

Université de Montréal

**Variation de l'épigénome, du phénotype et des stratégies
écologiques pour la persistance d'un vertébré asexué**

par
Christelle Leung

Département de sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor* (Ph. D.)
en sciences biologiques

Novembre, 2016

© Christelle Leung, 2016

Résumé

La capacité à répondre aux changements environnementaux est cruciale pour l'établissement et la persistance des populations dans un système hétérogène. Les processus sous-jacents à cette capacité peuvent prendre différentes formes. La grande diversité génétique (et phénotypique) découlant de la reproduction sexuée est un des processus permettant à une population de répondre aux différentes conditions environnementales par la survie d'au moins quelques individus. D'autre part, les processus épigénétiques, en permettant la modification du patron d'expression des gènes, contribuent également à la variation phénotypique. Ces variations peuvent survenir accidentellement (épimutations) ou en réponse à un stimulus environnemental (plasticité). Les processus épigénétiques représenteraient ainsi une alternative à la variation génétique pouvant expliquer le succès écologique des organismes génétiquement identiques. Toutefois, les génotypes ne répondent pas tous de la même façon aux conditions environnementales ; certains génotypes sont considérés comme généralistes et peuvent s'acclimater à une vaste gamme de conditions environnementales alors que d'autres sont plutôt spécialistes et restreints à un type d'environnement donné.

L'objectif général de cette thèse est de mettre en évidence certains des processus responsables de la persistance des organismes asexués en déterminant les relations entre la variation épigénétique, la variation phénotypique et les stratégies écologiques. Pour ce faire, des hybrides asexués *Chrosomus eos-neogaeus*, un poisson à reproduction clonale, ont servi de modèle biologique. Se reproduisant par gynogenèse, les lignées clonales (génotypes) doivent faire face aux mêmes variations environnementales que les espèces parentales sexuées. De plus, la répartition géographique de chacune des lignées suggère la présence de génotypes généralistes et spécialistes. L'analyse de ces lignées en milieux naturels et en milieux contrôlés a permis de décortiquer l'influence des variations génétique, environnementale et épigénétique sur la variation phénotypique.

Dans un premier temps, les modèles de stratégies généraliste et spécialiste ont été testés de manière empirique : (i) des analyses génétiques ont permis d'inférer les processus historiques expliquant la diversité et la répartition actuelle des lignées clonales ; (ii) l'analyse du patron de

méthylation de différentes lignées a permis de déterminer l'importance relative des sources de variations épigénétiques selon les fluctuations environnementales et de les associer à une stratégie écologique : une importante influence de l'environnement ou une plus grande stochasticité dans l'établissement des marques épigénétiques étant associées à la plasticité phénotypique ou au *bet-hedging*, respectivement ; et (iii) le rôle de la plasticité phénotypique dans la diversification de niches écologiques a été souligné par la comparaison de la variation de la morphologie trophique en milieux naturels et contrôlés. D'autre part, le second volet de cette thèse a permis d'associer un coût (détection d'une instabilité développementale) à la plasticité phénotypique et d'élaborer une hypothèse sur l'existence d'un handicap démographique nécessaire afin d'expliquer la situation contre-intuitive concernant la coexistence des organismes gynogènes et de leurs hôtes sexués.

La compréhension des différents mécanismes sous-jacents au succès écologique des organismes face aux variations environnementales permet ainsi une meilleure évaluation de leur potentiel évolutif et fournit des outils supplémentaires pour leur protection face à un environnement changeant.

Mots-clés : *Bet-hedging*, *Chrosomus eos-neogaeus*, épigénétique, gynogenèse, hybridation, instabilité développementale, modèle FNV, modèle GPG, morphométrie géométrique, niches écologiques, plasticité phénotypique

Abstract

The capacity to cope with environmental changes is crucial to the establishment and persistence of populations. The processes underlying such a capacity can take different forms. The high genetic (and phenotypic) diversity arising from sexual reproduction is one process that allows to cope with different environmental conditions through the survival of at least a few individuals. On the other hand, epigenetic processes, allowing the modification of gene expression, are also responsible for phenotypic variation. Epigenetic changes may occur accidentally (epimutations) or in response to an environmental stimulus (plasticity). Thus, epigenetics would represent an alternative process to genetic variation to explain the ecological success of genetically identical organisms. However, genotypes are not equally capable of coping with environmental changes. Some genotypes are generalists and can acclimatize to a wide range of environmental conditions, whereas other genotypes are specialized and restricted to narrow environmental conditions.

The general objective of this thesis is to highlight the processes responsible for the persistence of asexual organisms by determining the relationship between epigenetic processes, phenotypic variation and ecological strategies. To achieve this, the clonal hybrid fish *Chrosomus eos-neogaeus* were used as a biological model. By reproducing by gynogenesis, the clonal lineages (genotypes) are distributed among the same environments than the sexual parental species. Moreover, the geographical distribution of the lineages suggests the presence of generalist and specialist genotypes. The analysis of these lineages in natural and controlled conditions allowed to disentangling the influence of genetic, environmental and epigenetic variations on phenotypic variation.

On the one hand, generalist and specialist strategies were empirically tested: (i) genetic analyses were used to infer the historical processes explaining the diversity and the current distribution of the clonal lineages; (ii) the comparison of methylation patterns in different lineages allowed to determine the dynamism of the epigenetic processes according to environmental fluctuations and to associate them with an ecological strategy: an important environmental or stochastic effect on epigenetic variation being associated with phenotypic

plasticity or bet-hedging, respectively; and (iii) the role of phenotypic plasticity in niches diversification was highlighted by comparing individuals' trophic morphology in natural and controlled conditions. On the other hand, the second part of this thesis has allowed to associate a cost (developmental instability) to phenotypic plasticity and to propose a hypothesis about the existence of a demographic handicap necessary to explain the paradox regarding the coexistence of sexual and asexual sperm-dependent organisms.

Understanding these different mechanisms underlying the ecological success of organisms in face of environmental heterogeneity allows us to better establish their evolutionary potential and provides additional tools to protect them against changing environments.

Keywords: Bet-hedging, *Chrosomus eos-neogaeus*, developmental instability, ecological niches, epigenetics, FNV model, GPG model, geometric morphometrics, gynogenesis, hybridization, phenotypic plasticity

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des sigles et des abréviations.....	xiv
Remerciements	xvii
Chapitre 1 : INTRODUCTION	1
1.1. Persistance des organismes vivants.....	1
1.1.1. Fluctuations et hétérogénéités environnementales	1
1.1.2. Importance de la variabilité phénotypique	1
1.2. Phénotypique et génétique	2
1.2.1. Les forces évolutives	2
1.2.2. La reproduction sexuée.....	3
1.3. Phénotypique et épigénétique	4
1.3.1. Les processus épigénétiques.....	4
1.3.2. Les sources de variation épigénétique	5
Les signaux environnementaux	5
Stochasticité des marques épigénétiques	7
1.4. Phénotypique et environnement.....	8
1.4.1. Fréquences des variations environnementales.....	8
1.4.2. Adaptation locale.....	10
1.4.3. Plasticité phénotypique.....	11
1.4.4. Les stratégies de minimisation des risques.....	12
1.5. Facteurs responsables du succès écologique des organismes asexués.....	14
1.5.1. La variation phénotypique des organismes asexués.....	14
1.5.2. Les modèles écologiques	15
Le modèle GPG (<i>General Purpose Genotype</i>).....	15

Le modèle FNV (<i>Frozen Niche Variation</i>).....	16
1.5.3. Les organismes hybrides	17
L'hybridation	17
L'incompatibilité d'hybridation.....	18
La supériorité hybride	19
Perpétuation de la génération F1	20
1.6. Paradoxe de coexistence des organismes sexués et asexués.....	20
1.6.1. Les coûts associés aux modes de reproduction	20
1.6.2. La gynogenèse	21
1.7. Objectifs et hypothèses	22
1) Quel rôle joue la variation épigénétique dans les différentes stratégies écologiques ?.....	22
2) Quel est le rôle de la plasticité phénotypique dans le succès écologique des organismes asexués ?	23
3) Quels sont les facteurs limitant le succès écologique des organismes asexués ?.....	24
1.8. Le modèle biologique.....	25
1.8.1. <i>Chrosomus eos-neogaeus</i> , un hybride asexué	25
1.8.2. Répartition géographique	26
1.8.3. Diversité phénotypique et niches écologiques.....	26
1.8.4. Diversité épigénétique	27
1.9. Structure de la thèse	28
Chapitre 2 : ORIGINE ET RÉPARTITION DES LIGNÉES CLONALES	30
2.1. Résumé et contributions.....	30
2.2. Abstract	31
2.3. Background	32
2.4. Methods.....	35
2.4.1. Sampling and identification.....	35
2.4.2. Analysis of hybrid lineages	36
2.4.3. Analysis of parental species	38

2.4.4. Assignment of the hybrid lineages	39
2.5. Results	39
2.5.1. Distribution of biotypes	39
2.5.2. Diversity of hybrid lineages	40
2.5.3. Characterization of <i>Chrosomus eos</i> populations	44
2.5.4. Assignment of hybrid lineages to <i>Chrosomus eos</i> populations.....	46
2.6. Discussion	48
2.6.1. Uniform distribution of <i>Chrosomus eos</i>	48
2.6.2. Contrasting patterns in hybrid diversity	48
2.6.3. Diversity and landscape elements.....	50
2.6.4. Demographic decline of <i>Chrosomus neogaeus</i>	51
2.7. Conclusion	51
2.8. Acknowledgments.....	52
2.9. Additional Tables	53
Chapitre 3 : VARIATION ÉPIGÉNÉTIQUE ET CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES.....	66
3.1. Résumé et contributions.....	66
3.2. Abstract	67
3.3. Introduction.....	67
3.4. Materials and Methods	71
3.4.1. Ethics statement.....	71
3.4.2. Biological model, sampling and genetic identification	71
3.4.3. Common garden experiments.....	72
3.4.4. Methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) analysis	72
3.4.5. Statistical analyses.....	74
3.5. Results	76
3.5.1. Epigenetic diversity in natural populations	76
3.5.2. Common garden experiments.....	79
3.6. Discussion	82
3.6.1. Epigenetics, genetics and environment	83
3.6.2. Epigenetics, plasticity and bet-hedging.....	84

3.6.3. Two sides of the same coin?.....	85
3.7. Conclusion	86
3.8. Acknowledgements.....	86
3.9. Supporting Information.....	87
Chapitre 4 : PLASTICITÉ PHÉNOTYPIQUE ET NICHES ÉCOLOGIQUES.....	90
4.1. Résumé et contributions.....	90
4.2. Abstract	91
4.3. Introduction.....	91
4.4. Materials and Methods.....	94
4.4.1. Study system.....	94
4.4.2. Sampling and genetic identification	95
4.4.3. Common garden experiments.....	97
4.4.4. Morphological measurement.....	97
4.4.5. Statistical analyses.....	98
4.5. Results.....	100
4.5.1. Measurement error.....	100
4.5.2. Common garden experiments.....	100
4.5.3. <i>C. eos</i> and hybrids in natural conditions.....	102
4.5.4. <i>C. eos</i> and hybrids in sympatry	104
4.5.5. Intra-site variation.....	105
4.6. Discussion.....	107
4.6.1. Sources of phenotypic variation	108
4.6.2. Distribution of morphological variation in natural populations.....	108
4.6.3. Coexistence of sexual and asexual forms.....	109
4.7. Conclusion	111
4.8. Acknowledgments.....	111
Chapitre 5 : COÛT DE LA PLASTICITÉ PHÉNOTYPIQUE	112
5.1. Résumé et contributions.....	112
5.2. Abstract	113
5.3. Introduction.....	114

