

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Par RACHEL MASSICOTTE

Fidélité au site comme mécanisme d'isolement reproducteur entre les membres sexués et asexués et entre les populations sympatriques du complexe *Phoxinus eos-neogaeus*

Département des sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences biologiques

Août 2006



QH

302

U54

2006

V.008

2006 MAR 2

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

Ce mémoire intitulé:

**Fidélité au site comme mécanisme d'isolement reproducteur entre les
membres sexués et asexués et entre les populations sympatriques
du complexe *Phoxinus eos-neogaeus***

Présenté par:
RACHEL MASSICOTTE

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Daniel Boisclair président-rapporteur
Julie Turgeon membre du jury
Bernard Angers co-directeur de recherche
Pierre Magnan co-directeur de recherche

Mémoire accepté le 4 août 2006

SOMMAIRE

L'établissement d'un isolement pré-zygotique est une des voies menant à un événement de spéciation. La fidélité au site de natalité est l'un des mécanismes permettant un isolement pré-zygotique entre les individus qui fréquentent des sites de reproduction différents d'un même milieu. Le complexe *Phoxinus eos-neogaeus* est un modèle biologique d'intérêt pour l'étude de ces mécanismes. Ce complexe est composé de deux espèces sexuées, le ventre rouge du Nord (*P. eos*) et le ventre citron (*P. neogaeus*) pouvant s'hybrider et produire des hybrides gynogénétiques asexués. Un isolement pré-zygotique pourrait ainsi s'observer entre 1) les hybrides gynogénétiques asexués et les hôtes sexués, 2) les populations parentales en sympatrie. Ce projet a pour objectif d'étudier les mécanismes qui 1) permettent la coexistence des membres sexués et asexués du complexe *P. eos-neogaeus* et 2) sont impliqués dans la formation et le maintien des populations en sympatrie. Une approche de capture-marquage-recapture a été utilisée afin d'identifier les individus qui démontrent de l'attachement à un site pendant la période de reproduction. Premièrement, la distribution spatiale et temporelle des différents membres du complexe a été déterminée au lac Desjardins. Les données révèlent que la niche reproductive des hybrides asexués ne chevauche que partiellement celle de l'espèce parentale (*P. eos*). Cela peut représenter un mécanisme régulateur permettant leur coexistence (Frozen Niche Variation model) ou une dépendance réduite des hybrides asexués envers l'espèce parentale, témoignant d'un isolement pré-zygotique entre ces deux groupes. Deuxièmement, nous avons déterminé si *P. eos* présentait un comportement de fidélité au site de natalité. Les résultats révèlent que les populations

parentales de *P. eos* en sympatrie présentent un début de différenciation génétique. Le comportement observé est donc un comportement de fidélité au site de natalité qui agit comme mécanisme d'isolement pré-zygotique entre les populations. Ce résultat est singulier considérant le niveau temporel (10 KY) et géographique (intra-lac, mètres) très fin du système à l'étude. Le complexe *P. eos-neogaeus* représente donc une opportunité unique pour explorer les étapes préliminaires menant à l'apparition de nouvelles espèces.

Mots clés: complexe *Phoxinus eos-neogaeus*, isolement pré-copulatoire, fidélité au site de natalité, expérience de marquage-recapture, identification génétique, différenciation génétique, spéciation sympatrique.

SUMMARY

Pre-zygotic isolation is one of the first step leading to speciation. Natal-site fidelity is one of the mechanisms allowing pre-zygotic isolation among individuals that frequent different reproduction sites of an environment. The *Phoxinus eos-neogaeus* complex represents an interesting biological model to study these mechanisms. The complex is composed of two sexual species, the northern redbelly dace (*P. eos*) and the finescale dace (*P. neogaeus*) that hybridize to produce asexual gynogenetic hybrids. Pre-zygotic isolation could take place 1) between asexual gynogenetic hybrids and their sexual hosts, 2) among sympatric populations of parental species. The aim of this project is to study the mechanisms 1) allowing a stable coexistence of asexual hybrids and their sexual hosts and 2) involved in the formation and maintenance of populations in sympatry. We used a mark-recapture approach to identify individuals that exhibit a clear preference for a site during the reproduction period. First, the spatio-temporal distribution of the members of this complex was determined in Lake Desjardins. Data revealed that the reproductive niche of asexual hybrids only partially overlap that of parental species (*P. eos*). This may be viewed as a mechanism regulating their coexistence (Frozen Niche Variation model) or because asexual hybrids are less dependent of parental species than expected, which evidence pre-zygotic isolation between these two groups. Second, we investigated if *P. eos* exhibited natal-site fidelity. Data revealed that sympatric populations of *P.eos* are at their early stage of genetic differentiation. The behavior observed is therefore a natal-site fidelity that act as an effective pre-zygotic isolation mechanism among populations. Such results are striking according to the fine temporal (10 KY) and geographical scale (intra-lake, meters) of this system. *P. eos-neogaeus* complex

seems then to represent a unique opportunity to investigate the existence of incipient species.

Key words: *Phoxinus eos-neogaeus* complex, pre-mating isolation, natal site fidelity, mark-recapture experiments, genetic identification, genetic differentiation, sympatric speciation.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Summary	v
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xii
Liste des sigles et abréviations	xiii
Dédicace	xv
Remerciements	xvi
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 STRUCTURE DES POPULATIONS	3
1.2 FIDÉLITÉ AU SITE	4
1.2.1 Formes de fidélité au site	5
1.2.2 Méthodes de détection	6
1.3 FIDÉLITÉ AU SITE À DIFFÉRENTES ÉCHELLES GÉOGRAPHIQUES	7
1.3.1 Milieu marin	8
1.3.2 Espèces anadromes	10
1.3.3 Milieu d'eau douce	12
1.4 VALEUR ADAPTATIVE DE LA FIDÉLITÉ AU SITE	14
1.5 ADAPTATION LOCALE	15
1.6 LE COMPLEXE <i>PHOXINUS EOS-NEOGAEUS</i>	17
1.7 COEXISTENCE DES ESPÈCES SEXUÉES ET ASEXUÉES.....	19
1.8 OBJECTIF ET HYPOTHÈSES DE L'ÉTUDE	21
2. ARTICLE: SEGREGATION OF REPRODUCTIVE NICHES AND COEXISTENCE OF UNISEXUAL <i>PHOXINUS EOS-NEOGAEUS</i> HYBRIDS AND PARENTAL SPECIES	26
SUMMARY	27
2.1 INTRODUCTION	28

2.2 MATERIALS AND METHODS	31
2.2.1 MARK-RECAPTURE EXPERIMENT.....	31
2.2.2 GENETIC IDENTIFICATION	35
2.3 RESULTS	35
2.3.1 REPRODUCTIVE PERIOD	35
2.3.2 SITE FIDELITY	36
2.3.3 GENETIC IDENTIFICATION OF RECAPTURES.....	39
2.4 DISCUSSION	42
2.4.1 SITE FIDELITY	42
2.4.2 SPATIO-TEMPORAL DISTRIBUTION OF SEXUAL AND ASEXUAL TAXA	44
2.4.3 COEXISTENCE OF PARENTAL SPECIES AND ASEXUAL HYBRIDS	45
2.5 ACKNOWLEDGMENTS.....	49
3. ARTICLE: NATAL-SITE FIDELITY AND REPRODUCTIVE ISOLATION AMONG RECENTLY FOUNDED SYMPATRIC POPULATIONS OF NORTHERN REDBELLY DACE (<i>PHOXINUS EOS</i>)	51
SUMMARY	52
3.1 INTRODUCTION	53
3.2 MATERIALS AND METHODS	55
3.2.1 SAMPLING	55
3.2.2 DETECTION OF POLYMORPHISM	57
3.2.3 GENETIC ANALYSES	57
3.3 RESULTS	59
3.4 DISCUSSION	65
3.4.1 SPAWNING SITES AS DISTICNT POPULATIONS	65
3.4.2 SYMPATRIC <i>VS</i> ALLOPATRIC POPULATIONS	67
3.4.3 EVOLUTIONARY IMPLICATIONS OF SYMPATRIC DIFFERENTIATION	67

3.5 ACKNOWLEDGEMENTS	70
4. CONCLUSION	71
5. RÉFÉRENCES	79

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2

- Table I.** Number of individuals marked at the four study sites (A, B, C, and D; Figure 1) in Lake Desjardins. 33
- Table II.** Number of recaptures at the four marking sites (A, B, C, and D; Figure 1). The diagonal represents the number of individuals that were recaptured at their marking site. Numbers in parentheses refer to the total number of captures at the marking site. 37
- Table III.** Average percent recaptures \pm SD at the marking site and at the intersite for the 2-3 and 17-18 June 2004 samples. Total captures are given as well as the number of recaptures (in parentheses). 39
- Table IV.** Results of the genetic identification of individuals recaptured at the four marking sites (A, B, C, and D; Figure 1) for the different periods of the experiment (T1: 27 May to 3 June; T2: 9 to 15 June). For a given site, immigration represents individuals recaptured at this site but marked elsewhere and emigration represents individuals marked at this site but recaptured elsewhere. The number of gynogens that displayed site fidelity is indicated in parentheses. 41

Chapitre 3

Table I. Number of individuals analyzed, number of alleles, gene diversity over all loci, and Hardy-Weinberg equilibrium probability for all sites of lakes Desjardins and Beaver and for all sites within each lake pooled. Numbers in parentheses are the mean number of alleles and the mean gene diversity per lake and for both lakes combined.

..... 60

Table II. Results of the multilocus HWE, heterozygotes deficit and allelic differentiation tests (p-values) for different intra-lake sites combinations in Desjardins and Beaver lakes. 62

Table III. Number of migrants per generation estimated with the private alleles method (above the diagonal) and with the D_{CE} genetic distance (below the diagonal) computed for each pairwise comparison of sites from Desjardins and Beaver lakes.

..... 64

LISTE DES FIGURES

Chapitre 2

Figure 1. Map of Lake Desjardins showing sampling sites. Black circles correspond to marking site A, B, C, and D. Open circles represent the 12 additional fishing sites (referred to as intersites 1 through 12)..... 32

Figure 2. Number of captures per site (A) and inferred number of captures per genotype (B) at different sampling sessions (T1: 27 May to 3 June; T2: 9 to 15 June).
..... 42

Chapitre 3

Figure 1. Map of Lake Desjardins and Lake Beaver with sampling sites indicated (Desjardins: A, B, C, D; Beaver E, F, G). 56

Figure 2. Allelic frequencies at the six microsatellite loci for the seven sampled sites. Each circle represents one allele and the size of the circle represents its frequency. Y-axis refers to the size of alleles. Letters correspond to sites from lakes Desjardins (A, B, C, D) and Beaver (E, F, G) (see Figure 1). 61

Figure 3. Phylogenic tree inferred with the neighbor-joining algorithm and D_{CE} genetic distances among sites A, B, C, D (Desjardins L.) and E, F, G (Beaver L.). Bootstrap values are indicated. 65

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMOVA	Analyse of molecular variance
bp	Base pairs
CMR	Capture - marquage et recapture
Dce	Chord distance
°C	Degrés Celsius
D	Divergence
DNA	Deoxyribonucleic acid
F_{st}	Indice de différentiation génétique entre les populations (inter-lacs)
F_{sc}	Indice de différentiation génétique entre les populations (inter-sites)
ha	Hectare
H_E	Gene diversity
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
K	Nombre d'allèles
KY	1000 ans
Km	Kilomètres
μ	Taux de mutation
m	Mètres
mm	Millimètres
N	North
N_E	Taille efficace
NJ	Neighbor-Joining

PCR	Réaction de polymérase en chaîne
±	Plus ou moins
<i>P</i>	Probabilité
%	Pourcentage
r_M	Mantel statistic
SD	Écart-type
T	Temps de divergence
<i>Taq</i>	Bactérie thermophile (<i>Thermus aquaticus</i>)
χ^2	test de Chi-carré

« C'est parce qu'on imagine simultanément tous les pas qu'on devra faire
que l'on se décourage, alors qu'il s'agit de les aligner un à un. »

Marcel Jouhandeau

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Bernard Angers qui m'a acceptée dans son laboratoire et m'a initiée au plaisir de la BM. Merci Bernard pour la confiance que tu as eu en moi pendant les quatre dernières années! Lors de ce long séjour à ton laboratoire j'ai beaucoup évolué comme scientifique mais aussi comme personne. Merci pour ta disponibilité, tes encouragements et ton humour.

Merci à Pierre Magnan qui en tant que co-directeur a apporté une contribution primordiale dans la réalisation de ce projet d'écologie moléculaire. Merci Pierre pour ton implication et tes encouragements.

Merci à tous les étudiants du laboratoire de Population, Génétique et Évolution Moléculaire. Vos encouragements et votre soutien m'ont permis de passer à travers les moments les plus difficiles en gardant le sourire. Merci de m'endurer!

Je tiens finalement à remercier mes parents, ma sœur, ma famille, Marco, ma belle-famille et mes amis pour leur soutien indéfectible et leurs encouragements tout au long de ma maîtrise.

1. INTRODUCTION

Ce projet porte sur les mécanismes impliqués dans la formation des populations en sympatrie et les mécanismes qui assurent la coexistence des membres sexués et asexués du complexe *Phoxinus eos-neogaeus*. Ces sujets seront traités par une étude du comportement de fidélité au site de naissance des membres du complexe *P. eos-neogaeus*. L'identification des individus fidèles à un site en période de reproduction, suivie par une identification génétique, permet de déterminer la niche de reproduction des différents membres du complexe. La niche de reproduction d'un individu est un milieu qui se définit par une série de variables environnementales qui maximisent le succès de reproduction des adultes et la production de juvéniles viables. L'analyse de la diversité génétique entre les sites échantillonnés permet ensuite d'identifier les unités fonctionnelles du système sous étude. Les thèmes permettant de cerner les différents aspects de ces études seront abordés dans l'introduction qui suit. Premièrement, les causes de la structure des populations en milieu naturel et les forces évolutives qui façonnent les populations seront discutées. Suivra une description des différents types de fidélité au site, une revue du comportement de fidélité au site à différentes échelles géographiques et des mécanismes impliqués dans la reconnaissance des sites. La valeur adaptative associée à ce comportement sera discutée ainsi que le phénomène de l'adaptation locale. Le modèle biologique à l'étude, le complexe *P. eos-neogaeus*, et la reproduction des membres du complexe seront décrits. Les hypothèses permettant d'expliquer la coexistence des membres sexués et asexués du complexe seront exposées. Finalement, l'objectif général et les hypothèses de ces études seront détaillés.

1.1 STRUCTURE DES POPULATIONS

La plupart des espèces en milieu naturel sont organisées en populations (Mayr, 1963). Une population est constituée d'individus qui ont une plus grande probabilité de se reproduire entre eux qu'avec les individus d'une autre population. Les individus d'une population sont donc plus ou moins isolés des individus des autres populations lors de la reproduction. L'apparition d'une barrière géographique, un décalage de la période de reproduction, un comportement de choix de partenaire ou encore un comportement de fidélité au site de naissance sont tous des mécanismes menant à l'établissement d'un isolement pré-copulatoire entre les populations (Hendry et al., 1995; Knight et al., 1998; Miller et al., 2001). Cet isolement reproducteur aura comme résultat l'accumulation de différences génétiques entre les populations et dans certains cas, la formation d'adaptations locales et la spéciation (Schluter, 1996).

Deux forces évolutives sont proposées pour expliquer les fondements de la divergence génétique entre les populations d'une même espèce. La dérive génétique (Wright, 1931) et les mutations sont deux processus stochastiques par lesquels la fréquence des allèles variera à chaque génération suivant la reproduction d'un nombre fini d'individus dans une population. Les effets de la dérive génétique sont plus marqués pour des populations ayant un effectif réduit ou pour des populations qui ont subi un goulot d'étranglement récent (Wright, 1931; Lande, 1976; Carson et Templeton, 1984; Lynch, 1990). La sélection naturelle est un processus par lequel les fréquences alléliques des gènes (génotype) varient dans une population, en fonction

de la valeur adaptative du phénotype des individus (Fisher, 1930). Les forces évolutives divergentes agissent ensemble sur les populations et sont souvent difficiles mais pas impossible à différencier (Koskinen et al., 2002).

Au sens génétique, la migration est une force évolutive convergente qui contrecarre les effets de la sélection et de la dérive en prévenant l'établissement d'un isolement reproducteur entre les populations (Adkison, 1995). La différenciation génétique des populations résultera en un faible niveau d'échange entre les populations suivant un isolement reproducteur. L'étude et la compréhension de la structure génétique des populations est donc primordiale afin d'être en mesure de reconnaître les processus de différenciation et les mécanismes de spéciation qui s'opèrent (Schluter, 1996; Orr et Smith, 1998).

1.2 FIDÉLITÉ AU SITE

L'établissement d'un isolement reproducteur entre des populations n'est pas obligatoirement associé à une faible capacité de dispersion des espèces. En effet, plusieurs espèces se caractérisent par une structure génétique des populations marquée et ce, malgré une capacité de migration importante. Une structure génétique est dite marquée suivant l'établissement d'une différenciation significative entre les populations. De telles structures génétiques sont observées entre autres chez plusieurs espèces d'oiseaux migrateurs comme la Paruline de Swainson (*Limnothlypis swainsonii*) (Zink, 1988; Escalante-Pliego, 1991; Winker et al., 2000) et de poissons comme l'Alose d'Amérique (*Alosa sapidissima*) et le saumon sockeye (*Oncorhynchus*

nerka) (Varnavskaya et al., 1994; Waters et al., 2000). La formation de populations chez ces espèces est plutôt liée au comportement de fidélité au site de reproduction (Stewart et al., 2003). Ce type de fidélité au site a été observé chez plusieurs espèces animales (Papi, 1992) et on peut la définir comme la tendance d'un individu à retourner sur un site qu'il aurait préalablement occupé plutôt qu'à tout autre site disponible et équivalent (Gerking, 1959). Ce comportement permet d'établir une structure génétique entre des populations fréquentant des habitats communs mais des sites de reproduction différents.

1.2.1 Formes de fidélité au site

Deux formes de fidélité au site de reproduction peuvent être observées (Blair et Quinn, 1989; Miller et al., 2001). La **fidélité au site de ponte** se définit comme étant le retour d'un individu au même site de ponte d'une saison de reproduction à l'autre. Cependant, les individus ne retournent pas nécessairement se reproduire à leur site de naissance et choisiront plutôt un site de ponte parmi les différents sites disponibles de leur milieu. Ce type de fidélité au site ne génère donc pas de structure génétique entre les sites. L'isolement reproducteur et conséquemment, la différenciation génétique entre les sites ne sera possible que si les juvéniles retournent se reproduire à leur site de naissance, ce qui est défini par la **fidélité au site de naissance**. Ce type de fidélité au site peut induire la ségrégation des individus d'un même groupe dans leur environnement et éventuellement engendrer la subdivision de celui-ci en plusieurs populations (Leider et al., 1984; Hendry et al., 1995), qui avec le temps deviendront

génétiqnement différenciées (Verspoor et al., 1991; Varnavskaya et al., 1994; Hendry et al., 2000).

