DEN BERGHE, K.R. MCKAYE, and L.J. LÓPEZ PÉREZ. 2001. Tilapia cultivation: a threat to native species in Nicaragua. *Encuentro* 58: 9-19.
- MCKAYE, K.R. 1977. Competition for breeding sites between the cichlid fishes of Lake Jilóa, Nicaragua. *Ecology* 58: 291-302.
- 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. *Environmental Biology of Fishes* 5(1): 75-78.
- MCKAYE, K.R. 1984. Behavioural aspects of cichlid reproductive strategies: Patterns of territoriality and brood defense in Central American substratum spawners versus African mouth brooders. pp. 245-273. In: R. J. Wootton & C. W. Potts (eds.). *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*. Academic Press, London.
- MCKAYE, K.R. 1991. Sexual selection and the evolution of the cichlid fishes of Lake Malawi, Africa. In: M. Keenleyside (ed.). *Behavior, Ecology, and Evolution of Cichlid Fishes*. Chapman, Hall, London, pp. 241-257.
- MCKAYE, K.R. and G.W. BARLOW. 1976. Competition between color morphs of the Midas Cichlid, *Cichlasoma citrinellum*, in Lake Jilóa, Nicaragua. pp. 465-475. In: T.B. Thorson (ed.) *Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan Lakes*, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska.
- MCKAYE, K.R. and E.P. VAN DEN BERGHE. 1996. Parallel evolution of a complex feeding behavior by African and Central American Cichlids. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 7: 143-148.
- MCKAYE, K.R., E.P. VAN DEN BERGHE, T.D. KOCHER, and J.R. STAUFFER JR. 1998b. Assortative mating by taxa of the Midas Cichlid '*Cichlasoma*' *citrinellum*: Sibling species or taxa speciating? *Tropical Fish Biology: An International Symposium*. p. 38. University of Southampton, United Kingdom.
- MCKAYE, K.R., J.D. RYAN, J.R. STAUFFER, JR., L.J. LÓPEZ PÉREZ, and E.P. VAN DEN BERGHE. 1995. African tilapia in Lake Nicaragua: Ecosystem in transition. *Bioscience* 45: 406-411.
- MCKAYE K.R., J.D. RYAN, J.R. STAUFFER, L.J. LÓPEZ PÉREZ, G.I. VEGA, E.P. VAN DEN BERGHE, AND J.K. MCCRARY. 1998a. Tilapia africana en el Lago de Nicaragua: Ecosistema en transición. *Encuentro* 46: 46-53.
- MCKAYE, K.R., J.R. STAUFFER, JR., AND J.K. MCCRARY 2001. The Midas Cichlid species complex of Nicaragua: Evidence for Sympatric Speciation? *Cichlid News*. 10: 28-34.
- MEYER, A. 1990. Ecological and evolutionary consequences of the trophic polymorphisms in *Cichlasoma citrinellum*. *Biological Journal Linnean Society* 39: 279-299.
- MURRY, B.A., E.P. VAN DEN BERGHE, and K.R. MCKAYE. 2001. Brood defense behavior of three sibling species in *Amphilophus citrinellus* species complex in Lake Xiloá, Nicaragua. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences* 9: 134-149.