5.4. Material and Methods	117
5.4.1. Specimen sampling and identification.....	117
5.4.2. Micro-CT scan.....	118
5.4.3. Counting pharyngeal teeth.....	119
5.4.4. Shape of pharyngeal arches	120
5.4.5. Statistical analyses	121
5.5. Results.....	122
5.5.1. Variation in dental formulae.....	122
5.5.2. Variation in shape of the pharyngeal arches.....	125
5.6. Discussion	130
5.6.1. Plasticity of the pharyngeal jaw apparatus	131
5.6.2. Asymmetry in the shape of pharyngeal arches.....	131
5.6.3. A threshold character.....	133
5.7. Conclusion	134
Chapitre 6 : HANDICAP DÉMOGRAPHIQUE	135
6.1. Résumé et contributions.....	135
6.2. Abstract	135
6.3. Introduction.....	136
6.4. Results and Discussion.....	137
6.5. Methods.....	140
6.6. Supplementary Figures.....	142
Chapitre 7 : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	144
7.1. Intérêts écologiques et évolutifs des processus épigénétiques.....	144
7.1.1. Sources de variation épigénétique	144
7.1.2. Rôle de la variation épigénétique dans les stratégies écologiques	146
7.1.3. Deux stratégies non mutuellement exclusives.....	147
7.2. Importances écologiques et évolutives de la plasticité phénotypique.....	150
7.2.1. Diversification des niches écologiques	150
7.2.2. Limites de la plasticité phénotypique	151
7.2.3. Prélude à l'adaptation	152

7.3. Succès écologique des organismes asexués	153
7.3.1. Importance de la diversité génétique	154
7.3.2. Handicaps des gynogènes	156
7.4. Perspectives	157
7.4.1. Épigénétique et conservation	157
7.4.2. Évolution de la plasticité phénotypique	158
7.5. Conclusion	160
Bibliographie	xix

Liste des tableaux

Table 2.1.	Genetic diversity in hybrid <i>Chrosomus eos-neogaeus</i> and in the sexual species <i>Chrosomus eos</i> between West-Qc and East-Qc regions.....	44
Table 2.2.	Results of the assignment of hybrid lineages to the <i>Chrosomus eos</i> populations.	47
Table 2.S1.	Characteristics of the different sampled sites.	53
Table 2.S2.	Multiloci genotype of the parental species <i>C. eos</i> individuals.	57
Table 2.S3.	Consensus nuclear genotype and mitochondrial haplotype of the different lineages.	64
Table 3.1.	Epigenetic and genetic intra-site variation for each lineage.....	73
Table 3.S1.	Partition of epigenetic variation.	87
Table 3.S2.	Physico-chemical parameters of natural environments.	89
Table 4.1.	Characteristics of sampled sites in natural conditions.....	96
Table 5.1.	Characteristics of the individuals analysed in this study.....	118
Table 5.2.	Dental formulae of the different hybrid lineages.....	124
Table 5.3.	Statistical assessment of shape differences among biotypes for the left and right sides of pharyngeal arch.....	127
Table 5.4.	Analysis of shape asymmetry.	129

Liste des figures

Figure 1.1.	Patrons des variations environnementales en fonction des générations, de la production d'un phénotype et de sa sélection.....	9
Figure 1.2.	Mécanisme conduisant à la formation naturelle des hybrides asexués <i>Chrosomus eos-neogaeus</i>	25
Figure 2.1.	Distribution of individuals from <i>C. eos-neogaeus</i> complex.....	35
Figure 2.2.	Relationships among hybrid lineages.	41
Figure 2.3.	Lineages richness of West-Qc and East-Qc.	42
Figure 2.4.	Mantel correlograms of the distribution of the hybrid lineages and <i>C. eos</i> ..	43
Figure 2.5.	Results of principal component analysis of <i>C. eos</i> population genetics.....	45
Figure 3.1.	Model species <i>Chrosomus eos-neogaeus</i> and study sites.....	70
Figure 3.2.	Epigenetic variation in natural populations.	77
Figure 3.3.	Relationship between genetic and epigenetic distances.	78
Figure 3.4.	Variation of the environmental conditions in natural sites.	79
Figure 3.5.	Epigenetic variation in controlled conditions.	80
Figure 4.1.	Schematic positions of the eight landmarks.	98
Figure 4.2.	Morphological variation within common garden.	101
Figure 4.3.	Morphological changes due to the transfer from natural to controlled conditions.	102
Figure 4.4.	Shape variation of individuals from natural populations.	103
Figure 4.5.	Proportion of shape variation explained by sampled sites.	105
Figure 4.6.	Intra-site shape variation in sympatric localities.	106
Figure 4.7.	Effect of homogeneous environment on intra-site shape variation.	107
Figure 5.1.	Pharyngeal arches of parental species and hybrids.	121
Figure 5.2.	Basal and alternative dental formulae in <i>Chrosomus eos</i> , <i>C. neogaeus</i> and hybrids.	123
Figure 5.3.	Variation in dental formulae in <i>C. eos</i> and hybrid lineage B-01 among sites.	125

Figure 5.4.	Disparity on shape of pharyngeal arches among the parental species and hybrids.	126
Figure 5.5.	Left-right asymmetry in shape for hybrids.	130
Figure 5.6.	Schematic representation of the hypothetical processes occurring during the development of the pharyngeal arches in clonal hybrids.	134
Figure 6.1.	Simulations of population's growth in coexisting sexual and asexual organisms under three different scenarios.	138
Figure 6.S1.	Effect of different proportion of sterile asexual individuals on the evolution and persistence of a gynogenetic system.	142
Figure 6.S2.	Effect of different initial proportion of asexual individuals on the persistence of sexual (red) and asexual (black) populations.	143
Figure 7.1.	Schématisation des facteurs influençant la production d'un phénotype.....	145
Figure 7.2.	Relation entre la variation épigénétique, la variation phénotypique et les stratégies écologiques.	148

Liste des sigles et des abréviations

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
2D	2 dimensions
3D	3 dimensions
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMOVA	Hierarchical Analyses of Molecular Variance
ANOVA	Analysis of variance
bp	Base pair / Paire de bases
cm	Centimètre
COI	Cytochrome Oxidase I
CpG	Cytosine et Guanine séparées par un groupement phosphate
D	Indice de diversité de Simpson
DA	Symétrie Directionnelle / <i>Directional Asymmetry</i>
D _{CE}	Distance génétique de Cavalli-Sforza et Edward
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (par exemple)
F ₁	Première génération / <i>First filial generation</i>
FA	Asymétrie Fluctuante / <i>Fluctuating Asymmetry</i>
F _{CT}	Indice de variation génétique entre groupes
FNV	<i>Frozen Niche Variation</i>
FRQNT	Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies
F _{ST} / ρ_{ST}	Indice de diversité inter-population
GPA	<i>Generalised Procrustes Analysis</i>
GPG	<i>General Purpose Genotype</i>
GRIL	Groupe de recherche interuniversitaire en limnologie et en environnement aquatique
H _E	Hétérozygotie attendue
H _S	Hétérozygotie attendue moyen / <i>Nei's genetic diversity</i>

HSD	<i>Honest Significant Difference</i>
HW	Hardy-Weinberg
<i>i.e.</i>	<i>Id est (c'est-à-dire)</i>
k	Nombre d'allèles
Km	Kilomètre
Km ²	Kilomètre carré
LCBD	Local Contribution to Beta diversity
L-R	Left-Right
mg/L	Milligramme par litre
micro-CT	Microcomputed tomography
MRNF	<i>Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune / Quebec Ministry of Natural Resources and Wildlife</i>
MSAP	<i>Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NJ	<i>Neighbour joining</i>
NSERC	<i>Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada</i>
<i>P</i>	Probabilité
PCA	Analyse en composante principale / <i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPS	<i>Phylogenetic parsimony score</i>
RDA	Analyse de redondance / <i>Redundancy analysis</i>
S	Siemens
SMM	<i>Stepwise mutation model</i>
v.	Version
vs	<i>versus</i>

*À la mémoire de mon papa
qui m'a transmis le plaisir d'apprendre*

*À ma maman
qui m'a enseigné la patience*

Remerciements

Je tiens avant tout à adresser mes plus sincères remerciements à Bernard Angers, mon directeur de recherche, pour m'avoir proposé de « jouer avec les *Phox* », ainsi qu'à Sophie Breton, ma codirectrice, qui a accepté sans hésiter une seconde à « jouer » avec nous. J'aimerais vous remercier pour vos conseils judicieux, votre encadrement continu, votre disponibilité constante, vos encouragements inégalables et la confiance que vous m'avez accordée pour la réalisation de ce projet. Merci de m'avoir donné la liberté d'exprimer et de réaliser mes idées, mais toujours en veillant à ce que je ne m'égarais pas trop. Vous avez également partagé vos connaissances, votre optimisme, votre enthousiasme et votre passion, faisant de ces 4 dernières années une période inoubliable. Bernard, Sophie, un énorme MERCI !

Nombreuses sont les personnes ayant contribué au bon déroulement de ce projet. Je remercie les membres de mon comité-conseil, de mon examen de synthèse et du jury d'évaluation de la thèse pour leurs conseils et commentaires judicieux : Roxanne Maranger, Simon Joly, Dany Garant, David Morse, Julie Turgeon et Jacques Brodeur. De nombreuses personnes ont côtoyé le laboratoire autrefois dénommé le laboratoire de Populations, Génétique et Évolution Moléculaire, et maintenant le laboratoire d'Épigénétique des Populations Naturelles. J'aimerais remercier les collègues qui ont partagé, sans retenue, leurs expériences et connaissances de laboratoire et d'analyses. J'ai beaucoup apprécié vos conseils avisés.

Finalement, j'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance à ma famille, mes amis, mes amours. Il n'a pas été facile de faire face à un changement environnemental brusque entre *fomba gasy sy fiainana mora mora* et les hivers au Québec. Beaucoup ont fait le même voyage que moi, certains m'ont accueillie ici et d'autres ont été géographiquement loin. Sans vraiment comprendre ce que je faisais avec des petits poissons, vous m'avez toujours encouragée. Sans trop comprendre mes « coutumes », vous m'avez tolérée, acceptée, aimée et intégrée à un nouveau mode de vie. Vous avez été présents dans les bons moments et égayé les plus sombres. J'aimerais vous remercier sincèrement d'avoir facilité mon acclimatation à ce nouvel environnement. Si aujourd'hui, je finis ce doctorat, c'est bien grâce à vous ! *Misaotra betsaka* ! Merci beaucoup !