1.2.2 Méthodes de détection

La fidélité au site est étudiée par des expériences de capture-marquage et recapture (CMR) (Hert, 1992; Hartney, 1996; Hodgson et al., 1998; Marnane, 2000; Moring, 2001; Potthoff et Allen, 2003; Kaunda-Arara et Rose, 2004). Suivant le marquage des individus, ceux-ci sont relâchés dans leur environnement; directement au site de capture ou à un site plus ou moins éloigné. L'application de cette méthode permet ainsi d'évaluer le pourcentage de retour des individus marqués à leur site de capture et d'identifier les individus démontrant une préférence pour un site particulier. Cette méthode comporte cependant certaines limites. Premièrement, ces expériences ne permettent pas de déterminer si les individus retournent sur ce site afin de s'y reproduire. Deuxièmement, plusieurs individus peuvent migrer entre les populations sans empêcher la différenciation génétique entre celles-ci (Allendorf et Phelps, 1981). En effet, dans certains cas le niveau d'échange entre les populations semble plus faible que le nombre réel de migrants. Les résultats de l'étude de Tallman et Healey (1993) démontrent que le nombre de migrants estimé par des expériences de CMR est beaucoup plus élevé (46%) que le niveau d'échange génétique estimé par la méthode des allèles rares (5%) (Slatkin, 1981; 1985). Les auteurs ont conclu que le taux de migration des individus déterminé par des expériences de CMR entre trois sites de reproduction ne reflétait pas le niveau d'échange génétique entre les populations

étudiées. Les individus qui migrent entre différents sites de naissance semblent donc avoir un succès de reproduction moindre que les individus qui se reproduisent à leur site de naissance. Le succès de reproduction des « vagabonds » peut être affecté par l'établissement d'une barrière pré-copulatoire induite par un choix de partenaire ou encore post-copulatoire suivant un taux de survie moindre des juvéniles (Tallman et Healey, 1993). Les échanges génétiques étant moindres, cela permettrait le maintien de la différenciation génétique entre les populations (Tallman et Healey, 1993 ; Stewart et al., 2003). Il est donc essentiel de coupler les expériences de CMR à des analyses génétiques qui permettent d'établir la présence d'une structure génétique induite par un comportement de fidélité au site de naissance (Miller et al., 2001; Altman et Taylor, 2003). Il sera possible de conclure à la présence d'une structure génétique suivant des différences significatives au niveau des fréquences alléliques entre les sites de reproduction échantillonnés.

1.3 FIDÉLITÉ AU SITE À DIFFÉRENTES ÉCHELLES GÉOGRAPHIQUES

Le comportement de fidélité au site de reproduction est retrouvé chez des espèces habitant tous les types de milieux aquatiques, aussi bien marins que dulcicoles (Gerking, 1959). Certaines espèces effectuent également des migrations entre ces deux types de milieux ou encore entre différents habitats à l'intérieur de ces milieux. L'absence de barrières physiques à la dispersion d'un milieu peut grandement augmenter la dispersion des individus d'une population. Le niveau de dispersion des espèces marines est généralement plus vaste de plusieurs ordres de grandeur que pour la plupart des espèces dulcicoles (Avisé, 1998). Puisque l'habitat d'une espèce marine

peut être plus vaste que l'habitat d'une espèce dulcicole, les migrations et la fidélité au site peuvent se concevoir à plusieurs échelles spatiales.

1.3.1 Milieu Marin

Malgré les courants océaniques, la topologie des planchers océaniques et la présence d'importants gradients de température qui pourrait éventuellement engendrer une séparation des populations, l'environnement marin ne présente pas de barrières physiques importantes à la migration et à la dispersion (Lundy et al., 1999). Conséquemment, l'importante capacité de dispersion des organismes marins est souvent associée à un faible degré de divergence génétique sur de vastes aires de répartition (Ward, 1994). Ce phénomène est particulièrement vrai pour les espèces possédant des taux de fécondité élevés, de grandes tailles de populations et une dispersion des œufs, larves et adultes sur de longues distances (Palumbi, 1994). De plus, il est souvent difficile de déterminer le nombre de migrants entre les populations, vu le manque d'information en ce qui concerne le lieu de naissance des adultes (Swearer et al., 1999; Jones et al., 1999). Ce problème est directement relié à la difficulté de mener des expériences de CMR sur des espèces pour lesquelles une grande quantité de juvéniles pélagiques est produite et qu'une importante proportion de ceux-ci ne survivra pas jusqu'à l'âge adulte. Thorrold et al. (2000) ont contourné ce problème en quantifiant, à l'aide des marques géochimiques sur les otolithes, le retour des individus à leur site de naissance chez l'Acoupa royal (*Cynoscion regalis*). Leur étude a confirmé une fidélité au site de naissance des individus relativement importante (60 à 81%), le peu d'échange entre les sites ayant été observé entre des

estuaires adjacents. Malgré tout, il semble qu'il soit plus difficile de détecter les différentes populations en milieu marin. Pour plusieurs organismes marins, très peu d'informations sont connues concernant le niveau d'organisation génétique des individus dans leur environnement (McQuinn, 1997).

Il existe quelques exemples pour lesquels l'importante capacité de dispersion des organismes marins ne se traduit pas par des taux d'échanges génétiques élevés entre les populations (Palumbi, 2004). Ceci a pour résultat l'établissement d'une structure génétique entre les populations de ces espèces (Waples, 1998). L'étude de Knutsen et al. (2003) sur la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) en est un exemple. Les auteurs ont détecté une différenciation génétique significative entre six sites de reproduction distants de 60 km le long de la côte de la mer de Skagerrak, située entre la Norvège et la Suède. Cette différenciation a été observée malgré une possibilité d'homogénéité génétique occasionnée par la dérive passive des larves avec le courant et la dispersion active des adultes. Par contre, selon des expériences de CMR effectuées lors d'études indépendantes, il semble que la dispersion des adultes soit limitée et ne s'établisse que sur de très courtes distances (Danielssen et Gjosaeter, 1994). De plus, l'échelle de l'étude (moins de 300 km) était bien en deçà des limites de la capacité de dispersion de l'espèce. Il semble donc que la structure observée ne soit pas causée par un isolement géographique entre les sites. Les auteurs ont conclu que les sites échantillonnés pendant la période de reproduction abritaient des populations différentes et que les sites de reproduction se devaient d'être préservés à une échelle locale.

1.3.2 Espèces anadromes

Un système très connu de fidélité au site de reproduction est retrouvé chez les Salmonidés (Hasler et Scholz, 1983; Dittman et Quinn, 1996), une famille de poissons principalement anadromes. Chez les truites et saumons des genres *Salmo* et *Oncorhynchus*, les juvéniles migrent vers l'océan afin de maximiser leur croissance et leur alimentation (Gross et al., 1988). Suite à quelques années passées en milieu marin, les juvéniles devenus matures retourneront à leur lieu de naissance afin de s'y reproduire. Malgré la très grande difficulté rencontrée par les individus à retourner se reproduire à leur lieu de naissance, cette fidélité est généralement précise et résulte en un isolement reproducteur entre les populations qui fréquentent des lieux de ponte différents et à l'établissement d'une structure génétique entre les populations (Leider et al., 1984; Blair et Quinn, 1989; Verspoor et al., 1991; Varnavskaya et al., 1994; Hendry et al., 1995; Quinn et Dittman, 1996). Par contre, le degré de fidélité au site de naissance, en terme de pourcentage de retour peut varier en fonction de l'espèce, de l'âge des individus, de l'échelle spatiale et temporelle (Quinn, 1993).

Plusieurs exemples d'études portant sur l'isolement reproducteur et la structure génétique des populations de saumons sont rapportés dans la littérature. L'étude de Varnavskaya et al. (1994) porte sur la différenciation génétique de populations de saumon sockeye (*Oncorhynchus nerka*) de neuf systèmes lacustres. Les auteurs ont décelé une hétérogénéité significative entre les différentes frayères échantillonnées à l'intérieur de chacun des lacs. Ces résultats montrent que le saumon retourne à son

cours d'eau natal et soulignent l'importance de protéger les frayères fréquentées par les différentes populations. Une autre étude effectuée par Hendry et al. (1995) porte sur l'isolement spatial et temporel de groupes de reproducteurs de saumons sockeye (*Oncorhynchus nerka*) le long d'une plage insulaire au lac Iliamna en Alaska. Leur étude a examiné la séparation des reproducteurs sur deux sites distants de seulement 15 mètres. À cette échelle géographique, il était peu probable d'observer un comportement de fidélité au site de naissance résultant en un isolement partiel mais significatif des reproducteurs fréquentant les différents sites de ponte.

La fidélité au site implique un processus de reconnaissance des sites de reproduction. La migration des salmonidés, des sites d'alimentation en milieu océanique vers les sites de reproduction en rivières, implique que les individus traversent divers habitats (océans, lacs, rivières). La navigation et l'orientation des individus à chacune des étapes de la migration semblent faire intervenir différents mécanismes de reconnaissance. Lors d'expériences réalisées sur des juvéniles de saumon sockeye (*Oncorhynchus nerka*) effectuant des migrations à travers de grands lacs, il a été possible d'émettre des hypothèses concernant les mécanismes sensoriels et les repères liés à l'orientation des saumons en mer (Dittman et Quinn, 1996). Les juvéniles de saumons semblent s'orienter en fonction de la position du soleil, du patron de la lumière polarisée et du champ magnétique terrestre (Groot, 1965; Leggett, 1977; Quinn, 1980; Quinn et Brannon, 1982; Hawryshyn et al., 1990). À l'approche de l'embouchure de leur rivière d'origine, tout près de la côte, les individus pourraient aussi être en mesure d'utiliser des repères visuels et olfactifs (Harden Jones, 1968;

Hasler et Scholz, 1983). Bien que très peu d'information soit disponible concernant les mécanismes d'orientation en milieu océanique, la phase finale de la migration résultant en une fidélité au site a été beaucoup plus étudiée. Il est généralement accepté que lorsque les saumons débutent la phase de migration en eau douce, une transition s'effectue des mécanismes d'orientation en milieu océanique à des mécanismes plus appropriés en rivière (Hasler, 1971; Quinn, 1990). Plusieurs évidences expérimentales semblent indiquer que les juvéniles ont la faculté, par un processus d'imprégnation olfactive, de mémoriser les odeurs associées à leur site de naissance (Hasler et Scholz, 1983, Hansen et al., 1993). La migration des juvéniles semble essentielle au succès du retour des individus car lors de ce parcours, les individus mémoriseraient les repères qui seront utilisés à leur retour une fois adulte (Hansen et al., 1993). L'olfaction serait donc le mécanisme principal permettant l'orientation des individus en rivière.

1.3.3 Milieu d'eau douce

Une étude effectuée par Clough et Ladle (1997) porte sur le comportement de fidélité au site d'un petit cyprinidé de rivières, *Leuciscus leuciscus*. Un suivi par radio-télémetrie des mouvements des individus entre les habitats de jour et de nuit distants d'un maximum de 680 mètres a permis aux auteurs de conclure que les individus avaient la faculté de retourner au site occupé les jours précédents. Cette étude est la seule à ce jour portant sur le comportement de fidélité au site de cyprinidés et impliquant des migrations entre des habitats de jour et de nuit. Par contre, cette étude

ne porte pas sur le comportement de fidélité au site de reproduction et ne rapporte aucun résultat génétique. Une autre étude portant sur l'Alose savoureuse (*Alosa sapidissima*) par Waters et al. (2000), démontre une structure génétique entre les différentes rivières échantillonnées et appartenant à quatre bassins de drainage différents. Il a été montré que la différenciation observée est causée par un important niveau de fidélité au site de reproduction (au moins 97%) (Melvin et al. 1986).

L'étude de Miller et al. (2001) sur le brochet (*Esox lucius*) a montré la présence d'une différenciation génétique entre deux sites de ponte distants de 14,8 km d'un même lac. Suivant les résultats des expériences de CMR et de la différenciation génétique observée entre les sites, les auteurs ont conclu que les individus du lac étudié affichent un patron de fidélité au site de naissance.

En milieu lacustre, l'étude de la fidélité au site de naissance est intimement liée à la capacité des individus à utiliser les ressources disponibles dans leur environnement. Une étude effectuée par Hodgson et al. (1998) sur trois espèces de poissons piscivores démontrent que ces espèces ont tendance à retourner à leur site de reproduction suite à un déplacement mais qu'elles ne le font pas dans la même proportion. Cela suggère que chacune de ces espèces utilise les ressources de l'environnement de façon différente. En effet, on peut présumer qu'une espèce pour laquelle une grande proportion des proies sera mobile aura une plus faible propension pour la fidélité au site de reproduction tandis qu'une espèce pour laquelle les proies

sont moins mobiles et distribuées de façon hétérogènes dans le milieu aura une plus grande propension pour la fidélité au site de reproduction (Hodgson et al., 1998).

1.4 VALEUR ADAPTATIVE DE LA FIDÉLITÉ AU SITE

La fidélité au site est un comportement fréquemment décrit chez les espèces de poissons dulcicoles et marins (Quinn et Brodeur, 1991; Quinn et Dittman, 1992). Sur les récifs coralliens, les espèces restreignent leur déplacement aux limites de leur territoire et démontrent un fort taux de fidélité au site (Sale, 1978; 1991). Pour les espèces anadromes et catadromes, le retour des individus sur leur site de naissance nécessite des migrations de plusieurs milliers de kilomètres (Hasler et Larsen, 1955; Hansen et al., 1993; Dittman et Quinn, 1996). Ces patrons de migration suggèrent une importante valeur adaptative associée à la reconnaissance et à l'attachement des individus pour ces sites. Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer le retour au site des individus suivant leur déplacement vers les aires d'alimentation. Premièrement, lorsque les densités de populations sont grandes la compétition pour les sites peut être importante (Marnane, 2000) et ainsi, il est presque impossible pour un individu de trouver un site libre suivant un déplacement (Hert, 1990). Deuxièmement, le risque de prédation peut être réduit dans un environnement familial puisque les individus trouvent plus facilement refuge (Switzer, 1993). Troisièmement, il est plus difficile pour les espèces territoriales de s'établir sur un nouveau territoire que de retourner dans un environnement familial (Hert, 1992). Les espèces de poissons retournent sur leur site de naissance pour se reproduire car ces sites semblent procurer un succès reproducteur plus élevé aux individus (Warner,

1995). Certains bénéfices évolutifs seraient aussi liés à la fidélité au site de reproduction, comme une probabilité plus élevée de trouver un partenaire et un taux de survie plus élevé des juvéniles (Leggett, 1977; Warner, 1995; Garant et al., 2000). De plus, ce comportement semble permettre de réguler le nombre d'adultes qui utilisent un site particulier afin d'éviter une sur ou sous utilisation des habitats (Leggett, 1977).

1.5 ADAPTATION LOCALE

La ségrégation des populations au sein d'une espèce peut avoir un effet important sur le développement d'adaptations spécifiques (Carvalho, 1993; Koskinen et al., 2002). L'adaptation locale peut être définie comme un processus par lequel il y a augmentation dans la fréquence d'un trait particulier, trait qui augmente le taux de survie et de reproduction des individus dans un environnement particulier (Taylor, 1991; Carvalho, 1993). Plusieurs évidences supportent la valeur adaptative associée à l'expression optimale d'un trait dans un milieu, qu'ils soient morphologiques, comportementaux ou encore associés aux cycles biologiques des populations. Par exemple, les saumons de l'Atlantique (*Salmo salar*) et les saumons coho (*Oncorhynchus kisutch*) sont reconnus pour démontrer des différences morphométriques importantes pour des traits considérés importants au niveau de leurs capacités natatoires: les saumons résidents de rivières de tête à courant fort sont plus effilés et possèdent des nageoires paires plus longues que les saumons résidents dans les estuaires des rivières avec peu de courant (Riddell et al., 1981; Taylor et McPhail, 1985). Chez la plupart des espèces de saumons, les populations diffèrent en terme de

la survie des stades embryonnaires et larvaires et de la rapidité du développement, de la fertilisation jusqu'à l'émergence. Ces différences semblent être une adaptation en réponse au régime local des températures: les embryons et les larves de populations nés dans des environnements plus froids ont un taux de survie plus élevé à des températures de l'eau plus basses que les populations nées dans des environnements plus chauds (Tallman, 1986; Beacham, 1988).

Par conséquent, un comportement de fidélité au site de naissance peut permettre l'évolution d'adaptations spécifiques à chacune des populations, en réponse aux caractéristiques physiques et biotiques du milieu (Ricker, 1972; Taylor, 1991) et suivant l'action de forces évolutives divergentes à l'intérieur de chacune des populations. Les populations de saumons, de truites et d'ombles représentent d'excellents modèles pour l'étude des adaptations locales suivant leur tendance à former des populations dans des environnements très diversifiés et à leur comportement de fidélité au site de naissance (Scheer, 1939; Horrall, 1981; McIsaac et Quinn, 1988). Quinn et al. (1999), dans leur étude sur la microstructure des marques naturelles sur les otolithes, ont aussi mis en évidence l'habileté des individus à distinguer entre différents sites d'incubation. Il est intéressant de noter que les résultats de cette étude sont en accord avec des travaux portant sur la structure génétique entre les sites de ponte des mêmes lacs et populations (Varnavskaya et al., 1994; Hendry et al., 1995). Finalement, les populations de saumons se reproduisant sur des sites de ponte différents à l'intérieur d'un lac démontrent des différences génétiques (Varnavskaya, 1994) mais aussi des différences au niveau morphologique,

de l'âge à la maturité, de la taille des œufs, de la fécondité et du moment de la reproduction (Gard et al., 1987; Rogers, 1987; Blair et al., 1993; Quinn et al., 1995). Ces variations indiquent que les individus sont fidèles à leur site de ponte et d'incubation, et que ces sites représentent des unités fonctionnelles ou populations plutôt que le système lacustre dans son ensemble (Quinn et al., 1999).

1.6 LE COMPLEXE *PHOXINUS EOS-NEOGAEUS*

Deux espèces du genre *Phoxinus* (Pisces, Cyprinidae), soit *P. eos* (ventre rouge du nord) et *P. neogaeus* (ventre citron) affichent une grande répartition géographique et se retrouvent soit en sympatrie ou en allopatrie dans la plupart des lacs du centre et du nord-est de l'Amérique du Nord (Scott et Crossman, 1973). Les deux espèces sont décrites comme évoluant dans des eaux fraîches ayant un pH allant de neutre à légèrement acide de petits cours d'eau, d'étangs, de ruisseaux et de lacs marécageux (Scott et Crossman, 1973). La période de reproduction de *P. eos* s'étend du début du printemps jusqu'au commencement de l'été et peut quelque fois varier selon la latitude et l'habitat occupé (Scott et Crossman, 1973). Certaines femelles *P. eos* peuvent même frayer deux fois au courant d'un même été (Scott et Crossman, 1973). La période de reproduction de *P. neogaeus* est plus brève et se situe à la fin du printemps, probablement en juin (Scott et Crossman, 1973). Les deux espèces se reproduisent dans la zone littorale des lacs, sans préférence pour un environnement particulier et n'établissent pas de nid pour la ponte (Cooper, 1935).

Le chevauchement de la période de reproduction et de l'aire de répartition des espèces ainsi que le comportement de reproduction sont des facteurs qui rendent propice l'hybridation entre ces deux espèces. L'hybridation entre les femelles *P. neogaeus* et les mâles *P. eos* donne naissance à des lignées d'hybrides exclusivement femelles (Dawley et al., 1987; Goddard et al., 1989). Ces hybrides se reproduisent par la suite de façon asexuée par gynogenèse. La gynogenèse implique la formation d'œufs diploïdes sans méiose par les hybrides femelles. Le développement des œufs doit être induit par un spermatozoïde d'une des deux espèces parentales. Le matériel génétique du mâle n'est toutefois pas intégré dans l'œuf (Dawley, 1989); les juvéniles ainsi produits sont identiques à leur mère (clones). Cependant, lors de la reproduction des hybrides *P. eos-neogaeus*, l'incorporation du génome mâle survient fréquemment. Cela produit des juvéniles triploïdes mâles et femelles qui présentent le génome clonal *P. eos-neogaeus* plus un assortiment de chromosomes venant du mâle qui a contribué à la reproduction (Dawley et al., 1987; Goddard et al., 1989 ; Goddard et Dawley, 1990; Doeringsfeld, 1996). Les hybrides triploïdes peuvent se présenter sous deux formes soit complètement triploïdes ou en une mosaïque de lignées cellulaires diploïdes et triploïdes (Dawley et al., 1987). Contrairement aux autres complexes gynogénétiques connus chez les vertébrés, une grande quantité de juvéniles triploïdes peuvent être produits (Goddard et al. 1989; Binet et Angers, 2005). Les individus triploïdes peuvent ensuite se reproduire de façon sexuée par la production de gamètes haploïdes suivant un événement méiotique (Goddard et al., 1998). *P. eos* et les deux types d'hybrides, gynogénétiques et triploïdes, sont les trois

types de *Phoxinus* principalement retrouvées dans les lacs des Laurentides (Binet et Angers, 2005).