- OWEN, R.B., R. CROSSLEY, T.C. JOHNSON, D. TWEDDLE, S. DAVIDSON, I. KORNFIELD, D.H. ECCLES, and D.E. ENGSTROM. 1990. Major low levels of Lake Malawi and implications of speciation rates in cichlid species. *Proceeding Royal Society London B* 240: 519-553.
- RAYMOND, M. and F. ROUSSET. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity* 86: 248-249.
- RESNICK, R. and L.D. STEIN. 1995. *STS Pipeline 1.2*. Cambridge, MA. Whitehead Institute for Biomedical Research.
- SCHLIEWEN, U., K. RASSMANN, M. MARKMANN, J. MARKERT, T. KOCHER, AND D. TAUTZ. 2002. Genetic and ecological divergence of a monophyletic cichlid species pair under fully sympatric conditions in Lake Ejagham, Cameroon. *Molecular Ecology*. In press.
- STAUFFER, JR., J.R. and K.R. MCKAYE. 2002. Description of three new species of cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) from Lake Xiloá, Nicaragua. *This volume*: 1-18.
- STAUFFER, JR. J. R., N.J. BOWERS, K.R. MCKAYE, and T.D. KOCHER. 1995. Evolutionarily significant units among cichlid fishes: The role of behavioral studies. *American Fisheries Society Symposium* 17: 227-244.
- STAUFFER, JR. J.R., N.J. BOWERS, K.A. KELLOGG, and K.R. MCKAYE. 1997. A revision of the blue-black *Pseudotropheus zebra* (Teleostei: Cichlidae) complex from Lake Malawi, Africa, with a description of a new genus and ten new species. *Proceedings Academy Natural Science Philadelphia* 148: 189-230.
- STAUFFER, JR. J.R., T.J. LOVULLO, and K.R. MCKAYE. 1993. Three new sand-dwelling cichlids from Lake Malawi, Africa, with a discussion of the status of the genus *Copadichromis* (Teleostei: Cichlidae). *Copeia* 1993: 1017-1027.
- STIASSNY, M.L.J., U.K. SCHLIEWEN, and W.J. DOMINEY. 1992. A new species flock of cichlid fishes from Lake Bermin, Cameroon with a description of eight new species of *Tilapia* (Labroidei: Cichlidae). *Ichthyological exploration of Freshwaters*. 3: 311-346.
- TREWAVAS, E. 1983. *Tilapine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis, and Danakilia*. British Museum (Natural History) Publication No. 878, London. 583 pp.
- TREWAVAS, E., J. GREEN, and S.A. CORBET. 1972. Ecological studies on crater lakes in West Cameroon. Fishes of Barombi Mbo. *Journal Zoological Society London* 167: 41-95.
- VILLA, J. 1968. Una teoría sobre el origen de los peces de Xiloá. *Encuentro: Rev. Univ. Centroamericana* 1(4): 202-214
- VILLA, J. 1982. Peces Nicaragüenses de Agua Dulce. p. 253. In: *Coleccion Cultural*, Banco de America, Managua.
- VIVAS, R.P. and K.R. MCKAYE. 2001. Habitat selection, feeding ecology and fry survivorship in the *Amphilophus citrinellus* in Lake Xiloá, Nicaragua. *Journal of Aquariculture and Aquatic Sciences* 9: 32-48.
- WAID, R.M., R.L. RAESLY, K.R. MCKAYE and J.K. MCCRARY. 1999. Zoogeografía íctica de lagunas cratéricas de Nicaragua. *Encuentro* 51: 65-80.
- WENZEL, J.W. 1992. Behavioral homology and phylogeny. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23: 361-381.
- WILSON, A.B., K. NOACK-KUNNMANN, and A. MEYER. 2000. Incipient speciation in sympatric Nicaraguan crater lake cichlid fishes: sexual selection versus ecological diversification. *Proceedings Royal Society London B Bio*. 267: 2133-2141.
- WITTE, F., T. GOLDSCHMIDT, P.C. GOUDSWAARD, W. LIGTVOET, M.J.P. VAN OIJEN, and J.H. WANINK. 1992. Species extinction and concomitant ecological changes in Lake Victoria. *Neth. J. Zool*. 42: 214-232.



Fig. 28. Breeding pairs of *Amphilophus sagittae* are often seen over sand in shallow water along the edge of rocky habitats.

Fig. 29. Parejas en apareamiento de *Amphilophus sagittae* se encuentran frecuentemente sobre arena en aguas someras a la par de hábitats rocosas.



Fig. 29. A gold morph of *Amphilophus sagittae* in Lake Xiloá.

Fig. 29. Un morfotipo de *Amphilophus sagittae* en la laguna de Xiloá.



Fig. 30. A male *Amphilophus* "fat lips" in Lake Xiloá.

Fig. 30. Un macho *Amphilophus* "fat lips" en la laguna de Xiloá.



Fig. 31. *Amphilophus* "fat lips" is a very rare form in Lake Xiloá but breeding pairs always breed true and are therefore seldomly seen.

Fig. 31. *Amphilophus* "fat lips" es una forma muy rara en la laguna de Xiloá pero parejas se forma asociativamente y por ende, son poco vistas.