Ce projet de recherche a été financé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada. J'ai été financée par les bourses du FRQNT (Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies), de la FESP (Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales), du Département de sciences biologiques, ainsi que des bourses de voyage du GRIL (Groupe de Recherche Interuniversitaire en Limnologie et en environnement aquatique) et de la SCZ (Société Canadienne de Zoologie).

Chapitre 1 :

INTRODUCTION

1.1. Persistance des organismes vivants

1.1.1. Fluctuations et hétérogénéités environnementales

Les organismes vivants sont continuellement confrontés à un environnement hétérogène, à la fois dans le temps et dans l'espace. L'hypothèse de la Reine rouge (Van Valen 1973, 1977) illustre bien ce dynamisme : tout changement de caractères afin d'améliorer la valeur adaptative d'un organisme donné entraîne une modification de l'écologie des organismes qui l'entourent, obligeant par conséquent ces derniers à s'y ajuster. Réciproquement, ces nouveaux ajustements occasionnent à leur tour un changement dans l'écologie du premier organisme, impliquant ainsi une nouvelle pression de sélection et un autre épisode d'ajustement, et ainsi de suite. Ces changements environnementaux se retrouvent tant aux niveaux biotiques (*e.g.* ressources alimentaires, parasitisme, prédation, compétitions intra- et inter- spécifiques) qu'abiotiques (*e.g.* température, humidité, climat) et entraînent des pressions de sélection fluctuantes vis-à-vis des individus. La capacité des organismes vivants à répondre à une telle hétérogénéité des conditions environnementales est par conséquent cruciale pour leur établissement et leur persistance.

1.1.2. Importance de la variabilité phénotypique

Dans un environnement donné, la survie d'un individu dépend étroitement de son phénotype défini par l'ensemble de traits observables (morphologie, physiologie, comportement, *etc.*). La sélection naturelle permet de filtrer les individus les plus compétitifs par l'élimination des moins performants. Une diversité au niveau du phénotype augmente ainsi la probabilité que certains individus au sein d'une population possèdent un phénotype permettant leur survie et leur reproduction dans un nouvel environnement. Au début de l'industrialisation, par exemple, d'importantes quantités de suie issue de la combustion du charbon ont contribué à un

changement environnemental majeur dans le sud de l'Angleterre : les troncs des bouleaux se sont noircis. De ce fait, les phalènes du bouleau *Biston betularia* non cryptiques (forme *typica*, claire) avaient une plus grande probabilité de prédation. La proportion des individus présentant le morphe mélanique (forme *carbonaria*, foncée) a ainsi augmentée face au nouvel environnement présenté par la coloration des troncs des bouleaux. La présence de deux phénotypes, formes claire et mélanique, a ainsi permis la persistance de l'espèce malgré l'augmentation du taux de prédation due à un changement environnemental (Kettlewell 1955).

Dans la mesure où le phénotype optimal change en fonction des conditions environnementales, la variabilité phénotypique permet d'assurer la persistance d'une population dans un environnement où les conditions sont hétérogènes et fluctuantes (Dybdahl & Kane 2005). Cette variation phénotypique permet à une population d'avoir à sa disposition un réservoir d'opportunités lui conférant la capacité de persister et d'évoluer en fonction des changements écologiques. La variabilité phénotypique permet donc d'augmenter la valeur adaptative moyenne de la population et est par conséquent déterminants pour éviter l'extinction (Lande & Shannon 1996, Kussell & Leibler 2005, Chevin *et al.* 2010).

1.2. Phénotypique et génétique

Le phénotype est déterminé par l'ensemble des caractères d'un individu découlant de l'expression de son génome dans un environnement particulier. Une des principales sources de variation phénotypique est donc la variation au niveau du génome des individus.

1.2.1. Les forces évolutives

Au sein d'une population, la variation génétique résulte de diverses forces évolutives (Hedrick 2011) :

- i. Les mutations, par des changements aléatoires de la séquence nucléotidique, permettent d'augmenter le nombre d'allèles présents dans une population et favorise ainsi la différenciation génétique entre les individus ;
- ii. La sélection permet la persistance des allèles responsables d'un phénotype favorable à la survie des individus en fonction de leur environnement ;

- iii. La dérive génétique, par un échantillonnage aléatoire des allèles à chaque génération, entraîne une variation de leur fréquence dans le temps et peut ainsi créer une différenciation génétique entre les individus de différentes populations ;
- iv. La migration a pour conséquence l'échange d'allèles entre différentes populations.

1.2.2. La reproduction sexuée

Une variation génétique entre les individus est favorisée lors de la reproduction sexuée (Kondrashov 1988, Drake *et al.* 1998). La reproduction des organismes est la production de nouveaux individus à partir d'un ou plusieurs individus préexistants. Chez les organismes multicellulaires, la reproduction est associée généralement au sexe qui survient au moment de la production des gamètes lors du mélange du matériel génétique des deux parents. Le mécanisme sous-jacent est la méiose durant laquelle les chromosomes homologues ségrégent de façon aléatoire et peuvent également recombinaison. Les gamètes produits par un individu donné sont ainsi composés d'un mélange du matériel génétique de ses deux parents et ce brassage du matériel génétique a pour conséquence la production d'individus uniques génétiquement.

Les avantages majeurs découlant de la reproduction sexuée sont l'élimination efficace des mutations délétères grâce à la recombinaison survenant lors de la méiose et la production de variabilité génétique entre les individus à chaque génération (Müller 1964, Smith & Maynard-Smith 1978). L'élimination efficace des mutations délétères permet à une population de persister à long terme dans un environnement donné (Müller 1964). De plus, le mécanisme de recombinaison permet de combiner plus rapidement les mutations favorables apparues indépendamment chez deux individus différents au sein d'un même individu (Crow 1994). La diversité génétique quant à elle confère à une population la possibilité de s'accommoder à des conditions de vie différentes en produisant des individus de différents phénotypes (Lande & Shannon 1996, Barton & Charlesworth 1998). L'avantage principal de la reproduction sexuée est donc de produire une grande variation génétique et potentiellement une grande variabilité de phénotypes permettant aux organismes de faire face aux environnements changeants. Cette variabilité génétique est ainsi reconnue comme étant le principal facteur permettant aux

organismes sexués de faire face à l'hétérogénéité de l'environnement (Barton & Charlesworth 1998, Reed & Frankham 2003).

1.3. Phénotypique et épigénétique

Un génotype peut également arborer des phénotypes différents. On peut, par exemple, observer différents types cellulaires chez un même individu ou retrouver des différences phénotypiques entre différents individus chez une espèce asexuée. La reproduction dite asexuée se traduit par l'absence de mélange du matériel génétique ; les individus qui en découlent sont génétiquement identiques entre eux et à leur parent, formant ainsi une lignée clonale. Bien que dépourvus de différence génétique entre les individus, les organismes asexués peuvent présenter une variation phénotypique leur permettant un succès écologique considérable (Baker 1965, Lynch 1984, Van Doninck *et al.* 2002, Van Doninck *et al.* 2003). Cela suggère que des mécanismes autres que la variation génétique permettent également une variabilité phénotypique.

1.3.1. Les processus épigénétiques

La diversité des phénotypes résultant d'un génotype peut s'expliquer par une modification du patron d'expression des gènes. Les processus épigénétiques se définissent une modification de l'expression des gènes, sans qu'il y ait modification de leurs séquences nucléotidiques (Jaenisch & Bird 2003). La différenciation cellulaire représente un exemple convainquant quant au rôle des processus épigénétiques dans la variation phénotypique. Chez les organismes multicellulaires, toutes les cellules d'un individu possèdent le même génome. Cependant, toutes les cellules n'expriment pas les mêmes gènes : selon les types cellulaires, seuls les gènes nécessaires à leur fonction le sont, résultant ainsi en une variation phénotypique (différents types cellulaires) à partir d'un même génome (Waddington 1942). Différents processus peuvent en être la cause, tels la méthylation de l'ADN, divers mécanismes remodelant la chromatine (*e.g.* méthylation, acétylation, phosphorylation des histones), l'action de brins d'ARN non codants ou même la position relative des chromosomes (Brock & Fisher 2005, Heard & Martienssen 2014).

La méthylation de l'ADN est le mécanisme épigénétique le plus étudié. Elle se retrouve chez les bactéries, les archées et les eucaryotes et se traduit par l'ajout d'un groupement méthyle (CH₃) à un nucléotide *via* une ADN méthyltransférase. La méthylation d'une cytosine précédant une guanine (dinucléotide CpG) est la plus fréquente chez les eucaryotes (Colot & Rossignol 1999). Chez les vertébrés, elle se retrouve sur l'ensemble du génome, mais à une fréquence plus basse sur les îlots CpG des régions promotrices des gènes les plus transcrits (Suzuki & Bird 2008). On observe également une corrélation négative entre le niveau d'expression des gènes et le degré de méthylation de l'ADN des régions promotrices (Suzuki & Bird 2008).

Le patron ou le niveau de méthylation d'un allèle peut varier entre les individus. L'expression de cet allèle peut donc différer selon les individus et résulter en la production de différents phénotypes. Par exemple, deux phénotypes s'observent chez la tomate : le type *Cnr*, incolore et d'une texture farineuse s'oppose au type dit sauvage. La comparaison du gène *Cnr* contrôlant la maturation de la tomate a révélé que les cytosines de la région promotrice de ce gène sont largement méthylées chez les fruits présentant le phénotype *Cnr*, mais en grande partie non méthylées chez les fruits de type sauvage (Manning *et al.* 2006). Un autre exemple de production de différents phénotypes suite à la méthylation de l'ADN se retrouve chez la linaria commune (*Linaria vulgaris*) qui produit normalement des fleurs à symétrie bilatérale. Un second phénotype, des fleurs à symétrie radiaire, a également été reporté (Luo *et al.* 1996). Cela a été associé à une modification de l'état épigénétique du gène *Lcyc* contrôlant pour la symétrie, soit à un haut niveau de méthylation et une faible transcription du gène. Inversement, un changement du phénotype passant de la symétrie radiaire à la symétrie bilatérale a également été corrélé à une déméthylation du gène *Lcyc* et une restauration de son expression, montrant ainsi la réversibilité de l'épiallèle (Cubas *et al.* 1999).

1.3.2. Les sources de variation épigénétique

Les signaux environnementaux

Contrairement à sa séquence génétique, les états épigénétiques d'un gène sont réversibles et peuvent être modifiés par des facteurs environnementaux. Cela peut contribuer au développement de divers phénotypes (Jaenisch & Bird 2003). Il existe plusieurs signaux

influençant les processus épigénétiques. Des signaux intrinsèques permettent la méthylation des îlots CpG des gènes tissus-spécifiques à des moments précis lors du développement et dans des cellules spécifiques. Ces signaux vont ainsi permettre la différenciation cellulaire lors du développement (Waddington 1953a, Bird 2002). D'autres signaux, extérieurs à l'individu, incluent, par exemple, l'alimentation, des facteurs abiotiques ou même comportementaux. Ces signaux extrinsèques peuvent avoir des conséquences considérables sur le phénotype des individus.