1.7 COEXISTENCE DES ESPÈCES SEXUÉES ET ASEXUÉES

La prévalence de la sexualité chez les animaux est paradoxale en raison des coûts associés à la méiose, à la production de mâles et à l'acquisition d'un partenaire (Ghiselin, 1974; Williams, 1975; Maynard-Smith, 1978; Charlesworth, 1980; Lloyd, 1980; Bell, 1982). L'évolution et le maintien de la sexualité ont donc stimulé un grand intérêt dans l'étude des relations écologiques entre les formes sexuées et asexuées d'un même complexe d'espèces. Deux mécanismes peuvent être suggérés afin d'expliquer la coexistence des espèces parentales et des hybrides asexués: un de nature écologique et une régulation comportementale.

Le « Frozen niche variation model» (Vrijenhoek, 1979; 1984a; 1984b) propose une réduction de la compétition dans un environnement hétérogène par l'évolution de niches écologiques différentes entre les espèces parentales et les hybrides asexués. La sélection aurait favorisé le maintien des hybrides clonaux possédant une niche écologique différente des espèces parentales. La ségrégation spatiale et temporelle jouerait donc un rôle primordial au niveau de la réduction de la compétition entre les espèces parentales et les hybrides asexués (Vrijenhoek, 1978; Balsano, 1981; Schenck et Vrijenhoek; 1986). Schlosser et al. (1998) ont observé que les membres du complexe *P. eos-neogaeus* démontrent des préférences environnementales en relation avec leur constitution génétique. Il résulte donc des fréquences relatives des

espèces parentales et des hybrides asexués variables entre différents environnements. Par contre, la façon dont les espèces asexuées établissent un compromis entre leurs exigences environnementales et leur dépendance aux espèces parentales en période de reproduction n'a pas encore été étudiée.

Des mécanismes comportementaux comme le choix de partenaire et l'allocation du sperme par les mâles peuvent aussi grandement influencer la coexistence entre les espèces parentales et les hybrides asexués (Schlupp, 2005). La reproduction des mâles de l'espèce parentale avec les hybrides asexués est essentielle pour prévenir l'extinction de ceux-ci. Par contre, les mâles de l'espèce parentale ne gagnent aucun bénéfice dans cette reproduction car la progéniture est identique à la mère. Une hypothèse proposée par Schlupp et al. (1994) stipule que les mâles de l'espèce parentale pourraient bénéficier indirectement de cette reproduction. Chez plusieurs espèces, les femelles n'exercent pas toujours un choix de partenaire indépendant mais sont possiblement influencées par le choix de partenaire des autres femelles. Les mâles de l'espèce parentale auraient donc avantage à se reproduire, même avec une femelle asexuée, puisque cela leur permettrait d'acquérir de l'expérience et de démontrer leur potentiel reproducteur aux femelles conspécifiques. De plus, les mâles auraient la faculté de discriminer les femelles sexuées des femelles asexuées et ainsi, d'investir moins de sperme lors de la reproduction avec une femelle asexuée (Aspbury et Gabor, 2004). L'allocation du sperme (Aspbury et Gabor, 2004) et le choix de partenaires par les mâles (Schlupp et al., 1991; Ryan et al., 1996) semblent donc être des facteurs déterminant au niveau de la reproduction des gynogènes.

1.8 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE L'ÉTUDE

Ce projet a pour objectif d'étudier les mécanismes impliqués dans la formation des populations en sympatrie et les mécanismes qui assurent la coexistence des membres sexués et asexués du complexe *P. eos-neogaeus*. Plusieurs aspects de cette étude rendent ce projet particulièrement pertinent. Premièrement, l'échelle à laquelle cette étude a été réalisée (intra-lac) permet d'étudier la distribution des individus à un fin niveau géographique. Les seules études effectuées à cette échelle concernent les phénomènes de spéciation des Cichlidés africains, où la différenciation génétique provient d'un comportement de choix de partenaires (Knight et al., 1998). Deuxièmement, ce projet permettra l'étude du comportement de fidélité au site de reproduction des espèces sexuées ainsi que des hybrides asexués du complexe *P. eos-neogaeus*. Enfin, il sera possible d'étudier la distribution des espèces sexuées ainsi que des hybrides asexués du complexe *P. eos-neogaeus* en période de reproduction. Cet aspect n'a encore été traité dans aucune des études portant sur les complexes gynogénétiques. Afin de répondre à ces objectifs, les quatre hypothèses suivantes ont été émises.

La première hypothèse de cette étude est que les membres du complexe *P. eos-neogaeus* démontrent un comportement de fidélité au site de reproduction à l'échelle du lac. Afin de tester cette hypothèse, des expériences de CMR ont été effectuées pendant deux années consécutives sur quatre sites d'un lac de la région des Laurentides. Cette méthode permet d'estimer le pourcentage de retour des individus à

leur site de marquage. Une étude de Magnin et al. (1976) a démontré par des expériences de CMR qu'une population de *Phoxinus* d'un petit lac oligotrophe de la région des Laurentides (Lac Triton) ne semblait pas se distribuer aléatoirement dans le lac. En effet, malgré la petite taille du lac (18 460 m²), les individus semblaient se répartir principalement sur un site, à une extrémité du lac.

La deuxième hypothèse est que tous les membres du complexe *P. eos-neogaeus* affichent un comportement de fidélité au site de reproduction. Puisque les hybrides nécessitent une des deux espèces parentales pour la reproduction, il devrait être avantageux pour ceux-ci de démontrer un comportement similaire aux espèces sexuées. En se basant sur la composition spécifique du génome nucléaire, il sera possible de différencier les espèces sexuées des hybrides. Suivant l'identification génétique des individus recapturés, il sera ainsi possible d'évaluer la propension des espèces sexuées et des hybrides à retourner à leur site de marquage.

Puisque les hybrides asexués nécessitent la présence d'au moins une des espèces parentales pour la reproduction, il n'est pas possible pour eux d'exclure les espèces sexuées de leur milieu sans causer leur propre extinction. La troisième hypothèse est que la ségrégation spatiale et temporelle des espèces sexuées et des hybrides asexués en période de reproduction est un mécanisme assurant le maintien des hybrides asexués et ainsi, la coexistence des deux formes. Suivant l'identification génétique des individus recapturés, il sera possible d'évaluer la distribution spatiale et temporelle des groupes à l'intérieur du lac.

La quatrième hypothèse est que le comportement de fidélité au site de reproduction est plus précisément un comportement de fidélité au site de naissance. L'analyse de marqueurs génétiques extrêmement variables (locus microsatellites) permettra d'évaluer la présence de différenciation génétique résultant d'un isolement reproducteur entre les sites. Le cas échéant, il serait donc possible de conclure que les *P. eos* sont fidèles à un site de reproduction qui correspond à leur site de naissance. L'établissement d'une structure génétique intra-lac occasionne une augmentation de la taille efficace de chacune des populations (nombre individus d'une population qui contribuent au bagage génétique de la génération suivante). Ainsi, les *P. eos* retrouvés à chacun des sites devraient être considérés comme faisant partie de populations indépendantes.

Les deux prochains chapitres sont présentés sous forme d'articles scientifiques qui ont découlés des résultats obtenus dans le cadre de ce projet de maîtrise. Le premier article intitulé «Segregation of reproductive niches and coexistence of unisexual *Phoxinus eos-neogaeus* hybrids and parental species» porte sur les hypothèses un à trois soit: l'évaluation du comportement de fidélité au site, l'évaluation du comportement de fidélité au site chez les espèces sexuées et les hybrides asexués, et l'étude de la distribution spatiale et temporelle des espèces sexuées et des hybrides asexués du complexe *P. eos-neogaeus*. Cet article a été soumis pour publication à *Evolution*. Le deuxième article intitulé «Natal-site fidelity and reproductive isolation among recently founded sympatric populations of northern redbelly dace (*Phoxinus*

eos)» porte sur la quatrième hypothèse soit: l'établissement d'une structure génétique suivant un comportement de fidélité au site de naissance entre les populations sympatriques de *P. eos*. Cet article sera sous peu soumis pour publication à *Molecular Ecology*.

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1) Identification de l'étudiant:

Rachel Massicotte
M.Sc. (Sciences Biologiques) (2-235-1-0)

2) Liste des auteurs:

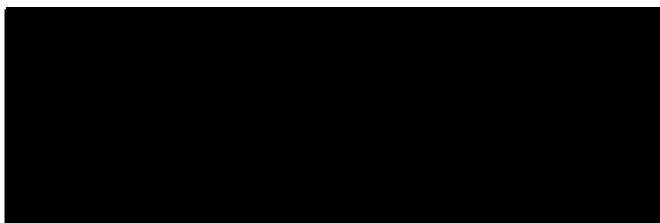
Rachel Massicotte
Pierre Magnan
Bernard Angers

Titre: Segregation of reproductive niches and coexistence of unisexual
Phoxinus eos-neogaeus hybrids and parental species

Article soumis pour publication le 28 février 2006 à
Evolution: International Journal of Organic Evolution

3) Déclaration des coauteurs autres que l'étudiant:

À titre de coauteur de l'article scientifique identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Rachel Massicotte inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre **Fidélité au site comme mécanisme d'isolement reproducteur entre les membres sexués et asexués et entre les populations sympatriques du complexe *Phoxinus eos-neogaeus*.**

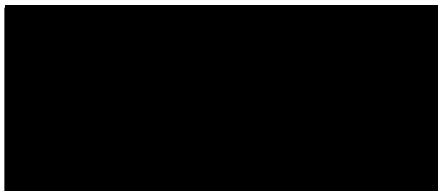


Pierre Magnan 01 mai 2006

Coauteur

Signature

Date



BERNARD ANGLERS 08 MAI 2006

**2. ARTICLE: SEGREGATION OF REPRODUCTIVE NICHES
AND COEXISTENCE OF UNISEXUAL *PHOXINUS EOS*-
NEOGAEUS HYBRIDS AND PARENTAL SPECIES**

SUMMARY

The coexistence of unisexual hybrids and their sexual hosts represents a puzzling topic in evolutionary biology. Despite the reproductive advantage of asexual females, they cannot out-compete their parental species without constraining their own ability to reproduce. The all-female taxa *Phoxinus eos-neogaeus* is the most widely distributed vertebrate unisexual complex in North America. However, the mechanisms allowing the stable coexistence of the sexual and asexual members remain unclear. The purpose of this study was to investigate the spatio-temporal distribution of parental species and both sexual and asexual hybrids during their reproductive period using a mark–recapture and displacement approach. Results showed that these fish exhibited a preference for their site (site fidelity) in the littoral zone. The genetic identification of recaptured individuals revealed a clear segregation of *P. eos* and hybrids, in particular asexual hybrids. The reproductive niche of asexual hybrids appeared to be more restricted than that of *P. eos*, and their reproductive periods were partially out of phase. The partial overlap between the niches of asexual hybrids and their sexual hosts may prevent the extinction of parental species, as suggested by the Frozen Niche Variation model. An alternative hypothesis is that the asexual gynogens are less dependent on the parental species than expected, perhaps relying upon sexual hybrids for sperm. Should this be the case, this unisexual hybrid taxon may have found a way to free itself from dependence on the parental species.

Key words: *Phoxinus eos-neogaeus* complex, unisexual vertebrates, site fidelity, spatial and temporal segregation, Frozen Niche Variation model.

2.1 Introduction

How closely related sexual and asexual species may coexist in sympatry remains one of the major unresolved problems in evolutionary biology (e.g., West et al. 1999; Kövér and Szathmáry 1999; Howard and Lively 2002). In vertebrates, asexuality is restricted to unisexual taxa resulting from the hybridization between congeneric species (Vrijenhoek 1989; Alves et al. 2001; Schlupp 2005). Unisexual hybrids are exclusively female and depend upon heterospecific males for reproduction. Despite the reproductive advantage of asexual females (all individuals produce progeny and no males are produced; Maynard-Smith 1978), they cannot out-compete their sexual host without constraining their own ability to reproduce. These coevolving organisms are therefore valuable models for studying ecological and evolutionary interactions between closely related taxa differing in reproductive mode (Dawley 1989; Vrijenhoek 1994; Doeringsfield et al. 2004).

The all-female *Phoxinus eos-neogaeus* taxa (Pisces, Cyprinidae) resulted from hybridization events between female finescale dace (*P. neogaeus*) and male northern redbelly dace (*P. eos*) (Dawley et al. 1987; Goddard et al. 1989). The diploid *P. eos-neogaeus* hybrids reproduce exclusively via gynogenesis (Goddard and Dawley 1990). Females produce unreduced diploid eggs and sperm from one of the parental species is required only to trigger embryogenesis. The resulting offspring are then genetically identical to the mother. In gynogenesis, the paternal genome may occasionally be incorporated into the zygote, resulting in triploid hybrids (e.g., *P. eos-neogaeus* x *eos*). A high proportion of such hybrids (40-60% of the hybrids) appear to

be typical in the *P. eos-neogaeus* complex (Goddard and Dawley 1990; Schlosser et al. 1998; Binet and Angers 2005). Triploid hybrids are also present in a few other gynogenetic complexes, such as the trihybrids observed in the *Cobitis* complex (Vasil'ev et al. 1989). However, a major distinction of the *Phoxinus* group is that triploid hybrids are expected to reproduce sexually. While the mechanism remain unknown, it was postulated that a meiosis occurred on the diploid genome of *P. eos* after elimination of the *P. neogaeus* chromosomes (Goddard et al. 1998). For example, cybrids defined as individuals with the nuclear genome of *P. eos* but the mitochondrial genome of *P. neogaeus*, has been observed in some lakes (Binet and Angers 2005). It was demonstrated that cybrids originated from fertilization between an haploid egg of triploid hybrids and a spermatozoid of *P. eos* (Goddard et al. 1998). The triploid hybrids persist in populations because they are constantly being produced *de novo* by the diploid gynogens, self-perpetuating triploids apparently do not exist (Goddard et al. 1989).

Numerous models have been proposed to explain the stable coexistence of parental species and unisexual hybrids (reviewed in Schlupp 2005). Among them, the frozen niche variation (FNV; Vrijenhoek 1994) model suggests that the partitioning of ecological niches reduces competition between sexual and asexual forms. The origin of hybrids makes them genetically different from the parental species and allows differences in niche use. Schlosser et al. (1998) demonstrated that members of the *P. eos-neogaeus* complex exhibit different environmental preferences in relation to their genomic constitution. As a result, the relative frequencies of the parental species and

hybrids vary considerably among environments (Schlosser et al. 1998; Doeringsfeld et al. 2004). However, sperm-dependence forces gynogens into close proximity with the parental species during the reproductive period. In this context, one can predict that the reproductive niche of gynogens will overlap (at least partially) with either one or both parental species to ensure reproduction. Other models are thus associated with behavioral mechanisms such as, male choice (Schlupp et al. 1991; Ryan et al. 1996), male sperm allocation (Aspbury and Gabor 2004), or a female-biased sex ratio (Hakoyama et al. 2001). These strategies may be critical in regulating gynogen reproduction. How the *P. eos-neogaeus* gynogens deal with parental species dependence during the reproductive period remains unclear.

The aim of this study is to investigate the distribution of *P. eos-neogaeus* hybrids and parental species during reproduction period at the scale of a lake. To assess the distribution of fish, this study rely on site fidelity, defined as the return of an individual to a place formerly occupied (*sensu* Gerking 1959). This behavior has been frequently observed in fish (Quinn and Brodeur 1991; Hert 1992; Hodgson et al. 1998; Miller et al. 2001) including Cyprinids (Clough and Ladle 1997). The specific objectives are thus twofold. First, to confirm that *Phoxinus* exhibit site fidelity in the littoral zone during their breeding season as suggested previously by Magnin et al. (1976). Site fidelity has been proposed to be under genetic control (Stabell 1984). Consequently, our first prediction is that both sexual and asexual *Phoxinus* will display this behavior. Second, in order to determine how gynogens and their sexual hosts partition reproductive niches, we examined the spatial and temporal distribution

of these fish. Because of the sperm dependence of unisexual hybrids, our second prediction is that the distribution of gynogens will be similar to that of their sexual host. To test our predictions, a mark–recapture experiment was conducted in a small Laurentian Shield lake over two consecutive years. Individuals recaptured at different sites and different times of the experiment were identified as parental species, gynogens, or triploid hybrids using genetic markers (Binet and Angers 2005). The results reveals that sexual and asexual *Phoxinus* exhibited a preference for their site (site fidelity) in the littoral zone, but a clear segregation between *P. eos* and hybrids, in particular asexual hybrids, has been detected.

2.2 Material and methods

2.2.1 Mark-recapture experiment

The study was conducted in Lake Desjardins, southern Quebec, Canada (45° 54' 58" N, 74° 04' 24" W). This lake is 4.87 ha in surface area and has a mean depth of 2 m and a maximum depth of 8 m. In order to examine site-fidelity behavior, a mark–recapture experiment was performed at four distinct sites along the littoral zone (Figure 1) during the summers of 2004 and 2005. Based on the distance along the littoral zone, sites A and B were separated by only 50 m while sites C and D were further away from these sites and separated from each other by 400 m. Fish were caught with unbaited commercial minnow traps set between 0.5 and 1.5 m of depth in the littoral zone. The fishing effort was kept as constant as possible (approximately 1.5 hours) in order to compare the fish abundance at each site during the experimental period.

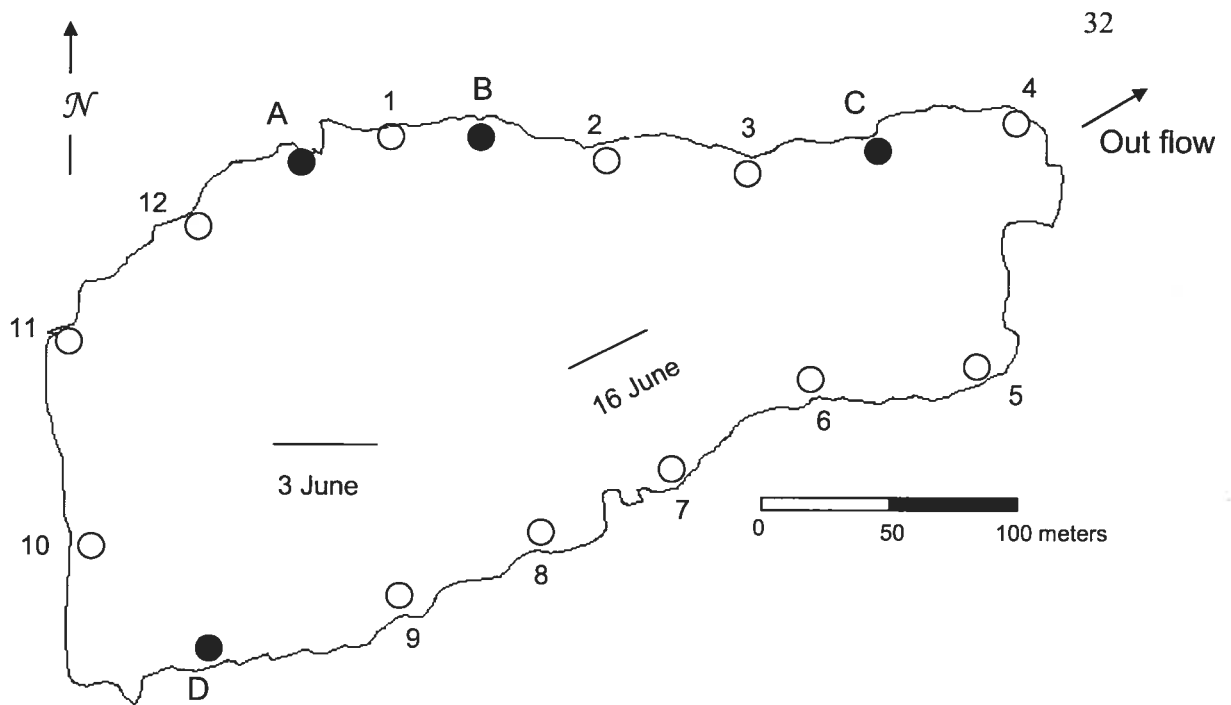


Figure 1. Map of Lake Desjardins showing sampling sites. Black circles correspond to marking site A, B, C, and D. Open circles represent the 12 additional fishing sites (referred to as intersites 1 through 12).

The experiment was performed at the end of the spring, a period expected to correspond to the breeding period of *Phoxinus* (Scott and Crossman 1973). Five marking sessions were performed at each of the four sites from 27 May to 10 June 2004 (Table I). In this experiment, 7,115 individuals were marked, and the total number of marked individuals was approximately the same among sites (Table I). Fish from each site and each day of sampling were marked in a distinctive manner with a fluorescent elastomer using an Elastomer Tag Air Driven Injection System (Northwest Marine Technology). The combination of color (green, pink, orange, yellow, or red) and mark position (near the dorsal fin at the top right, top left, bottom

right, or bottom left) indicated respectively the sampling day and the marking site. Fish were released after about one hour of recovery in a tank containing fresh lake water. To determine whether individuals returned to their capture site, they were released approximately 20-30 m away from it. This corresponds to halfway between sites A and B (Figure 1).

Table I. Number of individuals marked at the four study sites (A, B, C, and D; Figure 1) in Lake Desjardins.

Date	Marking site			
	A	B	C	D
27 May	350	169	115	162
28-29 May	300	300	577	271
31 May-1 June	497	429	492	212
2-3 June	315	272	157	655
9-10 June	295	547	500	500
Total	1757	1717	1841	1800

Elastomer tags have been successfully used with many organisms including fishes (Dewey and Zigler 1996; Frederic 1997). In order to assess its influence on the survival of *Phoxinus*, 50 tagged and 50 untagged individuals were observed for three weeks in aquaria. No mortality occurred in either group for this period.

A total of nine recapture sessions were performed: eight in 2004 (28/29 May; 31 May/1 June; 2/3, 9/10, 11, 15, 29 June; 15 July) and one in 2005 (15 June). For a given site, at least two days separated recapture sessions from the marking experiment to allow individuals an adequate recovery period and to redistribute in the lake. When an individual was recaptured, a small portion of the caudal fin was collected for genetic identification and to ensure that this individual would be recognized if recaptured a second time. The individuals that were recaptured a second time were re-marked following the pattern of recapture of the site and day of sampling. In this way, it was possible to reconstruct the complete capture history for each recaptured individual.

An extensive littoral sampling was also performed to assess fish movements along the littoral zone. Twelve additional sites located between the marking sites (hereafter referred to as “intersites”; Figure 1) were sampled following the same procedure. Each fish caught was examined for the presence of marks then released at its site of capture. Two complete surveys of the littoral zone were done on 2-3 June and 17-18 June 2004.

Since the number of marked individuals and the number of captures at each site and sampling day varied, the recaptures were standardized according to the number of fish recaptured per 1000 individuals marked, and per 1000 captures by sample [nb. fish recaptured * (1000/nb. fish marked) * (1000/nb. fish captured)].

2.2.2 Genetic identification

To determine the taxonomic composition of the recaptured fish, a subsample of 266 individuals were identified using genetic markers according to Binet and Angers (2005). Briefly, hybrids were characterized by the presence of one set of chromosomes from each *P. eos* and *P. neogaeus* species. To determine the nuclear genomic composition of an individual, an intron of the *Growth Hormone* gene and one of the *Mesoderm Specific Transcript* gene were PCR amplified. Primers of each locus were designed to provide PCR products of different sizes for *P. eos* and *P. neogaeus*, allowing chromosome identification. Individuals that displayed alleles of both sizes were classified as hybrids. Diploid gynogens and triploid hybrids were discriminated according to the ploidy of the nuclear genome by using four hypervariable microsatellites as detailed in Binet and Angers (2005). Gynogens *P. eos*-*neogaeus* carry a single set of chromosomes from each parental species and are thus expected to be hemizygous at every species-specific loci. Triploid hybrids *P. eos*-*neogaeus* \times *eos* received an additional set of chromosomes from one of the parental species (in general *P. eos*) are expected to be heterozygous at loci specific for this species. DNA extractions were performed from a piece of the caudal fin from recaptured individuals. No fish was sacrificed during this study.

2.3 Results

2.3.1 Reproductive Period

The external characteristics of the individuals captured indicated that most were sexually mature at the moment of the experiment. Fish had to be handled with care

since the eggs of many females were easily extruded, indicating that they were ready to spawn. Even though most males had thick pectoral fins (which usually indicates mating activity; Scott & Crossman, 1973), this trait remains for some time after mating. In addition, young-of-the-year were observed at the end of the experiment in the littoral zone of the four marking sites. Altogether, these observations indicate that the experiment was performed near to or at the spawning sites and during the breeding period.

2.3.2 Site Fidelity

Of the 7,115 fish marked, 784 were recaptured at the four marking sites in 2004, leading to an overall recapture success of 11% (Table II). Such a recapture success is consistent with previous mark-recapture experiments performed on this species (Magnin et al. 1976). Of the 784 recaptures, 685 (87.4%) were caught at their original marking site in 2004 (Table II), which after standardization is 91%. Furthermore, 97 of these individuals were recaptured at their marking site a second and 19 a third time, giving 10.7% and 2% after standardization. According to the low probability of recapturing a marked individual ($784 \text{ recaptures} / 16016 \text{ total number of captures} = 4.9\%$), individuals recaptured several times at the same site indicate a strong propensity to return to or to stay at a given site. Similarly, one year after the marking experiment (June 2005), 74% of the recaptured individuals were caught at their initial marking site (Table II).

Table II. Number of recaptures at the four marking site (A, B, C, and D; Figure 1). The diagonal represents the number of individuals that were recaptured at their marking site. Numbers in parentheses refer to the total number of captures at the marking site.

Recapture at site	Marking site				Total
	A	B	C	D	
2004					
A	179	2	4	6	191 (2822)
B	9	194	9	6	218 (3581)
C	7	18	166	13	204 (5099)
D	9	9	7	146	171 (4508)
Total	204	223	186	171	784 (16016)
2005					
A	15	0	0	2	17 (736)
B	4	19	2	0	25 (848)
C	1	1	11	3	16 (737)
D	2	2	3	11	18 (752)
Total	22	22	16	16	76 (3073)

Chi-square tests performed between the expected and observed number of recaptures under the null hypothesis of random distribution of marked individuals were highly significant for each site and for every day of sampling in 2004 and 2005 ($P < 0.001$)

except for two sites on the first date of recapture (χ^2 , $df = 3$, site C: $P = 0.216$; site D: $P = 0.04$). For a given site, deviations from random distribution were always due to a higher number of recaptures marked at that site. These results indicate that most of the fish recaptured were not randomly distributed among marking sites but rather display a strong site fidelity.

For the first and second sampling periods, there were on average four and six times more marked fish recaptured at the marking sites (6% and 9.1%) than at the intersites (1.38% and 1.65%), respectively (Mann-Whitney U statistic, $n = 12$ vs 4; 2-3 June $P = 0.005$; 17-18 June: $P = 0.004$; Table III). Fish of all sites were represented in similar proportions at intersites. This means that the probability of recapturing a marked individual at its marking site is far higher than at intersites. These results indicated that displacements of individuals around a given site are limited to a few meters and support the above observation that fish have a higher probability of being recaptured at their original marking site.

Table III. Average percent recaptures \pm SD at the marking site and at the intersite for the 2-3 and 17-18 June 2004 samples. Total captures are given as well as the number of recaptures (in parentheses).

Date		Marking site	Intersite
2-3	Recaptures	6 ± 3.47	1.38 ± 0.93
June		(73)	(56)
	Total captures	1434	3419
17-18	Recaptures	9.1 ± 4.52	1.65 ± 0.94
June		(134)	(104)
	Total captures	1510	5517

2.3.3 Genetic identification of recaptures

The genetic identification of the recaptures revealed a dominance of the parental species *P. eos* (Table IV). Gynogens and triploid hybrids made up respectively 13% and 21% of the captured individuals (Table IV). The other parental species (*P. neogaeus*) was not observed.

Figure 2A shows two peaks of captures: one between 27 May and 3 June (hereafter referred to as “T1”) and another from 10 June and 15 July (“T2”). The first peak was caused by the high capture success at sites A, B and C. The second peak occurred when sites C and D had the maximum number of captures. The identification of recaptured individuals revealed that the distribution of the *Phoxinus* community

among sites was very similar at T1 (χ^2 , $df = 2$, $P = 0.197$) and was characterized by a very low relative abundance of hybrids, in particular gynogens for which only two individuals have been recaptured (Table IV). However, species composition strongly differed at T2 (χ^2 , $df = 2$, $P = 0.001$), when sites C and D were different from A and B (χ^2 , $df = 2$: A-C $P = 0.00024$; A-D $P = 0.005$; B-C $P = 0.00004$; B-D $P = 0.00002$). Species composition between T1 and T2 was only different for sites C and D (χ^2 , $df = 2$: site C $P = 0.025$; site D, $P = 0.001$; Table IV). This indicates that both types of hybrids, especially gynogens, showed a preference for sites C and D, and only at T2. Using the proportion of recaptures to infer the abundance of captures at each site (Figure 2B), one can see the dominance of *P. eos* at T1 while hybrids outnumber *P. eos* at T2 even though hybrids were only present at sites C and D. Of the hybrids, gynogens were nearly absent at T1 but as numerous as triploids at T2.

Overall, similar proportions of *P. eos* and hybrids were faithful and strayers at a given site (χ^2 , $df = 1$, site A $P = 0.23$; site B $P = 0.76$; site C $P = 0.75$; site D $P = 0.37$; Table IV). However, significant difference was observed between the composition of faithful individuals and strayers at T1 (χ^2 , $df = 1$, 0.0023) and T2 (χ^2 , $df = 1$, 0.0102) due to an excess of hybrids and *P. eos* as strayers at T1 and T2 respectively (Table IV). Heterogeneity was also detected among sites in term of immigration and emigration of *P. eos* at T2, as sites C and D acted as a source and sites A and B as a sink (Table IV).

Table IV. Results of the genetic identification of individuals recaptured at the four marking sites (A, B, C, and D; Figure 1) for the different periods of the experiment (T1: 27 May to 3 June; T2: 9 to 15 June 2004). For a given site, immigration represents individuals recaptured at this site but marked elsewhere and emigration represents individuals marked at this site but recaptured elsewhere. The number of gynogens that displayed site fidelity is indicated in parentheses.

Site	Time	Site fidelity		Immigration		Emigration	
		<i>P. eos</i>	Hybrids	<i>P. eos</i>	Hybrids	<i>P. eos</i>	Hybrids
A	T1	17	5 (0)	3	2	1	2
	T2	27	3 (1)	12	4	4	3
B	T1	13	2 (1)	1	2	4	3
	T2	24	6 (2)	20	2	13	1
C	T1	11	4 (1)	1	3	1	2
	T2	13	19 (10)	8	2	20	7
D	T1	12	3 (0)	1	2	0	2
	T2	5	22 (10)	10	7	13	4
	T1	53	14 (2)	6	9	6	9
Total	T2	69	50 (23)	50	15	50	15
	Both	122	64 (25)	56	24	56	24

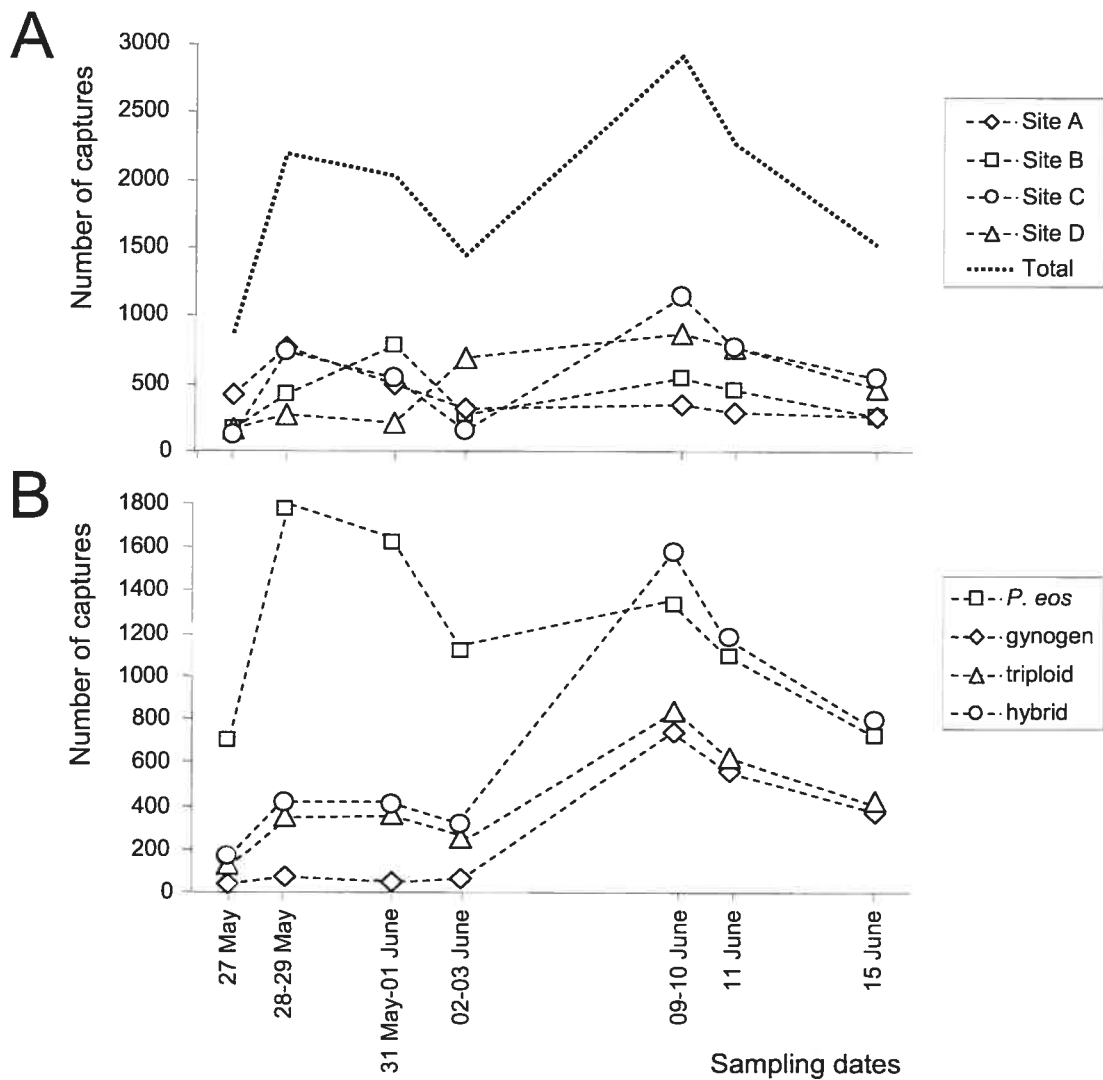


Figure 2. Number of captures per site (A) and inferred number of captures per genotype (B) at different sampling sessions (T1: 27 May to 3 June; T2: 9 to 15 June).

2.4 Discussion

2.4.1 Site Fidelity

Our results revealed a site-fidelity behavior for members of the *P. eos-neogaeus* complex. Most of the recaptures originated from the marking site and several

individuals were recaptured two or three times at the same location. Even though a substantial number of individuals moved along the littoral zone after being marked (strayers), there was a higher probability of recapturing an individual at its marking site than at any other site. This suggests that a large proportion of the individuals return to or stay at their site through time. The return of individuals to the marking site, even though they had been displaced by 20-30 m, suggests that specific mechanisms allow site recognition in the littoral zone. Considering the high swimming capacities of *Phoxinus* (Gaudreau and Boisclair 1998), the absence of geographic barriers, and the small geographical scale of the study, the site fidelity of *P. eos-neogaeus* members is striking.

The identification of the recaptured individuals revealed that most were *P. eos*. The other parental species *P. neogaeus* was not detected, a situation that has frequently been observed over the distribution of the complex (New Hampshire: Goddard et al. 1989; Montana: Holton and Johnson 1996; Quebec: Binet and Angers 2005). The presence of hybrids in such situation can be explained by ancestral hybridization events followed by postglacial colonization, as observed in the unisexual fish complex of European loaches, *Cobitis spp.* (Janko et al. 2003).

The similar proportions of *P. eos* and hybrids that displayed site fidelity and that were strayers suggest that parental species and hybrids exhibit site fidelity to the same extent. This is consistent with our first prediction, although the advantages of this behavior in *Phoxinus* have yet to be elucidated. Numerous benefits can be

associated with the return of individuals to the same environment. Since *Phoxinus* take refuge in the littoral zone to escape to visual predators during the day (Naud and Magnan 1988), this may suggest that the predation risk could be reduced in familiar environments by providing shelter to individuals (Switzer 1993). As our experiment was performed while individuals were sexually mature, this behavior may also suggest that individuals exhibit a spawning site preference. As fish were caught at their original marking site one year after the marking experiment, this suggests that individuals return to their breeding site. The analysis of the genetic diversity of *P. eos* recaptured in the present study revealed non-random mating and genetic differentiation among the sampled sites (Massicotte 2006) and confirmed that individuals return to their natal site for breeding. Major evolutionary benefits are associated with this behavior, such as a greater chance to find mates and higher juvenile survival rates (e.g., Leggett 1977; Warner 1995; Garant et al. 2000). This is also consistent with previous studies on the reproductive site fidelity of iteroparous species (Aalto and Newsome 1990; Crossman 1990; Gross et al. 1994; Miller et al. 2001).

2.4.2 Spatio-Temporal Distribution of Sexual and Asexual Taxa

The clear segregation of the *P. eos-neogaeus* community among the marking sites (sites A and B versus C and D) and between the beginning and the end of the experiment is noteworthy. In the absence of the other parental species (*P. neogaeus*), *P. eos* is expected to be the sexual host of the gynogens. The difference that we observed in their distributions leads to the rejection of our second prediction. The

spatial segregation is consistent with previous studies that reported different proportions of *P. eos-neogaeus* complex members among environments (e.g., Schlosser et al. 1998; Doeringsfeld et al. 2004; Binet and Angers 2005). That the distributions were not similar suggests that the *P. eos-neogaeus* community is strongly influenced by fine-scale environmental characteristics, leading to a patchy distribution of gynogens and parental species along the littoral zone. However, such distribution is not expected during the reproductive period. In addition to the heterogeneous spatial distribution, the variation in *P. eos* and hybrid distributions observed through time indicates that their breeding periods are partially out of phase, with hybrids reproducing later. By examining the gonadosomatic index of females, Das and Nelson (1990) found a partial segregation in the spawning time of members of the *P. eos-neogaeus* complex, with spawning occurring earlier in *P. neogaeus* and hybrids than in *P. eos*.

The non-overlapping breeding periods of *P. eos* and hybrids may also explained the difference observed in the composition of strayers at the beginning and the end of the experiment. The higher displacements of hybrids and *P. eos* recorded at the beginning and end of the experiment respectively, may represents pre- or post-reproduction dispersal.