Un exemple remarquable de formation de phénotypes différents suite à une interaction épigénétique-environnement est reporté chez l'abeille (*Apis mellifera*). L'environnement détermine les phénotypes de reines fertiles ou d'ouvrières, selon que les larves soient nourries de gelée royale (alimentation hypométhylante) ou de miel, respectivement. Le lien avec les processus épigénétiques a été montré par l'inactivation de la méthyltransférase responsable des méthylation *de novo*, ce qui a résulté en la production d'individus fertiles, soit uniquement des reines, et ce en absence de gelée royale (Kucharski *et al.* 2008). Cet exemple montre l'interaction entre l'environnement (la gelée royale) et l'épigénétique sur le phénotype. Un autre exemple d'influence de l'alimentation sur l'expression de gènes est reporté chez la souris. L'expression du gène *Agouti* a pour conséquence un phénotype caractérisé par un pelage jaune, une obésité des individus et une propension au cancer et au diabète (Duhl *et al.* 1994). Waterland & Jirtle (2003) ont démontré qu'une diète hyperméthylante et enrichie en acide folique et vitamine B₁₂ augmente le degré de méthylation d'un élément transposable en amont du gène *Agouti* et influence l'expression de ce dernier. Selon le degré de méthylation de l'élément transposable, il peut ainsi en résulter toute une gamme de phénotypes, dont un gradient de couleur du pelage des souris.

Chez certaines espèces de reptiles et de poissons, la détermination du genre selon la température est un autre exemple de plasticité développementale (Conover & Kynard 1981, Pieau 1996). Chaque embryon possède le potentiel de devenir mâle ou femelle, toutefois la détermination du genre dépend de la température du lieu d'incubation des embryons. Récemment, l'influence de la température au niveau de la méthylation de certains sites des îlots CpG présents dans le promoteur du gène de l'aromatase, un gène impliqué dans le développement des gonades, a été reportée. Cela démontre ainsi une expression de l'aromatase

dépendante d'un facteur environnemental, soit la température, durant le développement des gonades (Matsumoto *et al.* 2013, Parrott *et al.* 2013).

Un comportement peut également servir de signal environnemental responsable de modifications épigénétiques. Par exemple, il a été démontré que les comportements affectifs de la mère envers des nouveau-nés peuvent impliquer une modification du niveau de méthylation d'un récepteur à la glucocorticoïde dans l'hypothalamus chez les rats, modifiant ainsi leur réponse au stress : les nouveau-nés ayant eu des soins affectifs maternels se sont avérés être moins stressés à l'âge adulte alors que ceux ayant été négligés ont présenté un plus haut niveau de stress (Weaver *et al.* 2004).

Stochasticité des marques épigénétiques

Les signaux environnementaux ne peuvent toutefois pas expliquer à eux seuls toutes les différences phénotypiques observées entre des individus génétiquement identiques (Gärtner & Baunack 1981). Une quantification de l'influence environnementale sur la variation phénotypique a été effectuée par Gärtner (1990). Des jumeaux monozygotes de souris ont été générés artificiellement et élevés dans des milieux contrôlés. Au final, seuls 20% à 30% de la variation phénotypique totale observée pouvaient être expliqués par un effet environnemental ; la majorité de la variation résultait d'une « troisième composante », soit probablement une variation stochastique (Gärtner 1990).

Tout comme les mutations, les modifications épigénétiques (ou épimutations) peuvent survenir de façon aléatoire et spontanée entre les individus, sans stress environnemental particulier (Becker *et al.* 2011). Le taux d'épimutations peut être extrêmement variable. Dans le cas de la méthylation de l'ADN, les épimutations peuvent être de 10 à 100 fois plus fréquentes que les mutations somatiques sur certains gènes (Bennett-Baker *et al.* 2003, Massicotte *et al.* 2011), voire cinq ordres de grandeurs plus fréquentes dans certains cas (Schmitz *et al.* 2011).

Cette variation épigénétique peut être générée durant les divisions mitotiques des cellules, résultant de processus stochastiques dans l'héritabilité somatique des profils épigénétiques. Les processus en cause peuvent être des erreurs de l'ADN méthyltransférase dans la copie d'une marque de méthylation lors de la réplication de l'ADN ; le maintien du profil de méthylation dans les cellules n'étant en effet pas parfait, des erreurs de l'ordre de 0,1% à 3%

peuvent, par exemple, survenir chez les mammifères (Riggs *et al.* 1998). Aussi, des méthylations *de novo* peuvent survenir au cours des divisions cellulaires ; un taux de 2% à 4% de gain et perte de méthylation *de novo* par mitose a ainsi été observé dans une culture de tissu humain (Riggs *et al.* 1998). Une exposition à un stress environnemental peut également conduire à une augmentation du taux d'épimutations (Rapp & Wendel 2005). Des études chez les jumeaux monozygotes ont mis en évidence une variation du profil de méthylation en fonction de l'âge des individus. Ce processus peut résulter d'une différence dans le mode de vie des jumeaux (différents signaux environnementaux), mais peut également être dû à des événements stochastiques tels une accumulation d'erreurs dans la transmission des profils de méthylation lors des divisions cellulaires (Fraga *et al.* 2005, Martin 2005).

Si un cumul trop important d'épimutations peut engendrer la mort de la cellule (Jaenisch & Bird 2003), elles peuvent également résulter en différents phénotypes. Par exemple, les épimutations sont responsables de la variabilité, soit la variation dans l'expression d'un phénotype particulier parmi les cellules d'un même type cellulaire (Rakyan *et al.* 2002). De la variation phénotypique entre des individus peut également être observée, par exemple au niveau de l'asymétrie des fleurs chez la linaria commune (Cubas *et al.* 1999), la texture de la tomate (Manning *et al.* 2006) ou encore différentes tailles chez le riz (Miura *et al.* 2009). À l'instar des facteurs génétiques et environnementaux, la stochasticité dans l'implantation des marques épigénétiques constitue ainsi une source potentielle de variation phénotypique.

1.4. Phénotypique et environnement

1.4.1. Fréquences des variations environnementales

Les changements environnementaux peuvent survenir à différentes fréquences, impliquant ainsi des pressions de sélection variables. Différents patrons de changements environnementaux peuvent se produire entre la production du phénotype et le moment où la sélection agira sur ce trait. Les conditions environnementales peuvent être de trois types (Figure 1.1) :

- i. Non-variables lorsqu'elles demeurent identiques durant la production et la sélection d'un phénotype et également au fil des générations ;

- ii. Changeantes et prévisibles lorsque les conditions rencontrées durant la production d'un phénotype sont les mêmes ou permettent de prévoir celles durant la sélection du phénotype mais elles peuvent être différentes entre les générations ;
- iii. Changeantes et imprévisibles lorsque les conditions rencontrées lors de la production d'un phénotype ne permettent pas de prévoir les conditions environnementales lors de sa sélection.

	Génération 1		Génération 2	
	Production	Sélection	Production	Sélection
Non-variable :	Environnement	Environnement	Environnement	Environnement
Prévisible :	Environnement	Environnement	Environnement	Environnement
Imprévisible :	Environnement	Environnement	Environnement	Environnement

Figure 1.1. Patrons des variations environnementales en fonction des générations, de la production d'un phénotype et de sa sélection. Les conditions environnementales sont représentées en fonction des couleurs des cases. Adapté de Scheiner (2014b).

Les changements environnementaux peuvent être dus à des fluctuations temporelles ou à une hétérogénéité spatiale, par exemple lorsque le changement est dû à la migration d'un individu d'un environnement à un autre. La sélection, quant à elle, favorise les individus présentant un phénotype le plus proche de l'optimum dans un environnement donné et élimine les moins performants. Afin de permettre à une population de présenter un phénotype moyen le plus proche du phénotype optimal lors de la sélection, les stratégies de production d'un phénotype, pouvant dépendre de divers facteurs (génétiques, environnementaux et stochastiques), seront donc dépendantes de la fréquence et du patron des changements environnementaux.

1.4.2. Adaptation locale

La sélection naturelle agit sur les phénotypes qui peuvent être déterminés par la variation génétique des populations naturelles. Par l'élimination des individus les moins performants, elle permet aux individus possédant les traits phénotypiques les plus optimaux pour un environnement donné de laisser plus de progénitures, et ainsi de transmettre le matériel génétique responsable de ces traits phénotypiques. À la génération suivante, la fréquence des allèles responsables de ces phénotypes favorisés par la sélection augmentera : c'est l'adaptation locale. Cette adaptation impliquera par conséquent une augmentation de la valeur adaptative de la population dans la mesure où une plus grande proportion des individus la formant hérite de l'allèle ou du génotype favorable, leur permettant de produire le phénotype optimal dans un environnement donné (Barrett & Schluter 2008, Savolainen *et al.* 2013).

Pour que l'adaptation locale constitue une stratégie avantageuse pour la persistance d'une population, une certaine stabilité des conditions environnementales est nécessaire (Lande & Shannon 1996, Chevin & Lande 2010). Dans un premier temps, un allèle donné doit permettre l'expression d'un phénotype favorisant la survie et la reproduction d'un individu de la population dans un environnement donné. Dans la mesure où cet allèle est, par la suite, transmis à la génération suivante, cette dernière devra persister dans les mêmes conditions environnementales que la précédente afin d'assurer la transmission de l'allèle à la génération d'après. L'adaptation locale permet ainsi une augmentation de la valeur adaptative de la population dans le cas où les conditions environnementales sont similaires d'une génération à l'autre (patron non-variable des conditions environnementales – Figure 1.1).

Dans un environnement hétérogène, l'adaptation locale peut résulter en une différenciation génétique entre des populations. La diversité génétique observée correspondrait ainsi au résultat de la sélection dans chacun des environnements (Hedrick *et al.* 1976). Toutefois, lorsque les changements environnementaux sont trop fréquents dans le temps, d'autres stratégies permettant de générer de la variation phénotypique plus rapidement seront favorisées (Burger & Lynch 1995).

1.4.3. Plasticité phénotypique

Le phénotype est le résultat de l'expression d'un génotype dans un environnement particulier. La capacité d'un génotype à générer divers phénotypes en fonction des conditions environnementales, soit le résultat de l'interaction entre les processus épigénétiques et les signaux environnementaux, est définie comme la plasticité phénotypique (Stearns 1989). Elle dépend de la perception et de l'intégration des signaux environnementaux durant le développement des individus leur permettant de produire un phénotype correspondant à l'ensemble des signaux perçus (Pigliucci 1996, Bateson *et al.* 2014) : c'est l'acclimatation des individus à leur environnement leur permettant d'augmenter leur valeur adaptative.

Le mode de reproduction de la rainette *Dendropsophus ebraccatus* représente un exemple de caractère plastique. Les individus adultes de cette espèce sont capables de pondre leurs œufs sur des feuilles (mode terrestre) ou dans l'eau (mode aquatique) ; le mode de reproduction se fait en fonction de la surface d'ombre au-dessus de l'étang (Touchon & Warkentin 2008). Un milieu ombragé est souvent corrélé à une abondance de végétation et à un taux d'humidité élevé. À l'opposé un milieu plus éclairé est associé à un environnement plus sec. Le signal environnemental (quantité d'ombre) représente ainsi un facteur déterminant du risque de dessiccation des œufs. Quand l'étang est bien ombragé, les rainettes adopteront la reproduction en mode terrestre, ce qui permet une meilleure oxygénation des œufs lors de leur développement et une plus grande protection des prédateurs aquatiques. Dans le cas contraire, les œufs seront pondus dans l'eau afin de les protéger d'une possible dessiccation (Touchon & Warkentin 2008).