2.4.3 Coexistence of Parental species and Asexual hybrids

The partial overlap observed here may be large enough to ensure the reproduction and continuation of gynogens. Should this be the case, spatial and temporal segregation

can be viewed as a mechanism allowing the coexistence of parental species and asexual hybrids. Selection may have favored the hybrid lineages having minimal spatial and temporal reproductive niche overlap with the parental species. This prevents the extinction of the parental species as long as they use reproductive sites unfrequented by gynogens or if they use reproductive sites at different time. This hypothesis is consistent with the Frozen Niche Variation model proposed by Vrijenhoek (1979), who argues that the faithful reproduction of clones is a good strategy in a spatially heterogeneous environment, as long as the clones do not eclipse the niche of the sexual ancestors. Spatial segregation has been proposed to play a significant role in reducing competition between sexual and asexual members of several of these mixed reproductive assemblages such as in the genus *Poeciliopsis* (Vrijenhoek 1978) and *Poecilia* (Balsano et al. 1981). For instance, *Poeciliopsis monacha* females were always most frequent in still pools while asexual clones were most frequent in current habitats (Schenck and Vrijenhoek 1986). Furthermore, broad seasonal shifts affect population dynamics of *P. monacha* and *P. lucida* complexes (Schenck and Vrijenhoek 1986) and also affect frequencies of asexual and gynogenetic forms within the *P. monacha* complex (Thibault 1974). Differences in frequencies were observed among collections taken in rainy and dry seasons, six months apart. If sexual and clonal forms are differentially favored during annual or longer-term cycles then seasonal fluctuations may contribute to coexistence of these fish forms (Armstrong and McGhee 1980).

An alternative (but not mutually exclusive) hypothesis for the coexistence between parental species and asexual hybrids is that gynogens are less dependent on parental species than expected. The similar spatial and temporal distributions observed for gynogens and triploid hybrids suggest that both choice of spawning site and reproductive period are related to some extent to their genetic background, as has been observed in other species (Leider et al. 1984; Hendry et al. 1995; Jennings et al. 1996). The synchronous and similar distributions of gynogens and triploid hybrids suggest that the sperm requirement of the gynogens can be (at least partially) fulfilled by this alternative sperm donor. If this is the case, our second prediction would be verified.

Different hypotheses has been proposed to explain the advantages of such a high proportion of triploid hybrids in the *Phoxinus eos-neogaeus* complex (Goddard et al. 1989, Doeringsfeld et al. 2004). These hypotheses rely on the expression of the additional genome of the triploid to allow them to exploit a larger ecological niche than gynogens, but consign to gynogens a very minor role in the maintenance of the hybrids. Our hypothesis offers an alternative explanation to the high proportion of triploid hybrids resulting from gynogen eggs while the sexual reproduction of these hybrids does not provide any direct benefit for the clonal lineage of gynogens (Goddard et al. 1998). The hypothesis of triploid hybrids as sperm providers finds support in the literature. It has been proposed that sex determination is restored in the homologous diploid chromosome set of triploid hybrids: both males and females are observed, though females predominate (Goddard et al. 1989). Goddard et al. (1998)

also showed that these females can reproduce sexually, but it is not known whether males produce effective gametes. However, Lamatsch et al. (2000) reported that triploid males of the unisexual hybrid Amazon molly (*Peocilia formosa*) can produce sperm that can initiate the gynogens' egg development. Interestingly, *Phoxinus* hybrids has been considered by Goddard et al. (1989) as a particular kind of hybridogenesis for which a clonal hybrid genome maternally inherited and a paternal genome is replaced each generation. In the hybridogenetic complex of *Squalius alburnoides*, sexual males can be produced and they can provide sperm for the hybrid females (Alves et al. 2001), a situation that parallels the one observed in *Phoxinus*. However, if this hypothesis is confirmed, it is probably limited to the *Phoxinus eos-neogaeus* complex. The low proportion of sexual triploid hybrids in other gynogenetic complex in Vertebrates is generally very low, less than 10% (Schultz and Kallman 1968, Cherfas 1981, Echelle et al. 1989) making the number of effective male very low.

The results of this study lead us to propose two hypotheses allowing the coexistence of parental species and gynogens of the *P. eos-neogaeus* complex that remain to be verified. Spatial and temporal segregation of gynogens and their sexual host may prevent the extinction of parental species. Similarly, the heterogeneity and the nature of the available reproductive niche may be a determinant factor in regulating the proportion of hybrids and parental species within a given lake. The second hypothesis, that triploid hybrids represent the alternative sexual host, can be verified with a laboratory experiment. Should this be the case, unisexual *P. eos-neogaeus* may

have found a way to free themselves from dependence on the parental species. Imperfect gynogenesis leading to the production of males may then represent a trigger for “speciation” in these hybrids. Such an innovation could represent major evolutionary implication for the unisexual hybrids of this complex.

2.5 Acknowledgements

We are particularly grateful to Joëlle Boizard, Isabelle Bouthillier, Kantuta Moran, Marie-Claire Binet, and Marie-Claude Gagnon for their invaluable field and laboratory assistance. This research was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA and PM, and from the Groupe de Recherche Interuniversitaire en Limnologie et en Environnement Aquatique (GRIL).

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1) Identification de l'étudiant:

Rachel Massicotte
M.Sc. (Sciences Biologiques) (2-235-1-0)

2) Liste des auteurs:

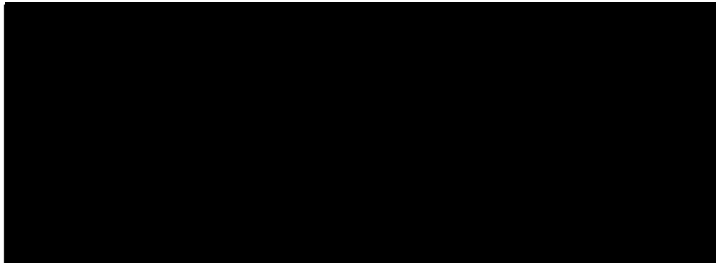
Rachel Massicotte
Pierre Magnan
Bernard Angers

Titre: Natal-site fidelity and reproductive isolation among recent sympatric populations of northern redbelly dace (*Phoxinus eos*)

Article sera sous peu soumis pour publication à Molecular Ecology.

3) Déclaration des coauteurs autres que l'étudiant:

À titre de coauteur de l'article scientifique identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Rachel Massicotte inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre **Fidélité au site comme mécanisme d'isolement reproducteur entre les membres sexués et asexués et entre les populations sympatriques du complexe *Phoxinus eos-neogaeus*.**

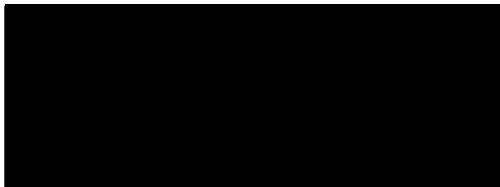


Pierre Magnan 01 mai 2006

Coauteur

Signature

Date



BERNARD ANGERS 01 MAI 2006

Coauteur

Signature

Date

**3. ARTICLE: NATAL-SITE FIDELITY AND REPRODUCTIVE
ISOLATION AMONG RECENTLY FOUNDED SYMPATRIC
POPULATIONS OF NORTHERN REDBELLY DACE
(*PHOXINUS EOS*)**

SUMMARY

Northern redbelly dace *Phoxinus eos* (Pisces: Cyprinidae) exhibit spawning-site fidelity in the littoral zone of small Laurentian Shield lakes. To determine whether this behaviour represents an efficient reproductive isolation mechanism, we investigated genetic differentiation among spawning sites in two small lakes in southern Quebec belonging to distinct watersheds. A mark-recapture experiment was performed during the reproductive period at seven sites from 20 to 450 m apart. We determined the polymorphism at six highly variable microsatellite loci on 202 recaptured individuals. Hardy-Weinberg and allelic differentiation tests indicate that most of the spawning sites sampled represent reproductively distinct populations. Low exchange of migrants in a continuous spawning sites along the littoral zone lead to a pattern of isolation by distance within each lake. These results are striking when considering the extremely fine geographical scale and confirm natal-site fidelity in *P. eos*. Pre-mating isolation of individuals in distinct reproductive niches may contribute to generating local adaptations and eventually result in speciation.

Key words: natal-site fidelity, spawning-site fidelity, reproductive isolation, genetic differentiation, microsatellite analysis, *Phoxinus eos*.

3.1 Introduction

Numerous sympatric forms fulfil the criteria for recognition as biological species in that they are genetically and ecologically isolated in sympatry (*sensu* Mayr 1963). Reproductive isolation and strong competition between sympatric populations may lead to local adaptations and speciation (Taylor & Bentzen 1993; Bernatchez *et al.* 1996; Taylor *et al.* 1997; Dynes *et al.* 1999; Rico & Turner 2002). Ecotypic variation in salmonid fishes and other north temperate freshwater species is often associated with the availability of alternative trophic niches, and this appears to be a major ecological factor promoting differentiation in sympatry (reviewed by Schluter 1996). However, Taylor *et al.* (1997) showed that other ecological forces may also play a role in promoting the isolation of populations: the presence of distinct reproductive niches may facilitate the evolution of reproductive ecotypes that appear to share a common trophic resource. For instance, *Salvelinus* and *Coregonus* appear to be prone to split into ecologically specialized groups in sympatry (Behnke 1972). Hindar *et al.* (1986) suggested that this is related to their lake-spawning habitats, which allow spawning to take place at either discrete or continuous locations and under a multitude of environmental conditions (Svårdson 1979; Balon 1980).

Reproductive isolation of populations through pre- and post-mating processes is one of the conditions for evolution (Dobzhansky 1937). Pre-mating isolation includes geographic isolation, differences in mating periods, and behavioural mechanisms such as mate choice (Hendry *et al.* 1995; Knight *et al.* 1998). Among the pre-mating processes associated with isolation in sympatry is natal-site fidelity, characterized by

the return of an individual to the spawning ground of its birth (Blair & Quinn 1989; Miller *et al.* 2001). Natal-site fidelity can lead to reproductive isolation among sympatric populations, even in the absence of geographic barriers (Leider *et al.* 1984; Vespoor *et al.* 1991; Varnavskaya *et al.* 1994; Hendry *et al.* 1995; 2000). Major evolutionary benefits are associated with natal-site fidelity, such as a greater probability of finding mates and higher juvenile survival rates (Leggett 1977; Warner 1995; Garant *et al.* 2000). In some species, natal homing may involve displacements of thousands of kilometres (Hansen *et al.* 1993; Dittman & Quinn 1996), suggesting the important adaptive values associated with the recognition of and attachment to these sites.

The *Phoxinus eos-neogaeus* hybrid complex (Cyprinidae, Pisces) is composed of two sexual species, the northern redbelly dace (*P. eos*) and the finescale dace (*P. neogaeus*), and several hybrid forms (Dawley *et al.* 1987; Goddard *et al.* 1989; Binet & Angers 2005). Members of this complex display a strong propensity to site fidelity during the reproductive period: individuals have been captured on the same spawning site through the mating season as well as for two consecutive years (Massicotte *et al.* in review). Interestingly, a strong spatial segregation between *P. eos* and hybrids has been observed, and the range of reproductive niches appears to be larger for *P. eos* than for the hybrids, the latter being restricted to a few of the sites (Massicotte *et al.* in review). This limited distribution of the hybrids suggests that environmental differences occurred among these spawning sites. Northern redbelly dace populations are thus expected to be partitioned among heterogeneous reproductive niches.

Reproductive isolation between such distinct niches may contribute to generating and preserving local adaptations.

The aim of this study was to determine whether site fidelity represents an efficient pre-mating isolation mechanism among sympatric populations of northern redbelly dace. Reproductive isolation induced by natal-site fidelity is expected to generate typical signatures of genetic diversity. First, we expect departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) when different spawning sites of a given lake are considered together, indicating non-random mating between individuals from different sites (Raymond & Rousset 1995). Second, we also expect variations in allelic frequencies among sites as a result of independent genetic drift. We addressed these questions by determining polymorphism at six microsatellite loci for individuals recaptured during a mark-recapture experiment performed at seven different sites located in two lakes. We selected lakes located in distinct watersheds to compare sites within each lake as well as between lakes, where migration is unlikely to occur. The results revealed that each lakes supports numerous populations living in sympatry, reproductively isolated by natal-site fidelity.

3.2 Material and methods

3.2.1 Sampling

The study was conducted in lakes Beaver and Desjardins, southern Quebec, Canada (45° 54' 58" N, 74° 04' 24" W) (Figure 1). In spite of their geographical proximity (straight line distance: 850 meters), both lakes are located in distinct watersheds of

the St. Lawrence River. The waterway distance between the two lakes is approximately 220 km, making migratory exchange highly improbable. A mark-recapture experiment was performed in Lake Beaver in 2003 and in Lake Desjardins in 2004. Three and four marking sites were sampled in Beaver and in Desjardins lakes respectively. The distances between intra-lake sites along the littoral zone varied from 20 to 450 m. Individuals recaptured at their marking site are thought to be faithful to this site and represent the site's breeding individuals. According to external characteristics (Scott & Crossman 1973), most individuals observed during the experiment were sexually mature: females were gravid and ready to spawn while the pectoral fins of most males were thick (a sexual dimorphism of this species; Scott & Crossman 1973).

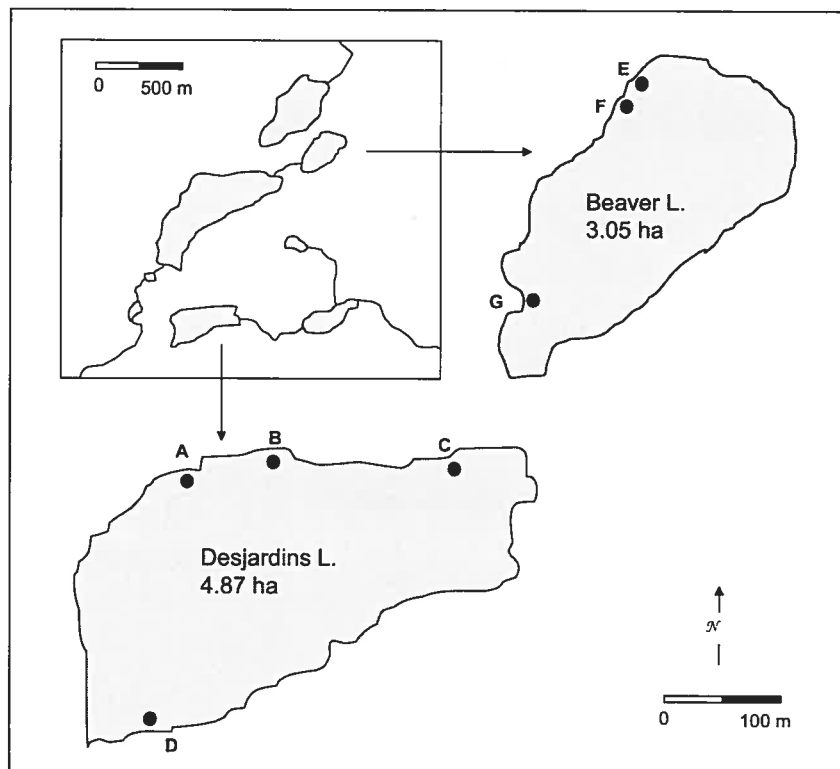


Figure 1. Map of Lake Desjardins and Lake Beaver with sampling sites indicated (Desjardins: A, B, C, D; Beaver E, F, G).

3.2.2 Detection of polymorphism

A small portion of the caudal fin of recaptured individuals was taken and preserved in 95% ethanol. Total DNA was extracted from that piece of tissue by proteinase K digestion followed by phenol-chloroform purification and ethanol precipitation (Sanbrook *et al.* 1989). Individuals were genetically identified as *P. eos* or hybrids according to Binet & Angers (2005). Only individuals identified as *P. eos* were used for the present study.

Genetic variation was assessed at six polymorphic microsatellite DNA loci. Briefly, DNA was amplified via polymerase chain reaction (PCR) using *Taq polymerase* (Promega) and locus-specific primer pairs developed for *Phoxinus*. Primers and conditions for PHO 1 and 2 were previously published in Binet & Angers (2005). Others primers are shown 5' to 3' PHO-4 GACAATGACCTGTCAATC and AGATATAGAACAATGGACGG, PHO-39 ACAGATGTTTGTGAATGG and GAACAGTCAGACAAAGTC, PHO-60 GGAATTTATCAAACACAGACAG and GGATGAGAACGGGCAGATC, and PHO-61 TATTGAATTCCAAGATAGC and TGGAAAGTGTGATGAGACTG. PCR conditions and methods of polymorphism detection were similar to those published in Binet & Angers (2005).

3.2.3 Genetic analyses

Genetic diversity was estimated as the number of alleles and Nei's (1987) gene diversity (H_E). The presence of null alleles was examined using the Micro-Checker package, version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2003). We used Monte Carlo exact tests to examine agreement with Hardy-Weinberg expectations for each site as well as for

different combinations of intra-lake sites taken as one. The differentiation among combinations of intra-lake sites was tested by an analysis of allelic differentiation and an evaluation of Fisher's exact test by means of a Markov-chain Monte Carlo variation (Raymond & Rousset 1995). The variance components were estimated at different levels of hierarchical subdivisions (within-site group, among-sites within-lake group and between-lake group) using the molecular variance model of Excoffier *et al.* (1992) (ARLEQUIN version 3.0b; Schneider *et al.* 1997). The D_{CE} genetic distances (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) were computed between each pair of sites. Isolation by distance was tested with the Mantel test using D_{CE} genetic distances and the geographic distance between sites along the littoral zone (Peatkau *et al.* 1997). Genetic distances were then used to construct a phylogenetic tree using the neighbor-joining (NJ) method (Saitou & Nei 1987). The topology of the tree was tested for robustness by bootstrapping over loci. D_{CE} distances and the NJ tree were computed using POPULATION 1.2.24 (Langella 1999). The effective number of migrants exchanged per generation (N_{EM}) among the four sites in Desjardins L., among the three sites in Beaver L., and among each pair of sites between Desjardins and Beaver lakes were computed with the private alleles method (Slatkin 1985; Barton & Slatkin 1986). Estimations of genetic diversity, HWE, allelic differentiation, and Mantel tests as well as N_{EM} were computed using the GENEPOP program version 3.4 (Raymond & Rousset 1995).

3.3 Results

Microsatellite loci exhibited from 7 to 20 alleles over all sites for a total of 93 alleles (Table I, Figure 2). No null alleles were detected in our data. The average number of alleles per loci for a single site ranged from 8.67 to 9.83 and the gene diversity over all loci ranged from 0.78 to 0.83 (Table I). The total number of alleles observed for both lakes (93) is far higher than the mean number of alleles observed within each lake (74). Similarly, the total number of alleles per lake is higher than the average number of alleles for all sites (75 vs 56 for Lake Desjardins and 73 vs 55 for Lake Beaver). These results indicate that alleles are not distributed uniformly between lakes or sites. For example, a total of 28 alleles are unique to a given site within a lake while 38 are private to a given lake (Figure 2). However, no such differences were observed for gene diversity (Table I).

Multilocus tests performed on individual sites revealed that genotypic frequencies are in agreement with Hardy-Weinberg expectations for each site (Table I). Analyses conducted on individual loci indicated deviations from HWE at two of the 42 sites-locus combinations: site C at PHO-61 and site F at PHO-39. On the other hand, departures from HWE were observed over all loci when the four Desjardins sites were taken as one population as well as when the three Beaver sites were pooled ($P < 0.0001$) (Table I). Tests performed on pooled sites but without PHO-61 or site C for Desjardins and without PHO-39 or site F for Beaver remained significant, indicating that departures from HWE are not exclusively due to these individual sites or loci. Significant departures were also observed in most of the tests when pooling three or

two intra-lake sites (Table II). Multilocus tests performed to determine the cause of departures from HWE in the pooled sites revealed significant heterozygote deficiencies in all but one combination (sites E and F, Table II).

Table I. Number of individuals analyzed, number of alleles, gene diversity over all loci, and Hardy-Weinberg equilibrium probability for all sites of lakes Desjardins and Beaver and for all sites within each lake pooled. Numbers in parentheses are the mean number of alleles and the mean gene diversity per lake and for both lakes combined.