La plasticité phénotypique est toutefois soumise à certaines contraintes, limitant son avantage adaptatif. De manière théorique, ces contraintes peuvent être associées à des coûts énergétiques dans le maintien et la production de différents phénotypes, à de l'instabilité développementale due à une plus grande susceptibilité d'imprécisions dans la production d'un phénotype alternatif chez les organismes plastiques, ou encore à la fiabilité du signal environnemental (Bradshaw 1965, DeWitt *et al.* 1998, Pigliucci 2001, Murren *et al.* 2015).

La plasticité phénotypique est déterminée par des bases génétiques, c'est-à-dire que la capacité à modifier un phénotype donné en fonction d'un signal environnemental dépend du

génotype, varie entre différents génotypes, se transmet à la génération suivante et est soumise à la sélection (Gavrilets & Scheiner 1993, Scheiner 1993, de Jong 1995, Nussey *et al.* 2005). Des études théoriques ont démontré que les génotypes plastiques ne sont sélectionnés que lorsque les changements environnementaux sont changeants, mais prévisibles. Pour que cette stratégie soit adaptative, les signaux environnementaux perçus durant la production du phénotype doivent donc permettre de prévoir les conditions environnementales lors de la sélection de ce phénotype (Lachmann & Jablonka 1996, Padilla & Adolph 1996, Reed *et al.* 2010, Scheiner & Holt 2012). Par exemple, les conditions environnementales peuvent changer entre les générations, mais restent stables au sein d'une génération afin de permettre aux organismes de pouvoir développer un phénotype assurant leur survie jusqu'à leur reproduction (patron prévisible des conditions environnementales – Figure 1.1). Dans l'exemple concernant les modes de reproduction de la rainette *D. ebraccatus*, l'imprévisibilité des conditions environnementales pourrait résulter d'un changement environnemental trop rapide tel la disparition de la couverture végétale juste après la ponte des œufs rendant le milieu plus sec et impliquant ainsi la dessiccation des œufs pondus hors de l'eau.

Dans certains cas, il est possible pour un organisme de modifier continuellement son phénotype en fonction des signaux environnementaux perçus tout au long de son développement. Cette réversibilité du phénotype est définie comme la flexibilité développementale. Ce cas particulier de la plasticité phénotypique permet à un individu de modifier constamment son phénotype en réponse à des signaux environnementaux qui changent. Cette stratégie pourrait ainsi être avantageuse lorsque les changements environnementaux sont trop fréquents résultant en des pressions de sélection différentes, par exemple entre les premiers stades de développement et le stade adulte des individus (Levins 1963, Piersma & Drent 2003).

1.4.4. Les stratégies de minimisation des risques

D'autres stratégies, différant au niveau de la variabilité des phénotypes produits, ont été décrites afin d'expliquer la persistance des organismes face à l'imprévisibilité des changements environnementaux (patron imprévisible des conditions environnementales – Figure 1.1). Les stratégies de minimisation de risque (*bet-hedging*) consistent en un compromis entre la moyenne et la variance de la valeur adaptative d'une population de telle sorte que des phénotypes

permettant une moins bonne valeur adaptative que le phénotype optimal dans un environnement donné puissent présenter un avantage sélectif dans certaines conditions (Slatkin 1974, Seger & Brockmann 1987, Philippi & Seger 1989).

La première stratégie est associée à l'expression « *Jack of all trades is master of none* » (Scheiner 2014a), aussi connue sous le nom de *bet-hedging* conservateur (Seger & Brockmann 1987, Philippi & Seger 1989, Starrfelt & Kokko 2012). Cette stratégie consiste en la production d'un phénotype unique mais tolérant permettant aux individus de faire face à diverses conditions environnementales. Bien que ne permettant pas d'atteindre le phénotype optimal correspondant aux différentes conditions, cette stratégie permet tout de même d'assurer la survie et la reproduction d'une portion des individus dans une certaine gamme d'environnements.

Une autre stratégie de minimisation de risques est le *bet-hedging* diversifiant. Elle consiste en la production d'une gamme de phénotypes de façon aléatoire, mais avec la perspective qu'au moins un des phénotypes produits corresponde aux conditions environnementales du milieu (Slatkin 1974, Seger & Brockmann 1987). La stratégie du *bet-hedging* a été décrite comme un moyen permettant d'assurer la persistance d'une population à long terme lorsque les fluctuations environnementales sont imprévisibles (patron imprévisible des conditions environnementales – Figure 1.1) (Fraser & Kærn 2009, Simons 2011, Scheiner & Holt 2012, Muller *et al.* 2013, Scheiner 2014a).

La grande variation phénotypique produite peut se retrouver entre les générations ou au sein d'une génération. D'une part, le *bet-hedging* inter-générationnelle est la production de phénotypes différents entre les générations, permettant ainsi une meilleure valeur adaptative lorsque la progéniture d'un individu expérimente le même environnement, mais une variation temporelle des conditions environnementales est possible (Starrfelt & Kokko 2012). En étant hasardeuse, cette stratégie ne permet toutefois pas de garantir la survie de tous les individus d'une population donnée et réduit sa valeur adaptative moyenne. D'autre part, le *bet-hedging* intra-générationnelle consiste en une variabilité de phénotypes au niveau de la progéniture d'un individu donné, ce qui permettrait de faire face à une variation spatiale des conditions environnementales (Hopper *et al.* 2003). Cette stratégie s'apparente ainsi à la reproduction sexuée, à la différence que des mécanismes autres que la variation génétique peuvent causer la variation phénotypique. Par exemple, certaines populations clonales de bactéries peuvent

présenter une variabilité phénotypique dans des conditions homogènes (Veening *et al.* 2008) : la variation phénotypique est le résultat de facteurs stochastiques et confère à la population le potentiel de faire face à un changement environnemental.

Afin d'éviter des confusions au niveau des termes tout au long de ce document, le terme « *Jack-of-all-trades* » fera référence à un génotype permettant de produire un phénotype unique mais tolérant à plusieurs environnements, alors que « *bet-hedging* » fera référence au *bet-hedging* diversifiant, soit la production de plusieurs phénotypes de façon stochastique.

1.5. Facteurs responsables du succès écologique des organismes asexués

Les organismes asexués ont, par le passé, souvent été considérés comme des « impasses évolutives », incapables de perpétuer une lignée sur une longue période (à l'échelle évolutive) ni d'engendrer de nouveaux groupes phylogénétiques (Stalker 1956, Mayr 1970, Uzzell 1970, Smith & Maynard-Smith 1978). Toutefois, l'existence de nombreux organismes asexués anciens, vieux de plus de 500 000 ans (Judson & Normark 1996, Neiman *et al.* 2009), infirme cette hypothèse. L'exemple des bdelloïdes est encore plus frappant dans la mesure où ce groupe de rotifères se reproduit de façon asexuée depuis plus de 35 millions d'années (Welch & Meselson 2000). En plus de persister dans le temps, les organismes asexués peuvent également présenter une grande répartition géographique (Lynch 1984, Vrijenhoek 1998, Van Doninck *et al.* 2002). Comment expliquer un tel succès écologique des organismes dépourvus de différence génétique ?

1.5.1. La variation phénotypique des organismes asexués

La variation phénotypique, déterminante pour le succès écologique des organismes, est possible chez les organismes asexués. Les processus épigénétiques, en permettant une variation de l'expression des gènes en fonction des conditions environnementales et donc une variation au niveau des phénotypes, ont été proposés comme mécanisme clé sous-jacent à la plasticité phénotypique (Angers *et al.* 2010, Beldade *et al.* 2011). Cette stratégie permet ainsi aux organismes une meilleure acclimatation à des environnements spatialement hétérogènes, mais également temporellement fluctuants et ce, avec ou sans différence génétique entre les

individus. Les épimutations permettent également une production aléatoire des phénotypes. La production de phénotypes ne correspondant pas à un optimum dans un environnement donné n'est pas forcément négative pour la valeur adaptative d'une population. Par exemple, dans le cas de la stratégie du *bet-hedging*, elle permettrait d'assurer la persistance des organismes lorsque les changements environnementaux sont imprévisibles.

Les processus épigénétiques ont ainsi été présentés comme une alternative à la variation génétique pouvant expliquer le succès écologique des organismes asexués (Castonguay & Angers 2012, Herman *et al.* 2014, Verhoeven & Preite 2014, Botero *et al.* 2015).

1.5.2. Les modèles écologiques

Deux modèles écologiques/évolutifs ont été proposés pour expliquer la répartition géographique et les variations phénotypiques observées chez les organismes asexués : le modèle du génotype généraliste (GPG, *General Purpose Genotype*) et le modèle de la variation figée de niches (FNV, *Frozen Niche Variation*).

Le modèle GPG (*General Purpose Genotype*)

Le concept du GPG, formulé pour la première fois par Baker (1965), définit un génotype qui démontre une capacité à survivre et à se reproduire dans une large gamme de conditions environnementales. Dans ce modèle, la condition minimale requise pour être défini comme un génotype généraliste est d'avoir une valeur adaptative moyenne plus grande que zéro (laisser au moins un descendant) et de persister dans diverses conditions environnementales (Vrijenhoek & Parker 2009). Ainsi, la vaste répartition géographique en Australie de deux lignées clonales du puceron *Myzus persicae* suggère qu'elles font face à diverses conditions environnementales et représente un exemple de génotypes généralistes GPG (Vorburger *et al.* 2003). Un autre exemple extrême de GPG est retrouvé chez *Pennisetum setaceum*, une graminée clonale retrouvée dans une grande hétérogénéité d'habitats et ce, sur plusieurs continents (Le Roux *et al.* 2007).

Divers mécanismes peuvent mener à un GPG. Ce génotype peut être sélectionné pour sa plus grande plasticité phénotypique, ce qui lui permettrait de s'acclimater à différentes conditions environnementales (Pigliucci 2005). Cela lui permettrait non seulement de coloniser

différents habitats, mais également de perdurer dans le temps malgré les possibles fluctuations des conditions. De même, un génotype tolérant (stratégie *Jack-of-all-trades*) peut également être considéré comme un GPG, dans la mesure où il permet de produire un phénotype tolérant résultant en la survie des individus dans plusieurs environnements.

Le modèle FNV (*Frozen Niche Variation*)

Par opposition au GPG, le modèle FNV se base sur la faible variabilité phénotypique et une répartition limitée observées chez certaines lignées clonales. Ces lignées, dites spécialistes, présentent une faible variabilité au niveau de l'utilisation des habitats et des ressources disponibles. Cela permet donc l'existence en sympatrie de différentes lignées (Vrijenhoek 1984). Les lignées clonales peuvent survivre un temps dans des conditions bien particulières et l'apparition régulière de nouvelles lignées clonales par hybridation d'espèces sexuées permet ainsi un renouvellement de lignées spécialisées dans de nouvelles conditions environnementales. Le modèle se résume en trois étapes (Vrijenhoek 1984, Vrijenhoek & Parker 2009) :

- i. Génération de différentes lignées clonales par hybridation des populations sexuées génétiquement variables (section 1.5.3) ;
- ii. Sélection inter-clonale permettant l'élimination des clones qui chevauchent une niche déjà occupée par un autre clone ou par une ou plusieurs populations sexuées ;
- iii. Sélection permettant la persistance des lignées spécialisées à des ressources non ou moins utilisées.

Un exemple de FNV est décrit chez le puceron *Dipsa bifurcata* où la diversité clonale observée varie selon les saisons (Niklasson *et al.* 2004). Chez les poissons hybrides *Poeciliopsis 2 monacha-lucida* se reproduisant par gynogenèse, il a été clairement démontré que différentes lignées clonales sont retrouvées dans des environnements distincts (ségrégation spatiale), utilisant des ressources alimentaires différentes et présentant une morphologie et des comportements différents (Vrijenhoek 1979, Vrijenhoek 1984). Le partage des niches a également été démontré chez deux lignées clonales du même complexe *Poeciliopsis* retrouvées

en sympatrie (Vrijenhoek & Pfeiler 1997). Suite à différents stress environnementaux, les deux lignées clonales ont présenté des taux de survie différents selon les conditions : une plus grande tolérance à des variations de température, mais une moins bonne tolérance à l'hypoxie pour une lignée, et le contraire pour l'autre lignée. Alors qu'une des espèces parentales qui est sexuée a plutôt démontré un taux de survie intermédiaire à ces deux stress (Vrijenhoek & Pfeiler 1997).

Les deux modèles GPG et FNV ne sont toutefois pas mutuellement exclusifs (Vrijenhoek & Parker 2009). Les conditions environnementales peuvent, en effet, être hétérogènes de façon spatiale et temporelle. Selon certaines caractéristiques, les organismes clonaux peuvent ainsi répondre différemment aux conditions environnementales ; un clone pourrait, par exemple, avoir une préférence alimentaire limitée et être spécialiste dans l'espace selon la répartition de la ressource alimentaire, mais posséder une grande tolérance à la température et être généraliste dans le temps, selon les variations temporelles de la température (Vrijenhoek 1979).

1.5.3. Les organismes hybrides

On peut retrouver la reproduction asexuée lorsqu'aucun gamète n'est produit chez un organisme (*e.g.* scissiparité, bourgeonnement). Dans certains cas, elle peut être le résultat d'un processus dérivé de la reproduction sexuée, c'est-à-dire quand la production de gamètes ne passe pas par le cycle méiotique complet (*e.g.* gynogenèse, androgenèse). Ce cas de figure s'observe notamment chez des organismes provenant d'une hybridation entre différentes espèces sexuées (Kearney 2003, Bengtsson 2009).

L'hybridation

Une population correspond à une unité reproductrice distincte pouvant présenter une diversité génétique qui lui est propre résultant d'adaptations spécifiques à des conditions environnementales locales (Altukhov 1981, Camus & Lima 2002, Waples & Gaggiotti 2006). Une hybridation se définit comme la reproduction entre des individus appartenant à des populations distinctes d'une même espèce ou entre espèces (Stebbins 1959, Barton 2001), faisant suite à diverses conséquences. Une hybridation entraîne notamment la formation d'un génome réunissant au sein d'un même individu des caractéristiques génétiques des deux parents

provenant de populations différentes et donc d'une diversité génétique issue d'adaptations distinctes.

Selon le principe de Hubbs, le phénomène d'hybridation s'observe typiquement chez une espèce en déclin (Hubbs 1955, Grant & Grant 1997). Une hybridation peut être d'origine anthropique lorsque les activités humaines entraînent le changement de répartition de certaines populations, ou naturelle (Allendorf *et al.* 2001) et peut survenir entre des populations ou des espèces différentes. Cette association de deux génomes plus ou moins divergents peut avoir diverses conséquences.

L'incompatibilité d'hybridation

Certains hybrides se révèlent tout simplement non viables, stériles ou non adaptés à leur environnement (Barton & Hewitt 1985, Frank 1991, Orr *et al.* 1997, Barton 2001, Burke & Arnold 2001). Cette incompatibilité d'hybridation peut s'expliquer par diverses causes. Le modèle Bateson-Dobzhansky-Muller suggère, par exemple, une incompatibilité génique causée par des interactions épistatiques négatives entre deux loci (Dobzhansky 1936, Müller 1942). Des relations épistatiques entre des gènes présents sur le chromosome sexuel et sur un autosome peuvent également avoir pour conséquence la stérilité ou la non-viabilité des individus dont le sexe est hétérogamétique, suivant ainsi la loi de Haldane (Haldane 1922, Zeng 1996).

En plus de ces mécanismes génétiques, d'autres processus peuvent également être responsables d'une incompatibilité d'hybridation. Par exemple, une hybridation entre la souris de plage (*Peromyscus polionotus*) et la souris sylvestre (*Peromyscus maniculatus*) a permis de mettre en évidence l'expression anormale d'un gène à empreinte paternelle chez les hybrides ; ces derniers se retrouvaient, dans la grande majorité des cas, non viables (Vrana *et al.* 2000). Dans le cas d'une hybridation entre deux espèces de plantes du genre *Arabidopsis*, c'est au contraire l'expression des gènes à empreinte qui sont normalement réprimés que l'on retrouve (Bushell *et al.* 2003, Josefsson *et al.* 2006). O'Neill *et al.* (1998) ont par ailleurs mis en évidence une hypométhylation de certaines régions du génome et une activation des éléments transposables (les rétrotransposons) chez un hybride de marsupiaux *Macropus eugenii* × *Wallabia bicolor*.

La supériorité hybride

Dans certains cas, les hybrides peuvent survivre et présenter des performances égales, voire supérieures à celles des parents dans le même environnement ou même dans de nouveaux habitats (Dowling & Secor 1997, Barton 2001, Rhode & Cruzan 2005). L'augmentation des performances (*e.g.* croissance, taille, biomasse, résistance à des maladies ou parasites, taux de fécondité) d'un hybride par rapport à celle des populations parentales est décrite comme l'hétérosis ou la vigueur hybride (Shull 1948). Elle peut s'expliquer par divers mécanismes génétiques favorisés par l'état hétérozygote des hybrides de populations naturelles (Hansson & Westerberg 2002, Smith *et al.* 2012) :

- i. La dominance allélique, soit le masquage de l'effet délétère des allèles récessifs apparus chez une des espèces parentales ;
- ii. La conservation des différents gènes épistatiques ; les individus hybrides possèdent l'intégrité du génome de chacune des deux espèces parentales à la première génération (F1) ;
- iii. La superdominance qui correspond à la supériorité des hétérozygotes comparé aux homozygotes (Bruce 1910, Crow 1948, Lippman & Zamir 2007) ;
- iv. La pseudo-superdominance qui se caractérise également par la supériorité des hétérozygotes, mais mettant en jeu deux gènes liés en répulsion (c'est-à-dire un gène favorable à un locus donné lié à un gène défavorable à un autre locus pour un parent, mais l'inverse pour l'autre) (Semel *et al.* 2006).

De plus, un individu hybride de première génération possède les allèles des deux espèces parentales. Cet état hétérozygote lui confère donc la possibilité d'exprimer l'un ou l'autre des deux allèles, lui permettant ainsi d'avoir un potentiel de variation au niveau phénotypique et donc de pouvoir coloniser les mêmes niches écologiques que les espèces parentales, mais également d'autres habitats (Schultz 1971). À titre d'exemple, une telle répartition des hybrides de moules a été observée sur plus de 180 km de côte dans le sud-ouest de l'Angleterre. Cette répartition des hybrides est bordée à une extrémité par l'une des espèces parentales *Mytilus edulis* exclusivement, alors qu'à l'autre extrémité, se retrouvait seulement l'autre espèce parentale *M. galloprovincialis* (Hilbish *et al.* 2002).

Perpétuation de la génération F1

Le croisement des individus de la génération F1, et des générations suivantes, peut conduire à la baisse des performances de la progéniture : c'est la dépression hybride. Ce croisement peut conduire à de nouveaux réarrangements chromosomiques de par la ségrégation aléatoire des chromosomes lors de la méiose (Fishman & Willis 2001), ce qui a pour conséquence la perte de tous les avantages de la génération F1. Par exemple, les nouveaux réarrangements chromosomiques peuvent conduire à la rupture des interactions épistatiques au sein d'un ensemble de gènes (Lynch 1991, Edmands & Timmerman 2003) ou encore à la perte de l'état hétérozygote à différents loci, impliquant ainsi une baisse au niveau des performances des individus.

Chez les eucaryotes pluricellulaires, la reproduction asexuée est souvent associée aux organismes résultants d'une hybridation interspécifique (Vrijenhoek *et al.* 1989, Kearney 2003, Bengtsson 2009). La méiose peut ne pas s'effectuer correctement chez les hybrides, notamment à cause de la difficulté d'appariement des chromosomes provenant de deux génomes divergents et de la perturbation des signaux lors de la formation des gamètes. Une reproduction asexuée représenterait ainsi un atout chez les individus hybrides, car cela équivaldrait à une perpétuation de la génération F1 et de tous les avantages qui y sont associés. Ce mode de reproduction serait ainsi un moyen pour les organismes clonaux de constamment profiter de la vigueur hybride et des avantages associés à l'état hétérozygote de leur génome (Schultz 1971).

1.6. Paradoxe de coexistence des organismes sexués et asexués

1.6.1. Les coûts associés aux modes de reproduction

L'avantage principal de la reproduction sexuée est le potentiel de générer une grande variation phénotypique à chaque génération grâce au brassage du matériel génétique. Des coûts peuvent toutefois découler de ce mode de reproduction. Chez une espèce sexuée non hermaphrodite, la moitié de la population doit être représentée par des individus qui ne peuvent produire de progéniture (les mâles), ce qui représente un coût démographique. De plus, une femelle sexuée ne transmet que la moitié de son génome diploïde par individu de sa descendance, seule une

fraction de sa valeur adaptative est donc transmise. À cela s'ajoutent également les risques associés notamment à la recherche de partenaire et d'accouplement (prédation, maladies) (Tomlinson 1966, Bell 1982, West & Peters 2000, Agrawal 2001, Tomiuk & Köhler 2007).

Ces coûts associés à la reproduction sexuée peuvent s'avérer des avantages immédiats à la reproduction asexuée. Par exemple, pour un même taux de reproduction, une population asexuée présente un important avantage au niveau démographique : si chaque femelle peut laisser deux descendants, la croissance démographique est exponentielle pour les organismes asexués, par opposition à une taille de population stable chez les organismes sexués. De plus, une femelle se reproduisant de façon asexuée transmet la totalité de son génome ; la progéniture possède ainsi la même valeur adaptative que leur mère dans un même environnement. En plus de l'absence de risques associés à la recherche de partenaire et d'accouplement, ces différents avantages confèreraient une plus grande capacité de colonisation et une meilleure garantie de reproduction à un organisme asexué par rapport à un organisme sexué (Tomlinson 1966, Bell 1982, West & Peters 2000, Agrawal 2001, Tomiuk & Köhler 2007). Ainsi, toutes choses étant égales (mêmes taux de natalité et pression de sélection), les organismes asexués devraient au fil du temps éclipser les organismes sexués.