Site	Nb. of individuals	Nb. of alleles	Gene diversity	HWE (p-value)
A	45	58	0.7824	0.59
B	38	58	0.7864	0.28
C	26	56	0.8056	0.07
D	34	58	0.8067	0.44
All				
Desjardins				
sites pooled	127	75 (56)	0.7949 (0.7953)	< 0.0001
All Beaver				
sites pooled	75	73 (55)	0.8162 (0.8156)	< 0.0001
Both lakes				
pooled	202	93 (74)	0.8136 (0.8055)	< 0.0001

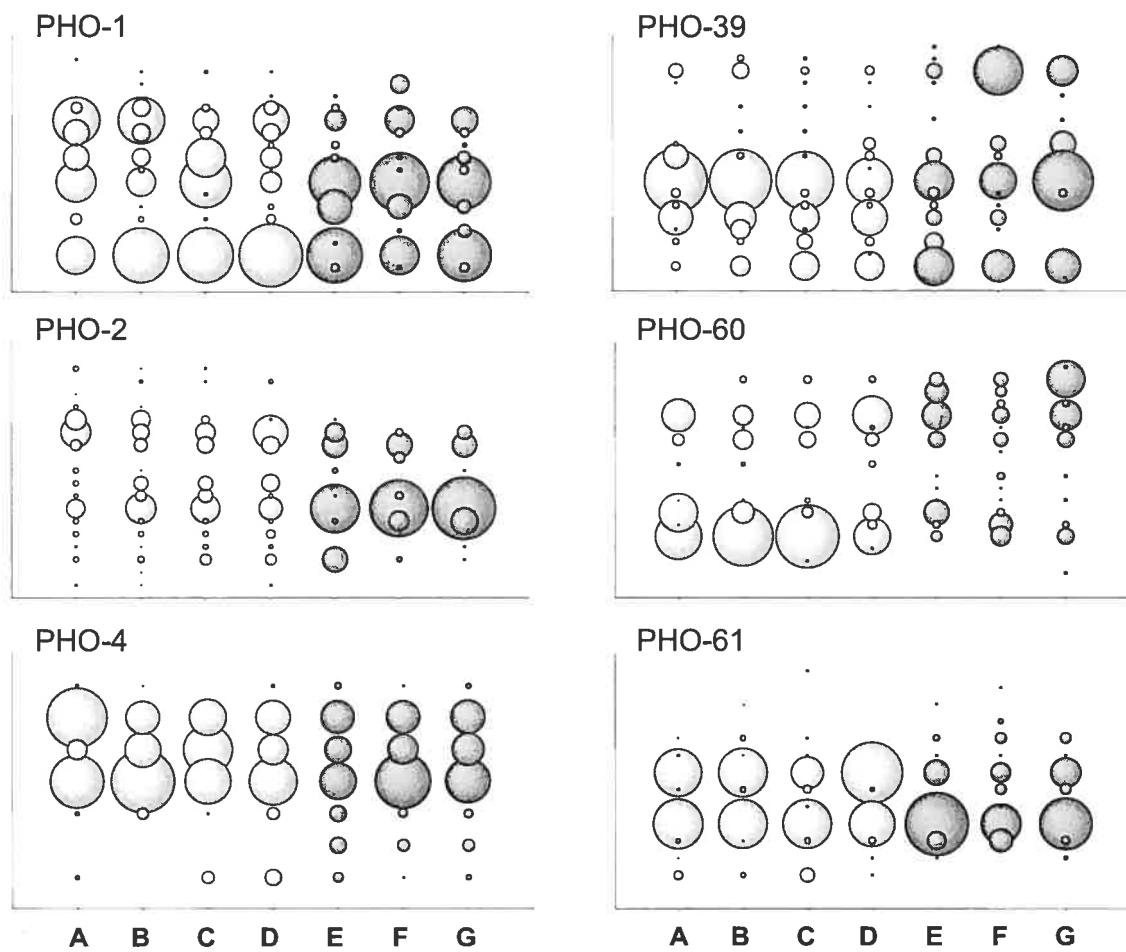


Figure 2. Allelic frequencies at the six microsatellite loci for the seven sampled sites. Each circle represents one allele and the size of the circle represents its frequency. Y-axis refers to the size of alleles. Letters correspond to sites from lakes Desjardins (A, B, C, D) and Beaver (E, F, G) (see Figure 1).

Table II. Results of the multilocus HWE, heterozygotes deficit and allelic differentiation tests (p-values) for different intra-lake sites combinations in lakes Desjardins and Beaver.

Sites combinations	HWE	Heterozygotes deficit	Allelic differentiation
Lake Desjardins			
ABCD	<0.0001	<0.0001	0.0120
ABC	0.0313	0.0115	0.0401
ABD	0.0150	0.0020	0.0075
ACD	<0.0001	<0.0001	0.0144
BCD	0.0201	<0.0001	0.2537
AB	0.2166	0.0018	0.0607
AC	0.0418	0.0186	0.0193
AD	<0.0001	<0.0001	0.0216
BC	0.0427	0.0129	0.5582
BD	0.1598	0.0109	0.0480
CD	0.0026	0.0100	0.2909
Lake Beaver			
EFG	<0.0001	<0.0001	0.0053
EF	0.0573	0.1394	0.4721
EG	0.0036	0.0004	0.0011
GF	0.0923	0.0082	0.0321

Results of the exact tests of allelic differentiation are reported in Table II. Multilocus tests over all intra-lake sites are significant for both lakes. Only three of the nine intra-lake pairwise comparisons were clearly non significant: B vs C and C vs D in Lake Desjardins, and E vs F in Lake Beaver. Exact tests performed on individual locus indicated that 14 of the 54 intra-lake comparisons were significant. All intra-lake comparisons were significant at least for one loci, except C vs D in Lake

Desjardins and E vs F in Lake Beaver and occurred at four of the six loci. This indicates that differentiation occurs at several loci rather than being the result of a single atypical locus. All inter-lakes comparisons performed over all loci were significant ($P < 0.0001$).

The hierarchical analysis of the genetic variance components shows that most of the variance is attributable to within-site group variation (97.14% of the variance). Between-lake group variation is only 2.85% but significant ($P < 0.0001$) while among-sites within-lake group is two orders of magnitude lower (0.02%) and not significant ($P = 0.35$). The number of migrants per generation (N_{Em}), estimated by the private alleles method, varied from 2.38 to 6.29 migrants from within-lake sites (mean Desjardins = 4.8, Beaver = 3.13) (Table II). These results indicate lower rates of migration between site D and other Desjardins sites and between site G and other Beaver sites (Table II). The estimated number of migrants between sites of different lakes is different from zero and overlaps with intra-lake sites estimates, varying from 1.25 to 3.14 (mean = 2.4).

Genetic distances revealed higher divergence between site D and other Desjardins sites (A, B, and C) and between site G and the other Beaver sites (E and F) (Table III). These results agree with estimations of N_{Em} from private alleles (Mantel test, $P = 0.0046$): The pairwise distances between within-lake sites (from 0.22 to 0.31) are smaller than those between lakes (from 0.34 to 0.40). Interestingly, a relationship was detected between genetic distances and geographic distances of sites in Lake

Desjardins (Mantel test, $P = 0.038$). While not significant in Beaver ($P = 0.34$, but there are only three possible comparisons), genetic and geographic distances between sites E and G and sites F and G are higher than between sites E and F (Table III; Figure 1), suggesting isolation by distance (IBD) pattern. The NJ tree inferred from the D_{CE} distances shows that sites of each lake clustered together (Figure III). Within-lake sites A, B, and C are closely related as are sites E and F. Despite the low differentiation observed among populations, nodes of this tree are supported by very strong bootstrap values (71-98%). These high values indicate a strong congruence among loci. For example, distances between sites E and F are smaller than distances between sites E and G and sites F and G in 11 of the 12 possibilities (2 pairwise comparisons at six loci). Such consistencies among loci could not be the result of chance only, but rather represent differentiation among sites.

Table III. Number of migrants per generation estimated with the private alleles method (above the diagonal) and with the D_{CE} genetic distance (below the diagonal) computed for each pairwise comparison of sites from lakes Desjardins and Beaver.

	A	B	C	D	E	F	G
A	-	5.73	6.29	5.25	1.25	1.96	1.89
B	0.22	-	6.16	3.29	1.82	2.74	2.95
C	0.25	0.22	-	5.63	2.44	2.34	2.97
D	0.23	0.26	0.25	-	2.45	3.06	2.69
E	0.40	0.39	0.39	0.37	-	4.03	2.38
F	0.40	0.37	0.39	0.48	0.26	-	2.98
G	0.36	0.37	0.36	0.34	0.31	0.30	-

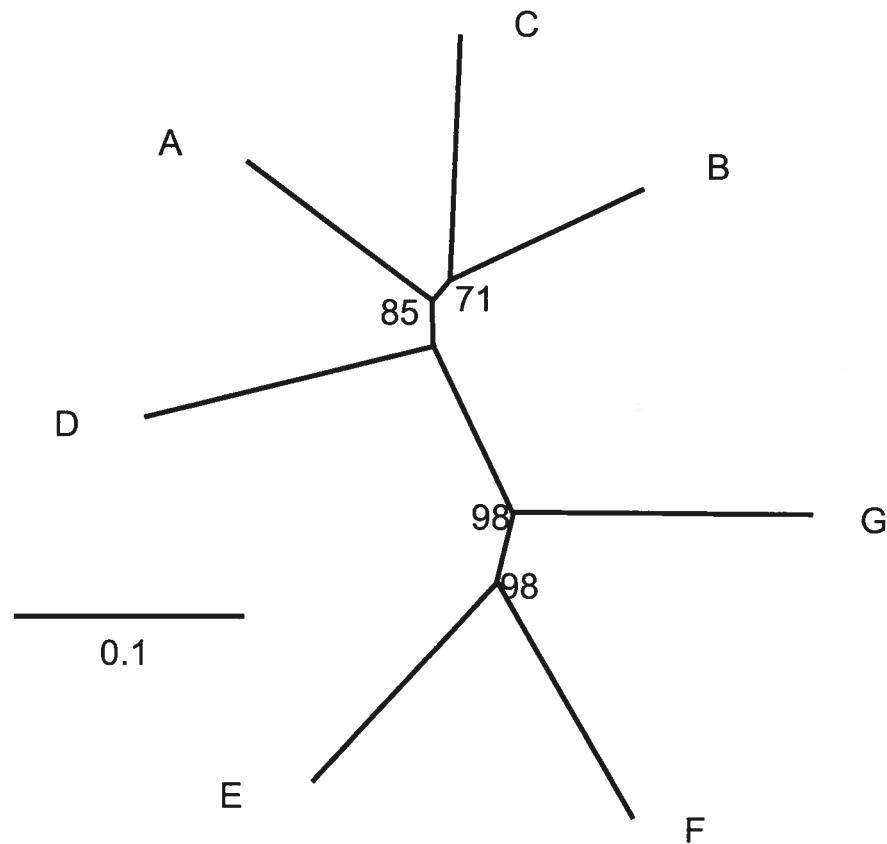


Figure 3. Phylogenetic tree inferred with the neighbor-joining algorithm and D_{CE} genetic distances among sites A, B, C, D (Lake Desjardins) and E, F, G (Lake Beaver). Bootstrap values are indicated.

3.4 Discussion

3.4.1 Spawning sites as distinct populations

The analysis of the genetic diversity of northern redbelly dace provided clear evidences that individuals from a given lake did not represent a random mating population, but are rather organized in several reproductive units connected by very low gene flow. Non-random mating was strongly supported by the observed HWE deviations when the spawning sites of a lake were pooled together while each

individual site is at equilibrium. In the present case, the HWE departures are due to heterozygote deficiency, as expected by the combination of differentiated groups of individuals (Wahlund effect). This indicates that a given site supports a panmictic population, but not the lake taken as a whole.

In addition to HWE deviations, evidences for differentiation among sites included significant tests of allelic differentiation for intra-lake sites and the congruence between the D_{CE} distances (Cavalli-Sforza & Edward 1967) and the N_{EM} estimated by the private alleles method (Slatkin 1985), which are distinct and independent approaches. The NJ tree topology is also supported by high bootstrap values, indicating strong congruence among loci. Such agreement could not be induced by chance alone and so is the result of a low but detectable genetic differentiation among sympatric populations. These results indicated that individuals faithful to a given spawning site formed a distinct reproductive unit, with a limited number of strayers that may reproduce at other sites.

Such results could not occur if individuals chose their spawning site randomly, even if they subsequently returned to those sites. These results therefore confirm that the site fidelity observed in *P. eos* is more specifically natal-site fidelity. The natal-site fidelity of northern redbelly dace is in agreement with a body of literature suggesting that natal-site fidelity is characteristic of numerous nondiadromous species (reviewed in Gerking 1959). Partial reproductive isolation among lacustrine populations living sympatrically for parts of or for their entire life cycle is a common feature of several

fishes, especially Salmonids (e.g., Hindar 1986; Hartley *et al.* 1992; Taylor & Bentzen 1993; McVeigh *et al.* 1995; Bernatchez *et al.* 1996; Taylor *et al.* 1997; Tessier *et al.* 1997; Dynes *et al.* 1999; Miller *et al.* 2001). However, the reproductive isolation that induces genetic differentiation at such a small geographical scale is striking: we observed natal-site fidelity in *P. eos* in very small lakes (less than 5 ha) with sampling sites separated by as few as 50 m (eg. sites A and B).

3.4.2 Sympatric vs allopatric populations

In spite of natal-site fidelity, the differentiation observed among intra-lake sites is very low when compared to that observed between lakes. The comparison of two geographically isolated lakes was performed to highlight the effect of migration among sites. The results indicated that differentiation among allopatric populations occurred far more rapidly than among sympatric populations. One of the reason is that the spawning sites of *Phoxinus* are not locally restricted such as tributaries as observed in other studies of sympatric populations (Taylor *et al.* 1997; Dynes *et al.* 1999; Miller *et al.* 2001), but are rather “continuous” along suitable habitats of the littoral zone. A strong natal-site fidelity in such continuous spawning sites is thus expected to generate an IBD signal caused by the variance in distance between birth and breeding sites (Wright 1943). This variance is however expected to be low : for instance, sites E and F separated by 20 meters exhibit no HWE departure nor heterozygotes deficit when pooled and no significant allelic differentiation, but are different from site G, 175 meters apart. Such pattern observed at the scale of a lake for *P. eos* is detected at larger geographic scale (hundreds of km) for anadromous

salmonids species such as *Salmo salar* and *Salvelinus fontinalis* that display an IBD patterns caused by inter-rivers strayers (Castric and Bernatchez 2004). Considering the genetic differentiation that we observed, it appears that individuals may perform movements along the littoral zone, but that reproduction among individuals of different sites is low enough to prevent genetic homogenization of these populations.

It is well known that an extremely low migration rate may overcome the effects of low drift associated with high population size. An estimation of the N_E of a given site may be inferred from the gene diversity in a population at mutation-drift equilibrium according to Nei's (1987) equations $N_E = H_E / (1-H_E) 4\mu$ and $N_E = [(1 / 1-H_E)^2 - 1] / 8\mu$ for loci expected to evolved in a infinite alleles model (IAM) and a stepwise mutation model (SMM). Correct estimations for microsatellite loci are expected to be situated between these two extreme mutation model (Estoup and Angers 1998). By using a mutation rate of 2.5×10^{-4} average over several Vertebrates microsatellites (Yue *et al.* 2004), N_E of 4000 and 12000 individuals per site was estimated for IAM and SMM respectively. The differentiation observed among such large populations indicated a very low gene flow among sites. With all else equal, lakes supporting lower *P. eos* densities are thus expected to show higher differentiation among sympatric populations.

3.4.3 Evolutionary implications of sympatric differentiation

The plasticity of trophic morphology and the variability of reproductive niches coupled with pre-mating isolation are among the key processes leading to sympatric

speciation (Schluter 1996). All these criteria seems to be fulfilled by sympatric populations of *P. eos*. First, the heterogeneity of reproductive within-lake niches has been inferred from the spatial segregation between *P. eos* and hybrids in Desjardins L. (Massicotte *et al.* in review). Second, the results of this study revealed that the natal-site fidelity is an efficient pre-mating barrier, when taking into account the size of the lakes and the swimming capacity of these fish (Gaudreau and Boisclair 1998). Third, strong phenotypic plasticity in morphology has been observed in *P. eos* (Schlosser *et al.* 1998). As an example, these authors reported a release in the trophic morphology of *P. eos* in response to reduced hybrids abundance. As a conclusion, the formation of local adaptations and ultimately speciation is not unlikely to occur in spite of the short evolutionary scale of this system. Such observations were reported by Dynes *et al.* (1999) about the partial reproductive isolation between sympatric populations of brook charr (*Salvelinus fontinalis*). Their results suggest that brook charr inhabiting oligotrophic Canadian Shield lakes may exhibit trophic polymorphism (littoral vs pelagic forms) associated with slightly genetically differentiated and non-randomly mating groups of fish. A remarkable example of explosive speciation is found in the endemic cichlid fishes of African lakes (Rico and Turner 2002), demonstrating the potential role of within-lake reproductive isolation in speciation on a short time scale.

Inferences about speciation are usually conceived after the event is completed and are more likely to provide information about the characteristics of a species than about the processes that give rise to a species (McPhail 1994). The fact that the sympatric

populations of *P. eos* may be at their early stage of genetic divergence represents a stimulating opportunity to reveal the existence of an incipient ecological species and to study the ongoing evolutionary processes in scenarios where adaptive divergence and reproductive isolation are associated.

3.5 Acknowledgements

We are particularly grateful to Marie-Claire Binet for laboratory assistance. This research was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA and PM, and from the Groupe de Recherche Interuniversitaire en Limnologie et en Environnement Aquatique (GRIL).

4. CONCLUSION

L'objectif de ce projet était d'étudier les mécanismes 1) qui permettent la coexistence des membres sexués et asexués du complexe *Phoxinus eos-neogaeus* et 2) qui sont impliqués dans la formation et le maintien des populations en sympatrie. Dans un premier temps, des expériences de capture, marquage et recapture (CMR) ont permis de mettre en évidence un comportement de fidélité au site. Malgré la petite taille du lac Desjardins (4,87 ha) et la proximité des sites (distance maximale entre deux sites: 400 m), le retour des individus sur leur site de marquage a été de plus de 90%. Plusieurs individus ont aussi été recapturés deux et même trois fois au même site (alors que seulement 10% des individus marqués étaient recapturés). Un échantillonnage de sites adjacents aux sites de marquage a permis de confirmer que les individus ne se déplaçaient que sur une très courte distance autour des sites de marquage et ce, malgré leur capacité à parcourir d'importante distance à l'intérieur d'un lac (Gaudreau et Boisclair, 1998). Il semble donc que les *Phoxinus* aient une aire de répartition très restreinte en zone littorale, du moins en période de reproduction. De plus, les sites de reproduction ne sont pas isolés comme le sont des tributaires mais plutôt retrouvés en continu le long de la zone littorale, ce qui rend la dispersion des individus entre les sites plus probable. Ces résultats confirment les observations effectuées par Magnin et al. (1976); d'une distribution non aléatoire des *Phoxinus* sp. dans le lac. Finalement, les recaptures effectuées un an après les séances de marquage permettent de conclure que les individus reviennent aux mêmes sites d'une année à l'autre, le succès de retour des individus sur leur site de marquage ayant été de 74%. Ces observations renforcent donc celles effectuées en 2004 et confirment un comportement de fidélité au site chez les membres du complexe *P. eos-neogaeus*.

Le comportement de fidélité au site s'est révélé similaire entre l'espèce sexuée *P. eos* et les différents types d'hybrides du complexe. Par contre, certains sites sont largement dominés par les *P. eos* alors que les autres sont plutôt dominés par les hybrides. Le fait que les hybrides démontrent un comportement semblable à l'espèce parentale ne semble donc pas exclusivement associé au lien obligatoire envers l'espèce parentale comme nous l'avons proposé. Et ce, puisque les hybrides ne semblent pas se répartir sur les sites de façon à maximiser le rapport individus sexués/asexués. La valeur adaptative de la fidélité au site de natalité motive certainement en grande partie le comportement des membres du complexe.

La ségrégation spatiale des membres indique par contre une certaine hétérogénéité des conditions environnementales qui prévalent sur ces sites. Bien que cet aspect ne soit pas traité dans cette étude, il est possible de présumer que le choix d'un site et la fidélité à ce site par les membres du complexe sont des comportements définis par des différences écologiques entre les sites de reproduction à l'intérieur des lacs Desjardins et Beaver. Par exemple, Schlosser et al. (1998) a proposé que les membres du complexe démontrent des préférences environnementales qui sont fonction de leur constitution génétique. Conséquemment, la fréquence relative de l'espèce parentale et des hybrides asexués varie considérablement en fonction de l'environnement (Schlosser et al., 1998; Doeringsfeld et al., 2004).