1.6.2. La gynogenèse

La gynogenèse est un mode de reproduction asexuée que l'on retrouve chez un grand nombre d'organismes (Macgregor & Uzzell 1964, Vasil'ev *et al.* 1989, Vrijenhoek *et al.* 1989, Goddard & Dawley 1990, Vrijenhoek 1998). Elle consiste en la production d'œufs non réduits (*i.e.* le gamète femelle présente la même ploïdie que les tissus somatiques de la femelle, résultat d'une méiose incomplète), mais le spermatozoïde d'un mâle est requis afin de déclencher le développement des œufs (Hubbs & Hubbs 1932). Le matériel génétique du mâle n'est toutefois pas intégré dans l'œuf ; les gynogènes ne sont donc composés que de femelles où la mère et sa progéniture sont génétiquement identiques. Ces organismes cumulent ainsi les désavantages des deux modes de reproduction : en étant asexués, ils doivent faire face à l'hétérogénéité et aux fluctuations de l'environnement sans différence génétique entre les individus et en raison de leur dépendance aux spermatozoïdes, ils doivent coexister avec une espèce sexuée, tel dans un système « hôte-parasite ». Bien que bénéficiant des avantages démographiques grâce à leur

reproduction asexuée, les gynogènes ne doivent pas surpasser leur hôte sexué afin de ne pas perdre leur source de spermes, indispensable pour leur persistance.

Différentes hypothèses expliquant cette coexistence contre-intuitive sont proposées dans la littérature. Une première hypothèse repose sur un modèle théorique de métapopulation. Elle stipule que la coexistence des gynogènes avec leur hôte sexué est vouée à l'extinction à petite échelle (population locale), mais la persistance des systèmes gynogénétiques est assurée à plus grande échelle par la dispersion des individus entre différentes populations (Hellriegel & Reyer 2000, Kokko *et al.* 2008). D'autres hypothèses reposent sur divers mécanismes qui permettent de restreindre la prolifération de la forme asexuée. Ces mécanismes incluent une moins bonne performance des gynogènes comparée aux individus de la forme sexuée à cause de désavantages au niveau de traits d'histoire de vie (Schley *et al.* 2004, Schlupp 2005) ou une discrimination entre les femelles sexuées et gynogènes par les mâles de l'espèce sexuée (McKay 1971, Heubel *et al.* 2009, Mee & Otto 2010). Le partage de l'espace écologique disponible, basé sur la séparation des niches du modèle FNV (Vrijenhoek 1984), a également été proposé comme un moyen de réduire la compétition entre les organismes asexués et leurs hôtes sexués (Weeks *et al.* 1992, Vrijenhoek 1994, Gray & Weeks 2001).

1.7. Objectifs et hypothèses

L'objectif général de ce projet consiste à mettre en évidence les processus responsables de la persistance des organismes asexués en déterminant les relations entre la variation épigénétique, la variation phénotypique et les stratégies écologiques. Afin de cerner l'importance de ces différents facteurs dans le succès écologique des organismes asexués, ce projet se subdivise en trois sous-objectifs permettant de répondre à des questions plus spécifiques :

1) Quel rôle joue la variation épigénétique dans les différentes stratégies écologiques ?

Le premier sous-objectif consistera à déterminer s'il existe une relation entre les différentes sources de variation épigénétique et l'imprévisibilité des conditions environnementales. Les processus épigénétiques permettent la production d'une diversité de phénotypes en absence de diversité génétique *via* des facteurs stochastiques ou en fonction des conditions

environnementales. Notre hypothèse est donc que ces sources de variation épigénétique soutiennent le *bet-hedging* et la plasticité phénotypique, deux stratégies qui reposent sur de la variation au niveau des phénotypes.

Les processus épigénétiques représentent une source importante de variation phénotypique. Notre première prédiction est que, même en absence de variation génétique, les organismes asexués peuvent présenter des différences phénotypiques au sein d'un environnement homogène (épimutations) ainsi qu'entre différents environnements (influence environnementale). De plus, dans la mesure où le *bet-hedging* et la plasticité phénotypique sont sélectionnés en fonction de la prévisibilité des changements environnementaux, notre seconde prédiction est que la contribution relative des différentes sources de variation épigénétique sera corrélée à la prévisibilité des conditions environnementales. Ainsi, une plus grande proportion de variation épigénétique induite par l'environnement sera détectée chez les organismes vivants dans des environnements prévisibles, alors qu'une plus grande stochasticité dans l'implantation des marques épigénétiques sera observée chez ceux faisant face à des environnements imprévisibles.

2) *Quel est le rôle de la plasticité phénotypique dans le succès écologique des organismes asexués ?*

Le second sous-objectif consiste à déterminer l'étendue de la variation phénotypique en fonction de la répartition des lignées clonales et de leurs interactions avec d'autres organismes. Chez les gynogènes, la persistance des organismes asexués dépend de leur interaction avec les formes sexuées. Le partage des niches écologiques disponibles a été proposé comme un moyen de réduire la compétition entre les organismes asexués et leurs hôtes sexués, et ainsi assurer la persistance des asexués. Sous le modèle FNV, le partage de niche représente une hypothèse plausible dans la mesure où les génotypes sont spécialistes et donc confinés à une plus petite niche écologique. En lien avec le premier sous-objectif, notre hypothèse est que le partage des niches est également possible sous le modèle GPG grâce à la variation épigénétique : les individus d'une lignée généraliste pourraient diversifier leurs niches écologiques effectives en présentant différents épigénotypes acclimatés à des environnements distincts. La plasticité phénotypique permettrait donc de diversifier les niches écologiques occupées par une lignée

clonale donnée afin de réduire la compétition avec son hôte sexué et ainsi d'assurer sa persistance.

Le phénotype d'un individu résulte de l'expression de son génome et dépend des conditions de l'environnement qui l'entoure. Notre première prédiction est qu'une lignée ayant une grande répartition géographique (succès écologique d'un génotype généraliste sous le modèle GPG) pourra présenter des différences phénotypiques en fonction des conditions environnementales (plasticité phénotypique). En absence de différences génétiques entre les individus d'une lignée clonale donnée, notre seconde prédiction est donc que l'on observera une plus faible variation phénotypique chez les organismes asexués comparés aux sexués dans un environnement homogène. Toutefois, selon l'hypothèse de diversification de niche, les individus d'une lignée plastique devraient présenter une plus grande variation phénotypique dans une localité, en milieu naturel, comparée à un environnement homogène.

3) Quels sont les facteurs limitant le succès écologique des organismes asexués ?

Le troisième sous-objectif est de déterminer les facteurs limitant la prolifération des organismes asexués. Afin d'assurer la persistance des gynogènes, ces organismes asexués doivent coexister et donc faire face à la même hétérogénéité environnementale que les espèces sexuées hôtes malgré leur absence de variation génétique.

En lien avec le second sous-objectif, notre première hypothèse est que la plasticité phénotypique est associée à certains coûts limitant ainsi l'efficacité des lignées plastiques. De plus, compte tenu du coût démographique associé à la reproduction sexuée (section 1.6.1), notre seconde hypothèse est que les organismes asexués doivent également se prévaloir d'un handicap démographique afin de limiter leur prolifération, et ainsi éviter de surpasser démographiquement la population sexuée hôte.

1.8. Le modèle biologique

1.8.1. *Chrosomus eos-neogaeus*, un hybride asexué

Le biotype *Chrosomus eos-neogaeus* (Pisces, Cyprinidae), composé uniquement de femelles, résulte d'une hybridation entre un mâle ventre rouge du nord (*C. eos*) et d'une femelle ventre citron (*C. neogaeus*) (Dawley & Goddard 1988). Ces hybrides se reproduisent de façon clonale, par gynogénèse (Figure 1.2). Ce mode de reproduction se traduit par la production d'œufs diploïdes par les hybrides femelles. Le développement des œufs est ensuite induit par un spermatozoïde d'une ou l'autre des espèces parentales. Les juvéniles produits se retrouvent donc à être génétiquement identiques à leur mère, formant une lignée clonale (Goddard & Dawley 1990, Goddard *et al.* 1998). Différents événements d'hybridation peuvent avoir eu lieu, donnant ainsi l'émergence de différentes lignées clonales (Angers & Schlosser 2007).

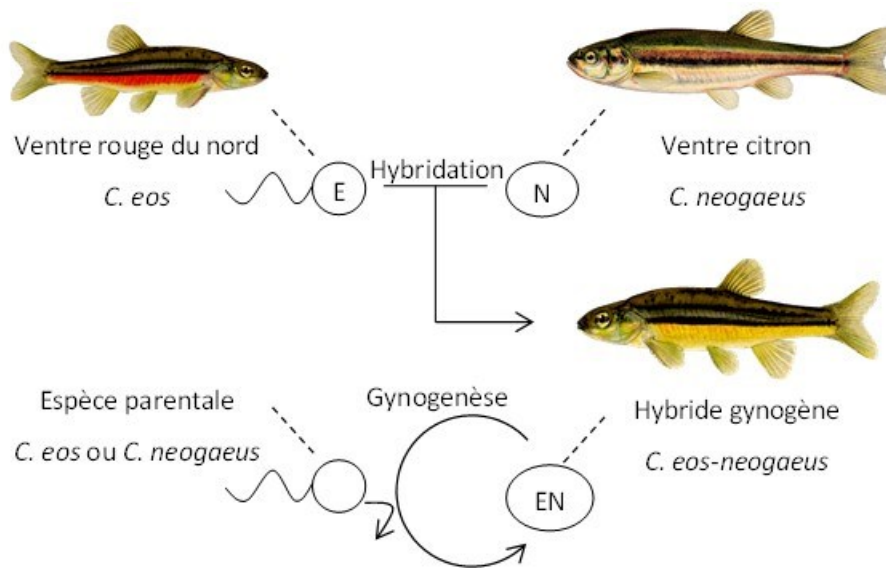


Figure 1.2. Mécanisme conduisant à la formation naturelle des hybrides asexués *Chrosomus eos-neogaeus*. Les hybrides entièrement femelles produisent des œufs non réduits et, bien que le sperme de l'une des espèces parentales soit nécessaire pour déclencher l'embryogénèse, il n'y a aucune fécondation.

Il existe également des hybrides triploïdes dans le complexe *Chrosomus eos-neogaeus* (Dawley *et al.* 1987, Dawley & Goddard 1988). Ils sont exclusivement produits *de novo* suite à l'incorporation du matériel génétique mâle dans un œuf hybride diploïde (Goddard *et al.* 1989). La fécondation des œufs diploïdes avec le spermatozoïde de l'hôte sexué se produit à un taux de 50% (Goddard & Dawley 1990). Toutefois, les individus triploïdes ne se reproduisent pas de façon clonale (Goddard & Schultz 1993) et leur rôle écologique demeure encore inconnu.