Deux hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la ségrégation spatiale et temporelle de l'espèce parentale et des hybrides asexués en période de reproduction. La première se base sur le « Frozen niche variation model » (Vrijenhoek, 1979;

1984a, b) qui suggère une réduction de la compétition entre les formes sexuées et asexuées par un faible chevauchement des niches écologiques des deux formes. Cela permettrait de prévenir l'extinction de l'espèce parentale et par le fait même, d'assurer la survie des hybrides asexués. La ségrégation spatiale des formes sexuées et asexuées a été observée chez d'autres complexes unisexués comme les genres *Poeciliopsis* et *Poecilia* (Vrijenhoek, 1978; Balsano et al., 1981; Schenck et Vrijenhoek, 1986).

La deuxième hypothèse est que les hybrides asexués sont moins dépendants de l'espèce parentale que présumé. Une des particularités du complexe *P. eos-neogaeus* réside dans la formation d'une grande proportion d'hybrides triploïdes (autour de 50% de la progéniture hybride) (Goddard et al., 1989; Schlosser et al., 1998; Binet et Angers, 2005). Ces hybrides peuvent être soit mâle ou femelle, sont fertiles et ne se reproduisent pas de façon asexuée (Goddard et al., 1989). Chez la plupart des autres complexes unisexués, très peu d'hybrides triploïdes sont habituellement observés. Par exemple, quelques rares cas d'hybrides triploïdes sont obtenus par fécondation d'un œuf diploïde de *Poecilia formosa* (Rash et Balsano, 1974). Et ce, puisque le taux d'incorporation du sperme est d'environ 1% (Schultz et Kallman, 1968). Chez le complexe gynogénétique *Menidia clarkhubbsi*, seulement trois individus triploïdes ont été rapportés (Echelle et al., 1989). Par contre, d'autres exemples de la littérature suggère la participation d'un mâle triploïde à la reproduction des hybrides asexués (Bogart, 1989; Darevsky et al., 1989; Graf et Polls, 1989). Par la production de gamètes fonctionnels les mâles triploïdes pourraient subvenir au besoin en sperme des hybrides asexués. Cela suggère que les hybrides

asexués du complexe *P. eos-neogaeus* pourraient être en voie de s'affranchir de leurs espèces parentales. Le décalage de la période de reproduction des hybrides avec celle de l'espèce parentale renforce cette hypothèse puisqu'au moment de la reproduction des hybrides asexués sur les sites fréquentés par ceux-ci, l'espèce parentale est pratiquement absente. Le fait que les hybrides asexués ne dépendraient plus des mâles de l'espèce parentale pour la reproduction aura certainement des implications évolutives sur ce complexe gynogénétique. Cela pourrait entre autres permettre aux hybrides de coloniser des lacs qui possèdent des caractéristiques environnementales plus près de leur optimum. Par exemple, les hybrides diploïdes et triploïdes ont déjà été observés en allopatrie dans quelques lacs de la région des Laurentides (Binet et Angers, 2005). Bien entendu, les deux hypothèses proposées sont non exclusives et chacune joue possiblement un rôle primordial afin d'assurer la coexistence de l'espèce parentale et des hybrides asexués du complexe.

Il serait intéressant de comparer nos observations avec un système pour lequel l'espèce parentale *P. neogaeus* est présente. *P. neogaeus* est absent sur une bonne partie de l'aire de distribution du complexe. Dans les lacs des Laurentides, on ne la retrouve en sympatrie qu'avec l'autre espèce parentale *P. eos*. Les deux types d'hybrides et *P. neogaeus* se ressemblent beaucoup morphologiquement; tant au niveau de la taille que des caractères de la tête (observations personnelles). Il est possible d'émettre l'hypothèse que ces deux formes ont des niches écologiques plus chevauchantes en comparaison avec *P. eos*. Considérant que les hybrides sont avantagés par leur mode de reproduction asexué et que leur dépendance envers les espèces parentales semble réduite, cela aurait occasionné une forte pression de

compétition par les hybrides sur *P. neogaeus*. De ce point de vue, la coexistence des hybrides et de l'espèce parentale *P.eos* semble un bon exemple du Frozen Niche Variation model.

Dans un deuxième temps, l'analyse de marqueurs génétiques extrêmement variables (locus microsatellites) a été réalisée sur plus de 200 *P. eos* recapturés à leur site de marquage (individus fidèles). Il a été possible de distinguer entre la fidélité au site de ponte ou la fidélité au site de natalité. Tous les sites testés individuellement étaient à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Cependant, un écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été observé lorsque tous les sites d'un même lac ont été regroupés en une seule population, et ce pour les deux lacs analysés. Ces résultats indiquent sans ambiguïté que les individus d'un site donné se reproduisent entre eux, mais pas ou peu avec ceux des autres sites. Les distances génétiques et les tests de différenciation alléliques indiquent que les effets divergents de la dérive génétique sont plus marqués que ceux homogénéisateurs de la migration. La faible différenciation génétique observée semble vraisemblablement due au court temps de divergence plutôt qu'à de haut taux de migration actuel entre les populations d'un même lac. Il a donc été possible de mettre en évidence la présence de différenciation génétique résultant d'un isolement reproducteur entre les sites induit par le comportement de fidélité au site de natalité.

L'isolement par le temps (Isolation by Time, IBT), la réduction des échanges génétiques entre les individus d'une même population mais qui se reproduisent à des temps différents, a été proposé comme un mécanisme structurant des populations dans une revue de littérature par Hendry et Day (2005). Deux vagues de reproduction

sont observées chez les *P. eos*. Une première période s'étend de la fin mai à la mi-juin et une seconde au début du mois de septembre. Scott et Crossman (1973) rapportent que *P. eos* aurait la possibilité de se reproduire deux fois au cours l'été. Cependant, leurs observations ne permettent pas de distinguer si se sont les mêmes individus qui se reproduisent deux fois ou des individus différents. S'il s'agit d'individus différents entre les deux vagues de reproduction et que le moment de la reproduction est un caractère héritable chez les *Phoxinus*, les échanges génétiques devraient effectivement être limités entre les individus se reproduisant tôt au début de l'été et ceux se reproduisant tard en fin de saison. Il serait intéressant d'étudier cet aspect en utilisant exactement la même méthode que celle utilisée afin de mettre en évidence le patron d'isolement par la distance (Isolation by Distance, IBD).

Une des premières étapes menant à un évènement de spéciation est l'évolution de différence génétique entre les populations (Schluter, 1996). Taylor et al. (1997) ont démontré dans leur étude sur les morphes de saumons kokanee du lac Okanagan la possibilité que la présence de niches reproductives distinctes ait facilité l'évolution de morphes isolés au niveau de la reproduction mais partageant la même ressource trophique. Chez les salmonidés, les espèces des genres *Salvelinus* et *Coregonus* sont plus enclines à se diviser en sympatrie et à former des groupes spécialisés au niveau de leur écologie (Behnke, 1972). Hindar et al. (1986) ont suggéré un lien possible entre cette caractéristique et le fait que ces espèces se reproduisent en milieu lacustre. Cela permettrait aux individus de se reproduire sur des sites de ponte isolés ou continus et sous des conditions environnementales très variées (Svärdson, 1979; Balon, 1980). Les poissons de la famille des Cichlidae représentent l'exemple par

excellence de spéciation explosive. Plus de 1000 espèces sont reconnues dans seulement trois lacs Africains; lacs Malawi, Tanganyika et Victoria (Turner et al., 2001). Cette radiation spectaculaire est généralement considérée comme résultant d'un processus de spéciation microallopatric intra lac (Fryer, 1959; Rico et Turner, 2002). Puisque des espèces très proches démontrent peu ou pas de différences écologiques tant au niveau de la diète que de l'habitat (Turner et al., 1991), Turner (1994) a émis des doutes à l'effet qu'une spécialisation de la niche trophique ait pu expliquer l'évolution de ce groupe à elle seule. Le comportement de choix de partenaires a donc été suggéré comme facteur additionnel au niveau du maintien de l'isolement reproducteur entre ces espèces (Knight et al., 1998; Turner et al., 2001). Il semble donc que les processus de spéciation en milieu naturel soient le résultat de mécanismes évolutifs pouvant agir de concert et résultant en l'établissement d'un isolement reproducteur entre les populations que se soit comportemental (fidélité au site de natalité, choix de partenaire), au niveau de la niche trophique ou encore de la niche reproductive.

De façon générale, les inférences au niveau des événements de spéciation sont formulées une fois que le processus est complété et sont plus enclines à donner de l'information sur les caractéristiques des espèces que sur les processus évolutifs qui les a fait naître (McPhail, 1994). Le fait que les populations de *Phoxinus* commencent à être différenciées présente une excellente opportunité pour révéler l'apparition de nouvelles espèces et ainsi permettre l'étude des processus évolutifs actuels auxquels la divergence adaptative et l'isolement reproducteur sont associés.

5. RÉFÉRENCES

- Aalto, S.K. & Newsome (Buck), G.E. (1990). Additional evidence supporting demic behaviour of a yellow perch (*Perca flavescens*) population. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **47**, 1959-1962.
- Adkison, M.D. (1995). Population differentiation in Pacific salmon: local adaptation, genetic drift, or the environment? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**, 2762-2777.
- Allendorf, F.W. & Phelps, S.R. (1981). Use of allelic frequencies to describe population structure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **38**, 1507-1514.
- Altman, A.D. & Taylor, E.B. (2003). A molecular assessment of homing in the tidepool sculpin. *Journal of Fish Biology* **62**, 623-640.
- Alves, M.J., Coelho, M.M. & Collares-Pereira, M.J. (2001). Evolution in action through hybridisation and polyploidy in an Iberian freshwater fish: a genetic review. *Genetica* **111**, 375-385.
- Armstrong, R.A. & McGhee, R.J. (1980). Competitive exclusion. *American Naturalist* **115**, 151-170.
- Aspbury, A.S. & Gabor, C.R. (2004). Discriminating males alter sperm production between species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15970-15973.
- Awise, J.C. (1998). Conservation genetics in the marine realm. *Journal of Heredity* **89**, 377-382.
- Bailey, R.E., Irvine, J.R., Dalziel, F.C. & Nelson, T.C. (1998). Evaluation of visible implant fluorescent tags for marking coho salmon smolts. *North American Journal of Fisheries Management* **18**, 191-196.

- Balon, E.K. (1980). *Charrs, Salmonids Fishes of the genus Salvelinus* (Balon, E.K. ed.). The Hague: Dr W. Junk Publishers.
- Balsano, J.S., Kucharski, K., Randle, E.J., Rash, E.M. & Monaco, P.J. (1981). Reduction of competition between bisexual and unisexual female of *Poecilia* in northeastern Mexico. *Environmental Biology of Fishes* **6**, 39-48.
- Barton, N.H. & Slatkin, M. (1986). A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity* **56**, 409-415.
- Beacham, T.D. (1988). A genetic analysis of early development in pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) at three different temperatures. *Genome* **30**, 89-96.
- Behnke, R.J. (1972). The systematics of salmonid fishes of recently glaciated lakes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **29**, 639-671.
- Bell, G. (1982). *The masterpiece of nature*. Croom Helm, London.
- Bernatchez, L., Vuorinen, J.A., Bodaly, R.A. & Dodson, J. (1996). Genetic evidence for reproductive isolation and multiple origins of sympatric trophic ecotypes of whitefish (*Coregonus*). *Evolution* **50**, 624-635.
- Binet, M.C. & Angers, B. (2005). Genetic identification of members of the *Phoxinus eos-neogaeus* hybrid complex. *Journal of Fish Biology* **67**, 1169-1177.
- Blair, G.R., Rogers, D.E. & Quinn, T.P. (1993). Variation in life history characteristics and morphology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in the Kvichak River system, Bristol Bay, Alaska. *Transactions of American Fisheries Society* **122**, 550-559.

- Blair G.R. & Quinn, T.P. (1989). Homing and spawning site selection by sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Iliamna Lake, Alaska. *Canadian Journal Zoology* **69**, 176-181.
- Bogart, P.J. (1989). A mechanism for interspecific gene exchange via all-female salamander hybrids. In: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. (Dawley, M.R. & Bogart, P.J., eds), pp. 170-179. New York State Museum, New York.
- Cavalli-Sforza, L.L. & Edwards, A.W.F. (1967). Phylogenetics analysis: models and estimation procedures. *Evolution* **32**, 550-570.
- Carson, H.L. & Templeton, A.R. (1984). Genetic revolutions in relation to speciation phenomena: the founding of new populations. *Annuals Review of Ecology and Systematics* **15**, 97-131.
- Carvalho, G.R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology* **43**, 53-73.
- Castric, V. & Bernatchez, L. (2004). Individual assignment test reveals differentiation restriction to dispersal between two salmonids despite no increase of genetic differences with distance. *Molecular Ecology*, **13**, 1299-1312.
- Charlesworth, B. (1980). The cost of meiosis with alternation of sexual and asexual generations. *Journal of Theoretical Biology* **87**, 517-528.
- Cherfas, N.B. (1981). Gynogenesis in fishes. In: *Genetic basis of fish selection*. (Kirpichnikov, V.S., ed.), pp. 255-273. Springer-Verlag, Berlin.
- Clough, S. & Ladle, M. (1997). Diel migration and site fidelity in a stream-dwelling cyprinid, *Leuciscus leuciscus*. *Journal of Fish Biology* **50**, 1117-1119.

- Cooper, E.L. (1935). Some results of forage fish investigations in Michigan. *Transaction of American Fisheries Society* **65**, 132-142.
- Crossman, E.J. (1990). Reproductive homing in muskellunge, *Esox maskinongy*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **47**, 1803-1812.
- Danielssen, D.S. & Gjosaeter, J. (1994). Release of 0-group cod, *Gadus morhua* L., on the southern coast of Norway in the years 1986-89. *Aquaculture and Fisheries Management* **25**, 129-142.
- Darevsky, I.S., Danielyan, F.D., Sokolova, T.M. & Rozanov, YU. M. (1989). Intraclonal mating in the parthenogenetic lizard species *Lacerta unisexualis* Darevsky. In: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. (Dawley, M.R. & Bogart, P.J., eds.), pp. 228-235. New York State Museum, New York.
- Das, M.K. & Nelson, J.S. (1990). Spawning time and fecundity of Northern Redbelly Dace, *Phoxinus eos*, Finescale Dace, *Phoxinus neogaeus*, and their hybrids in Upper Pierre Grey Lake, Alberta. *The Canadian Field-Naturalist* **104**, 409-413.
- Dawley, R.M. (1989). An introduction to unisexual vertebrates. In: *Evolution and ecology of unisexual vertebrates* (Dawley, R.M. & Bogart, J.P. eds), pp. 1-18. New York State Museum, New York.
- Dawley, R.M., Schultz, R.J. & Goddard, K.A. (1987). Clonal reproduction and polyploidy in unisexual hybrids of *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaeus* (Pisces: Cyprinidae). *Copeia* **1987**, 275-283.
- Dewey, M.R. & Zigler, S.J. (1996). An evaluation of fluorescent elastomer for marking bluegill sunfish in experimental studies. *The Progressive Fish-Culturist* **58**, 219-220.

- Dittman, A.H. & Quinn, T.P. (1996). Pacific salmon homing: mechanisms and ecological basis. *The Journal of Experimental Biology* **199**, 83-91.
- Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Doeringsfeld, M.R. (1996). Niche relationship and morphology of coexisting northern redbelly (*Phoxinus eos*) and finescale (*P. neogaeus*) dace with their hybrids. Thesis. University of North Dakota, Grand Forks, North Dakota, USA.
- Doeringsfeld, M.R., Schlosser, I.J., Elder, J.F. & Evenson, D.P. (2004). Phenotypic consequences of genetic variation in a gynogenetic complex of *Phoxinus eos-neogaeus* clonal fish (Pisces: Cyprinidae) inhabiting a heterogeneous environment. *Evolution* **58**, 1261-1273.
- Dynes, J., Magnan, P., Bernatchez, L. & Rodriguez, M.A. (1999). Genetic and morphological variation between two forms of lacustrine brook charr. *Journal of Fish Biology* **54**, 955-972.
- Echelle, A.A., Echelle, A.F. & Middaugh, P.D. (1989). Evolutionary biology of the *Menidia clarkhubbsi* complex of unisexual fishes (Atherinidae): Origins, clonal diversity, and mode of reproduction. In: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. (Dawley, M.R. & Bogart, P.J., eds), pp. 144-152. New York State Museum, New York.
- Escalante-Pliego, B.P. (1991). Genetic differentiation in yellowthroats (Parulinae: *Geothlypis*). *Acta Congressus Internationalis Ornithologici* **20**, 333-341.
- Estoup, A. & Angers, B. (1998). Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations In: *Advances in Molecular Ecology* (Carvalho, G.R. ed.), pp. 55-80. IOS Press, Amsterdam.

- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.
- Fisher, R.A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press, Oxford.
- Frederic, J.L. (1997). An evaluation of fluorescent elastomer injection as a method for marking small fish. *Bulletin of Marine Science* **61**, 395-408.
- Garant, D., Dodson, J.J. & Bernatchez, L. (2000). Ecological determinants and temporal stability of the within-river population structure in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Ecology* **9**, 615-628.
- Gard, R., Drucker, C.V. & Holland-Bartels, L. (1987). Differentiation of subpopulations of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*), Karluk River system, Alaska. *Canadian Special Publishes of Fisheries and Aquatic Science* no.96, pp. 408-418.
- Gaudreau, N. & Boisclair, D. (1998). The influence of spatial heterogeneity on the study of fish horizontal daily migration. *Fisheries Research* **35**, 65-73.
- Gerking, S.D. (1959). The restricted movements of fish populations. *Bio Review* **34**, 221-242.
- Ghiselin, M.T. (1974). *The economy of nature and the evolution of sex*. Univ. California Press, Berkeley.
- Goddard, K.A. & Dawley, R.M. (1990). Clonal inheritance of a diploid nuclear genome by a hybrid freshwater minnow (*Phoxinus eos-neogaeus*, Pisces: Cyprinidae). *Evolution* **44**, 1052-1065.

- Goddard, K.A., Dawley, R.M. & Dowling, T.E. (1989). Origin and genetic relationship of diploid, triploid, and diploid-triploid mosaic biotypes in the *Phoxinus eos-neogaeus* unisexual complex. In: *Evolution and Ecology of unisexual vertebrates* (Dawley, R.M. & Bogart, P.J., eds.), pp. 268-280. New York State Museum, New York.
- Goddard, K.A., Megwinoff, O., Wessner, L.L. & Giaimo, F. (1998). Confirmation of gynogenesis in *Phoxinus eos-neogaeus* (Pisces: Cyprinidae). *Journal of Heredity* **89**, 151-157.
- Graf, J.D. & Polls, M. (1989). Evolutionary genetics of the *Rana esculanta* complex. In: *Evolution and Ecology of unisexual vertebrates* (Dawley, R.M. & Bogart, P.J., eds.), pp. 289-301. New York State Museum, New York.
- Groot, C. (1965). On the orientation of young sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during their seaward migration out of lakes. *Behaviour* **14**, 198 pp.
- Gross, M.R., Coleman, R.M. & McDowall, R.M. (1988). Aquatic productivity and the evolution of diadromous fish migration. *Science* **239**, 1291-1293.
- Gross, M.L., Kapuscinski, A.R. & Faras, A.J. (1994). Nest-specific fingerprints of smallmouth bass in Lake Opeongo, Ontario. *Transactions of the American Fisheries Society* **123**, 449-459.
- Hakoyama, H., Matsubara, N. & Iguchi, K. (2001). Female-biased operational sex ratio of the sexual host fish in a gynogenetic complex of *Carassius auratus*. *Population Ecology* **43**, 111-117.
- Hansen, L.P., Jonsson, N. & Jonsson, B. (1993). Oceanic migration in homing Atlantic salmon. *Animal Behaviour* **45**, 927-941.
- Harden Jones, F.R. (1968). *Fish migration*. London: Arnold.

- Hartley, S.A., Bartlett, S.E. & Davidson, W.S. (1992). Mitochondrial DNA analysis of Scottish populations of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Fish Biology* **40**, 219-224.
- Hartney, K.B. (1996). Site fidelity and homing behaviour of some kelp-bed fishes. *Journal of Fish Biology* **49**, 1062-1069.
- Hasler, A.D. (1971). Orientation of fish migration. In *Fish Physiology*, vol.6 (ed. Hoar, W.S & Randall, D.J.), pp 429-510. New York, Academic Press.
- Hasler, A.D. & Larsen, J.A. (1955). The homing salmon. *Scientific American* **193**, 72-75.
- Hasler, A.D. & Scholz, A.T. (1983). *Olfactory imprinting and homing in Salmon*. Springer-Verlag, Berlin, 134 pp.
- Hawryshyn, C.W., Arnold, M.G., Bowering, E. & Cole, R.L. (1990). Spatial orientation of rainbow trout to plane polarized light: the ontogeny of e-vector discrimination and spectral sensitivity characteristics. *Journal of Comparative Physiology* **166**, 565-574.
- Hendry, A.P., Leonetti, F.E. & Quinn, T.P. (1995). Spatial and temporal isolating mechanisms: the formation of discrete breeding aggregations of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal Zoology* **73**, 339-352.
- Hendry, A.P. & Day, T. (2005). Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. *Molecular Ecology* **14**, 901-916.
- Hendry, A.P., Wenburg, J.K., Bentzen, P., Volk, E.C. & Quinn, T.P. (2000). Rapid evolution of reproductive isolation in the wild, Evidence from introduced salmon. *Science* **290**, 515-518.

- Hert, E. (1990). Factors of habitats partitioning in *Pseudotropheus aurora* (Pisces: Cichlidae), an introduced species to a species-rich community of Lake Malawi. *Journal of Fish Biology* **36**, 853-865.
- Hert, E. (1992). Homing and home site fidelity in rock-dwelling cichlids (Pisces: Teleostei) of Lake Malawi, Africa. *Environmental Biology of Fishes* **33**, 229-237.
- Hindar, K., Ryman, N. & Ståhl, G. (1986). Genetic differentiation among local populations and morphotypes of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Biological Journal of the Linnean Society* **27**, 269-285.
- Hodgson, J.R., Schindler, D.E. & He, X. (1998). Homing tendency of three piscivorous fishes in a north temperate lake. *Transactions of the American Fisheries Society* **127**, 1078-1081.
- Holton, G.D. & Johnson, H.E. (1996). *A field guide to Montana Fishes*. Montana, Fish, Wildlife and Parks, Montana.
- Horrall, R.M. (1981). Behavioral stock-isolating mechanisms in Great Lakes fishes with special reference to homing and site imprinting. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **38**, 1481-1496.
- Howard, R.S. & Lively, C.M. (2002). The ratchet and the red queen: the maintenance of sex in parasites. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 648-656.
- Janko, K., Kotlík, P. & Ráb, P. (2003). Evolutionary history of asexual hybrid loaches (*Cobitis*: Teleostei) inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Journal of Evolutionary Biology* **16**, 1280-1287.

- Jennings, M.J., Claussen, J.E. & Phillip, D.P. (1996). Evidence for heritable preferences for spawning habitat between two walleye populations. *Transactions of the American Fisheries Society* **125**, 978-982.
- Jones, G.P., Milicich, M.J., Emslie, M.J. & Lunow, C. (1999). Self-recruitment in a coral reef fish population. *Nature* **402**, 802-804.
- Kaunda-Arara, B. & Rose, G.A. (2004). Homing and site fidelity in the greasy grouper *Epinephelus tauvina* (Serranidae) within a marine protected area in coastal Kenya. *Marine Ecology Progress Series* **277**, 245-251.
- Knight, M.E., Turner, G.F., Rico, C., van Oppen, M.J.H. & Hewitt G.M. (1998). Microsatellite paternity analysis on captive Lake Malawi Cichlids supports reproductive isolation by direct mate choice. *Molecular Ecology* **7**, 1605-1610.
- Knutsen, H., Jorde, E., André, C. & Stenseth, C.H.R. (2003). Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Molecular Ecology* **12**, 385-394.
- Koskinen, M.T., Haugen T.O. & Primmer C.R. (2002). Contemporary fisherian life-history evolution in small salmonid populations. *Nature* **419**, 826-830.
- Kövér, S. & Szathmáry, E. (1999). Hybrid theories of sex. *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 1032-1033.
- Lamatsch, D.K., Nanda, I., Epplen, J.T., Schmid, M. & Schartl, M. (2000). Unusual triploid males in a microchromosome-carrying clone of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Cytogenetics and Cell Genetics* **91**, 148-156.
- Lande, R. (1976). Natural selection and random genetic drift in phenotypic evolution. *Evolution* **30**, 314-334.

- Langella, O. (1999). *Population 1.2.28*. Population genetic structure (individual or population distances, phylogenetic trees).
- Leggett, W.C. (1977). The ecology of fish migrations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **8**, 285-308.
- Leider S.A., Chilcote, M.W. & Loch, J.J. (1984). Spawning characteristics of sympatric populations of Steelhead Trout (*Salmo gairdneri*): Evidence for partial reproductive isolation. *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Science* **41**, 1454-1462.
- Lloyd, D.G. (1980). Benefits and handicaps of sexual reproduction. *Evolutionary Biology* **13**, 69-111.
- Lundy, C.J., Moran, P., Rico, C., Milner, R.S. & Hewitt, G.M. (1999). Macrogeographical population differentiation in oceanic environments: a case study of European hake (*Merluccius merluccius*), a commercially important fish. *Molecular Ecology* **8**, 1889-1898.
- Lynch, M. (1990). The rate of morphological evolution in mammals from the standpoint of the neutral expectation. *American Naturalist* **136**, 727-741.
- Magnin, E., Fradette, C. & Burdin, R. (1976). Bio-écologie des *Phoxinus eos x neogaeus* du lac Triton dans les Laurentides, Québec. *Naturaliste Canadien* **103**, 11-19.
- Marnane, M.J. (2000). Site fidelity and homing behaviour in coral reef cardinalfishes. *Journal of Fish Biology* **57**, 1590-1600.
- Maynard Smith, J. (1978). *The Evolution of sex*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.

- Mayr, E. (1963). *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 797 pp.
- McIsaac, D.O. & Quinn, T.P. (1988). Evidence for a hereditary component in homing behavior of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **45**, 2201-2205.
- McPhail, J.D. (1994). Speciation and the evolution of reproductive isolation in the sticklebacks (*Gasterosteus*) of south-western British Columbia. In *The Evolutionary Biology of the Threespine Stickleback* (Bell, M.A. & Foster, S.A. eds), pp. 399-437. Oxford University Press, Oxford.
- McQuinn, I.H. (1997). Metapopulations and the Atlantic herring. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**, 297-329.
- McVeigh, H.P., Hynes, R.A. & Ferguson, A. (1995). Mitochondrial DNA differentiation of sympatric populations of brown trout, *Salmo trutta* L., from Lough Melvin, Ireland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**, 1617-1622.
- Melvin, G.D., Dadswell, M.J. & Martin, J.D. (1986). Fidelity of American shad, *Alosa sapidissima* (Clupeidae), to its river of previous spawning. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **43**, 640-646.
- Miller, L.M., Kallemeyn, L. & Senanan, W. (2001). Spawning-site fidelity and natal-site fidelity by Northern pike in a large lake: Mark-recapture and genetic evidence. *Transactions of the American Fisheries Society* **130**, 307-316.
- Moring, J.R. (2001). Appearance and possible homing of two species of sculpins in Maine tidepools. *Northeastern Naturalist* **8**, 207-218.

- Naud, M. & Magnan, P. (1988). Diel onshore-offshore migration in northern redbelly dace, *Phoxinus eos* (Cope), in relation to prey distribution in a small oligotrophic lake. *Canadian Journal of Zoology* **66**, 1249-1253.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Orr, M.R. & Smith, T.B. (1998). Ecology and speciation. *Tree* **13**, 502-506.
- Paetkau, D., Waits, L.P., Clarkson, P.L., Craighead, L. & Strobeck, C. (1997). An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics*, **147**, 1943-1957.
- Palumbi, S.R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecological Systems* **25**, 547-572.
- Palumbi, S.R. (2004). Marine reserves and ocean neighborhoods: The spatial scale of marine populations and their management. *Annual Review of Environment and Resources* **29**, 31-68.
- Papi, F. (1992). *Animal homing*. Chapman and Hall, London.
- Potthoff, M.T. & Allen, D.M. (2003). Site fidelity, home range and tidal migrations of juvenile pinfish, *Lagodon rhomboides*, in salt marsh creeks. *Environmental Biology of Fishes* **67**, 231-240.
- Quinn, T.P. (1980). Evidence for celestial and magnetic compass orientation in lake migrating sockeye salmon fry. *Journal of Comparative Physiology* **137**, 243-248.
- Quinn, T.P. (1990). Current controversies in the study of salmon homing. *Ethology, Ecology, Evolution* **2**, 49-63.

- Quinn, T.P. (1993). A review of homing and straying of wild and hatchery-produced salmon. *Fisheries Research* **18**, 29-44.
- Quinn, T.P. & Brannon, E.L. (1982). The use of celestial and magnetical cues by orienting sockeye salmon smolts. *Journal of Comparative Physiology* **147**, 547-552.
- Quinn, T.P. & Brodeur, R.D. (1991). Intra-specific variations in the movement patterns of marine animals. *American Zoologist* **31**, 231-241.
- Quinn, T.P. & Dittman, A.H. (1992). Fishes. In *Animal homing* (Papi, F. ed.), pp.145-211. London: Chapman et Hall.
- Quinn, T.P., Hendry, A.P. & Wetzel, L.A. (1995). The influence of life history trade-offs and the size of incubation gravels on egg size variation in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Oikos* **74**, 425-438.
- Quinn, T.P., Volk, E.C. & Hendry, A.P. (1999). Natural otolith microstructure patterns reveal precise homing to natal incubation sites by sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal Zoology* **77**, 766-775.
- Rash, M.E. & Balsano, S.J. (1989). Trihybrids related to the unisexual Molly fish, *Poecilia formosa*. In: *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* (Dawley, R.M. & Bogart, J.P., eds.), pp. 252-267. New York State Museum, New York.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). Genepop: Population genetics software for exact test and ecumenism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Ricker, W.E. (1972). Hereditary and environmental factors affecting certain salmonid populations. In *The stock concept in pacific salmon* (Simon, R.C. & Larkin, P.A. eds.), pp.19-160. Vancouver: MacMillan lectures in fisheries.

- Rico, C. & Turner, G.F. (2002). Extreme microallopatric divergence in a cichlid species from Lake Malawi. *Molecular Ecology* **11**, 1585-1590.
- Riddell, B.E. & Leggett, W.C. (1981). Evidence of an adaptive basis for geographic variation in body morphology and time of downstream migration of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **38**, 308-320.
- Rogers, D.E. (1987). The regulation of age at maturity in Wood River sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Special Publications of Fisheries and Aquatic Science* no.96, 78-89.
- Ryan, M.J., Dries, L.A., Batra, P. & Hillis, D.M. (1996). Male mate preferences in a gynogenetic species complex. *Animal behaviour* **52**, 1225-1236.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Sale, P.F. (1978). Reef fishes and other vertebrates: A comparison of social structures. In *Contrasts in Behavior: Adaptations in the Aquatic and Terrestrial Environments* (Reese, E.S. & Lichter, F.J., eds.), pp. 313-346. New York: Wiley.
- Sale, P.F. (1991). Introduction. In *The Ecology of fishes on coral reefs* (Sale, P.F., ed.), pp. 3-15. San Diego: Academic Press.
- Sanbrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edn*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Scheer, B.T. (1939). The homing instinct in salmon. *Quarterly Review of Biology* **14**, 408-430.

- Schenck, R.A. & Vrijenhoek, R.C. (1986). Spatial and temporal factors affecting coexistence among sexual and clonal forms of *Poeciliopsis*. *Evolution* **40**, 1060-1070.
- Schlosser, I.J., Doeringsfeld, M.R., Elder, J.F. & Arzayus, L.F. (1998). Niche relationship of clonal and sexual fish in a heterogeneous landscape. *Ecology* **79**, 953-968.
- Schlupp, I. (2005). The evolutionary ecology of gynogenesis. *The Annuals review of Ecology, Evolution and Systematics* **36**, 399-417.
- Schlupp, I., Marler, C. & Ryan, M.J. (1994). Benefit to male sailfin mollies of mating with heterospecific females. *Science* **263**, 373-374.
- Schlupp, I., Parzefall, J. & Scharl, M. (1991). Male mate choice in mixed bisexual/unisexual breeding complexes in *Poecilia* (Teleostei: Poeciliidae). *Ethology* **88**, 215-222.
- Schluter, D. (1996). Ecological causes of adaptive radiation. *American Naturalist* **148**, S40-S64.
- Schluter, D. (1996). Ecological speciation in postglacial fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **351**, 807-814.
- Schneider, S., Kueffer, J.-M., Roessli, D. & Excoffier, L. (1997). *ARLEQUIN Version 1.0: an Exploratory Population Genetics Software Environment*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Schultz, R.J. & Kallman, K.D. (1968). Triploids hybrids between the all-female teleost *Poecilia formosa* and *Poecilia sphenops*. *Nature* **219**, 280-282.
- Scott, W.B. & Crossman, E.J. (1973). Freshwater fishes of Canada. Ottawa: *Bulletin Fisheries Research Board of Canada* 184.

- Slatkin, M. (1981). Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics* **99**, 323-335.
- Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* **39**, 53-65.
- Stabell, O.B. (1984). Homing of Atlantic salmon in relation to olfaction and genetics. *Saumons* **51**, 21-25.
- Stewart, I.J., Quinn, T.P. & Bentzen, P. (2003). Evidence for fine-scale natal homing among island beach spawning sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Environmental Biology of Fishes* **67**, 77-85.
- Svärdson, G. (1979). Speciation of Scandinavian *Coregonus*. *Report of the institute of Freshwater Research Drottningholm* **57**, 3-95.
- Swearer S.E., Caselle, J.E., Lea, D.W. & Warner, R.R. (1999). Larval retention and recruitment in an island population of a coral-reef fish. *Nature* **402**, 799-802.
- Switzer, P.V. (1993). Site fidelity in predictable and unpredictable habitats. *Evolutionary Ecology* **7**, 533-555.
- Tallman, R.F. (1986). Genetic differentiation among seasonally distinct spawning populations of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Aquaculture* **57**, 211-217.
- Tallman, R.F. & Healey, M.C. (1994). Homing, straying and gene flow among seasonally separated population of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Canadian Journal of fisheries and Aquatic Science* **51**, 577-588.
- Taylor, E.B. (1991). A review of local adaptation in *Salmonidae*, with particular reference to Pacific and Atlantic salmon. *Aquaculture* **98**, 185-207.
- Taylor, E.B. & Bentzen, P. (1993). Evidence for multiple origins and sympatric divergence of trophic ecotypes of smelt (*Osmerus*) in Northeastern North America. *Evolution* **47**, 813-832.

- Taylor, E.B., Harvey, S., Pollard, S. & Volpe, J. (1997). Postglacial genetic differentiation of reproductive ecotypes of kokanee *Oncorhynchus nerka* in Okanagan Lake, British Columbia. *Molecular Ecology* **6**, 503-517.
- Taylor, E.B. & McPhail, J.D. (1985). Variation in body morphology among British Columbia populations of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **42**, 2020-2028.
- Thibault, R.E. (1974). The ecology of unisexual and bisexual fishes of the genus *Poeciliopsis*: A case study in niche relationship. Ph.D. Diss. Univ. Connecticut, Storrs.
- Tessier, N., Bernatchez, L. & Wright, J.M. (1997). Population structure and impact of supportive breeding inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in land-locked Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Molecular Ecology* **6**, 735-750.
- Thorrold, S.R., Latkoczy, C., Swart, P.K. & Jones, C.M. (2000). Natal homing in a marine fish metapopulation. *Science* **291**, 227-229.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P.M. (2003). *Micro-checker version 2.2.3*. Department of Biological Sciences and Department of Computer Science, University of Hull.
- Varnavskaya N.V., Wood, C.C., Wilmot, R.L., Everett, R.J., Varnavsky V.S., Midanaya V.V. & Quinn, T.P. (1994). Genetic differentiation of subpopulations of Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) within lakes of Alaska, British Columbia, and Kamchatka, Russia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **51**, 147-157.

- Vasil'ev V.P., Vasil'ev K.D. & Osinov A.G. (1986). Evolution of a diploid-triploid-tetraploid complex in fishes of the genus *Cobitis* (Pisces, Cobitidae). In: *Evolution and Ecology of unisexual vertebrates* (Dawley, R.M. & Bogart, P.J., eds.), pp. 153-169. New York State Museum, New York.
- Vespoor, E., Fraser, N.H.C. & Youngson, A.F. (1991). Protein polymorphism in Atlantic salmon within a Scottish river: evidence for selection and estimates of gene flow between tributaries. *Aquaculture* **98**, 217-230.
- Vrijenhoek, R.C. (1978). Coexistence of clones in a heterogeneous environment. *Science* **199**, 549-552.
- Vrijenhoek, R.C. (1979). Factors affecting clonal diversity and coexistence. *American Zoologist* **19**, 787-797.
- Vrijenhoek, R.C. (1984a). Ecological differentiation among clones: The frozen niche variation model. In: *Population Biology and Evolution* (Wohrman, K. & Loeschke, V., eds.) pp. 217-231. Springer-Verlag, Berlin, W. Ger.
- Vrijenhoek, R.C. (1984b). The evolution of clonal diversity in *Poeciliopsis*. In: *Evolutionary Genetics of Fishes* (Turner, B.J., ed.) pp. 399-429. Plenum, N.Y.
- Vrijenhoek, R.C. (1989). Genotypic diversity and coexistence among sexual and clonal forms of *Poeciliopsis*. In *Speciation and its consequence* (Otte, D. & Endler, J., eds), pp. 386-400. Sinauer, Sunderland, M.A.
- Vrijenhoek, R.C. (1994). Unisexual fish: model systems for studying ecology and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**, 71-96.
- Waples, R.S. (1998). Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity* **89**, 438-450.

- Ward, R.D., Woodward, M. & Skibinski, D.O.F. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology* **44**, 213-232.
- Warner, R.R. (1995). Large mating aggregations and daily long-distance spawning migrations in the bluehead wrasse, *Thalassoma bifasciatum*. *Environmental Biology of Fishes* **44**, 337-345.
- Waters, J.M., Epifanio, J.M., Gunter, T. & Brown, B.L. (2000). Homing behaviour facilitates subtle genetic differentiation among river populations of *Alosa sapidissima*: microsatellites and mtDNA. *Journal of Fish Biology* **56**, 622-636.
- West, S.A., Lively, C.M. and Read, A.F. (1999). A pluralist approach to sex and recombination. *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 1003-1012.
- Williams, G.C. (1975). *Sex and Evolution*. Princeton Univ. Press, Princeton.
- Winker, K., Graves, G.R. & Braun, M.J. (2000). Genetic differentiation among populations of a migratory songbird: *Limnothlypis swainsonii*. *Journal of Avian Biology* **31**, 319-328.
- Wright, S. (1931). Evolution in mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.
- Wright, S. (1951). The genetic structure of populations. *Annals of Eugenism* **15**, 323-353.
- Yue, G.H., Li, Y., Lim, L.C., Orban, L. (2004). Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. *Aquaculture* **237**, 89-102.
- Zink, R.M. (1988). The genetic structure of avian populations. *Acta Congressus Internationalis Ornithologici* **19**, 1665-1668.