1.8.2. Répartition géographique

Les membres du complexe *Chrosomus eos-neogaeus* se retrouvent en sympatrie ou en allopatrie dans la plupart des lacs et ruisseaux du centre et du nord-est de l'Amérique du Nord (Scott & Crossman 1973). Ils sont potentiellement soumis à une grande variabilité de pressions de sélection, se retrouvant dans une multitude d'environnements très hétérogènes. On les retrouve notamment dans divers cours d'eaux, étangs, ruisseaux et lacs marécageux. À une échelle géographique plus fine, les membres du complexe *C. eos-neogaeus* démontrent un comportement de fidélité au site de natalité indiquant ainsi que les individus d'un même lac sont organisés en plusieurs unités chacune occupant une niche reproductive distincte (Massicotte *et al.* 2008).

Au Québec, une lignée d'hybrides domine la quasi-totalité des lacs de la région des Laurentides tandis que plusieurs lignées distinctes se retrouvent dans les Cantons de l'Est avec généralement plus d'une lignée par lac ou ruisseau (Angers & Schlosser 2007). Cette répartition géographique des lignées suggère la présence d'au moins un génotype généraliste (la lignée des Laurentides) et d'autres lignées spécialistes (les lignées des Cantons de l'Est). À cause du nombre limité des sites échantillonnés dans la région des Cantons de l'Est, il demeure, toutefois, difficile de confirmer que ces lignées ne présentent pas une plus vaste répartition (Angers & Schlosser 2007).

1.8.3. Diversité phénotypique et niches écologiques

Doeringsfeld *et al.* (2004) ont mesuré une variabilité phénotypique aussi importante que celle des espèces parentales chez une même lignée clonale d'hybrides *C. eos-neogaeus*. Cette étude traite de caractères morphologiques tant quantitatifs (tailles, poids, position des nageoires, angle

de la bouche, etc.) que qualitatifs (formules dentaires, configuration de l'intestin). Elle a notamment permis de souligner que les hybrides sont morphologiquement intermédiaires par rapport aux deux espèces parentales. Toutefois, certains hybrides présentent des traits morphologiques très similaires à *C. eos*, tandis que d'autres se rapprochent plus de *C. neogaeus*.

Lorsque retrouvés en sympatrie, il a été suggéré que les hybrides et l'espèce parentale *C. eos* occupent des niches écologiques différentes (Elder & Schlosser 1995). Les hybrides *C. eos-neogaeus* démontrent une moins grande sensibilité au stress relatif aux conditions anoxiques (Schlosser *et al.* 1998) et une charge parasitaires différentes (Mee & Rowe 2006) comparés à *C. eos*. De plus, les hybrides démontrent une fécondité absolue et un taux de croissance plus élevés que les espèces parentales (Mee *et al.* 2013). Ces résultats suggèrent une tolérance potentielle des hybrides à une plus vaste gamme de conditions environnementales due à leur vigueur hybride, leur donnant ainsi la possibilité de coloniser d'autres niches écologiques que celles des espèces parentales (Schlosser *et al.* 1998) et ce, malgré l'absence de variation génétique entre les individus d'une même lignée.

1.8.4. Diversité épigénétique

Il a été proposé que les mécanismes épigénétiques permettent la diversité phénotypique en absence de diversité génétique et favorisent ainsi la persistance des lignées asexuées (Castonguay & Angers 2012). Chez le complexe *C. eos-neogaeus* une variation épigénétique, plus précisément une variation du profil de méthylation, a été observée entre les individus d'une même lignée clonale (Massicotte *et al.* 2011). De plus, ce polymorphisme observé au niveau de la méthylation a été associé à une condition environnementale, soit le pH des sites échantillonnés, indiquant ainsi que les hybrides *C. eos-neogaeus* peuvent répondre à la variation des conditions environnementales *via* la méthylation (Massicotte & Angers 2011).

De ces faits, le complexe d'hybrides *C. eos-neogaeus* constitue donc un modèle d'étude idéal pour l'étude des variations épigénétiques et phénotypiques chez différentes lignées clonales.

1.9. Structure de la thèse

L'analyse d'individus présentant des génotypes similaires ou différents (*i.e.* lignées d'hybrides distinctes) en milieux naturels (sites d'échantillonnage) et contrôlés (aquariums) a permis de décortiquer l'influence de la variation génétique, environnementale et épigénétique sur la variation phénotypique. La thèse se subdivise spécifiquement en cinq chapitres principaux :

1) Origine et répartition des lignées clonales du complexe *Chrosomus eos-neogaeus* :

Sur la base d'analyses génétiques (marqueurs microsatellites et génome mitochondrial), ce premier volet a permis (i) d'identifier les lignées d'hybrides, (ii) de décrire leur répartition et (iii) de déterminer leur origine. La comparaison du génome *C. eos* des hybrides avec une des espèces parentales présente en sympatrie (*C. eos*) a permis de déterminer si les lignées proviennent d'une colonisation postglaciaire ou d'évènements d'hybridation locaux. Dans ce dernier cas, une similarité entre le génome *C. eos* des hybrides et de la population parentale en sympatrie a été observée. Les résultats de ce chapitre ont permis d'établir la répartition géographique de différentes lignées et, ainsi, d'identifier les lignées potentiellement spécialistes ou généralistes, informations essentielles afin d'atteindre les différents objectifs de la thèse.

2) Variation épigénétique et conditions environnementales

Dans ce chapitre, les différentes sources de variation épigénétique ont été déterminées, en évaluant la contribution relative de la génétique, de l'environnement et la part de la stochasticité. Le profil de méthylation a été comparé pour le même génotype présent dans plusieurs environnements, et ce pour plusieurs lignées. En fonction de la prédictibilité des conditions environnementales locales (*e.g.* lacs vs ruisseaux, nature vs milieux contrôlés), nous avons également déterminé quelle stratégie (plasticité phénotypique vs *bet-hedging*) est utilisée par les lignées clonales pour assurer leur persistance. Les résultats de ce chapitre ont permis principalement de répondre au premier objectif établi, à savoir déterminer le rôle de la variation épigénétique dans les différentes stratégies écologiques.

3) Plasticité phénotypique et niches écologiques

L'étendue de la variation phénotypique en absence de variation génétique a été déterminée. Cela a notamment permis d'évaluer la contribution des différentes sources de variation phénotypique

(génétique, interactions épigénétique-environnement et stochasticité) ainsi que d'investiguer l'importance de la plasticité phénotypique dans la diversification des niches. Pour ce faire, la niche trophique des hybrides *C. eos-neogaeus* et d'une des espèces parentales, *C. eos*, a été inférée à l'aide de la morphologie externe de la bouche des individus grâce à des analyses en morphométrie géométrique.

4) Coût de la plasticité phénotypique

En parallèle avec le chapitre précédent, ce chapitre a également permis d'évaluer l'étendue de la variation phénotypique, mais cette fois au niveau des dents et des arcs pharyngiens. Plus particulièrement, il a permis de déterminer si la variation phénotypique observée est le résultat d'une influence environnementale (plasticité phénotypique) ou d'instabilité développementale. La présence d'une symétrie gauche-droite de ce caractère particulier a permis de révéler l'existence d'un coût relié à la plasticité phénotypique chez une lignée plastique, soit une instabilité développementale déterminée par une asymétrie entre les côtés des arcs pharyngiens. Ce chapitre a permis de tester la première hypothèse concernant les facteurs limitant le succès écologique des organismes asexués.

5) Handicap démographique

La seconde hypothèse concernant les facteurs limitant le succès écologique des organismes asexués a été testée dans ce chapitre. Nous proposons une hypothèse de l'existence d'un handicap démographique chez les gynogènes. Une approche théorique, soit l'utilisation de simulations, a permis de comparer l'évolution et la persistance des organismes asexués dans des systèmes où (i) ils ne présentent aucun handicap démographique, (ii) ils présentent un handicap démographique caractérisé par une moins grande fécondité des femelles asexuées, ou (iii) ils présentent un handicap démographique caractérisé par une fécondité équivalente entre les femelles sexuées et asexuées, mais où la moitié de la progéniture des asexuées est stérile. La nuance entre ces deux derniers points est discutée dans ce chapitre.

Chapitre 2 :

ORIGINE ET RÉPARTITION DES LIGNÉES CLONALES

Inconsistent phylogeographic pattern between a sperm dependent fish and its host: *in situ* hybridization vs dispersal

Roland Vergilino*, Christelle Leung* et Bernard Angers

*Co-premiers auteurs

Publié dans *BMC Evolutionary Biology* (2016) 16:183. DOI 10.1186/s12862-016-0754-5

(Format modifié pour les besoins de la présente thèse)

2.1. Résumé et contributions

Contexte : La dépendance des hybrides gynogènes à une espèce sexuée afin d’assurer leur persistance devrait résulter en une organisation spatiale similaire entre les génotypes hybrides et la structure génétique des espèces parentales lorsqu’ils partagent la même histoire biogéographique. Cependant, des événements d’hybridation locaux peuvent brouiller ce signal dans la mesure où les groupes de génotypes d’hybrides pourraient être organisés selon différentes connectivités. Cette étude vise à tester l’hypothèse d’événements d’hybridation locale en comparant les génotypes des hybrides *Chrosomus eos-neogaeus* à la diversité génétique d’une de ses espèces parentales, *Chrosomus eos*.

Résultats : Un échantillonnage réalisé sur un total de 132 sites situés dans deux régions du sud du Québec (ouest et est) a révélé une organisation distincte au niveau des lignées d’hybrides. Une des six lignées détectées à l’ouest présente une grande répartition, se traduisant ainsi par une faible diversité ($\alpha = 1,38$ et $\beta = 4,35$). D’autre part, 36 lignées hybrides ont été détectées à l’est, chacune présentant une répartition géographique restreinte, conduisant ainsi à une diversité

élevée ($\alpha = 2,30$ et $\beta = 15,68$). De plus, une similarité entre le génome *C. eos* de ces hybrides et de la population parentale en sympatrie est observée. Finalement, contrairement aux hybrides, l'espèce paternelle *C. eos* affiche un ρ_{ST} plus élevée dans l'ouest (0,2300) que dans l'est (0,0734).

Conclusion : La diversité génotypique inhabituellement élevée des lignées hybrides dans le sud-est du Québec, ainsi que l'organisation spatiale et la relation génétique étroite avec les populations sympatriques de *C. eos* confirment l'hypothèse selon laquelle des événements d'hybridation multiples se sont produits *in situ*. Ces observations, couplées à l'absence quasi-totale de l'espèce maternelle *Chrosomus neogaeus*, suggèrent que le déclin de cette espèce pourrait être l'événement déclencheur à l'origine du taux élevé d'hybridation *in situ* dans cette région.

RV et CL ont contribué de façon égale à ce travail. Les idées à la base de cet article ont été conçues par CL et BA. L'échantillonnage a été effectué par CL et BA. Les manipulations en laboratoire (identification génétique des individus) ainsi que l'analyse des données ont été effectuées par CL et RV. Tous les auteurs ont participé à la rédaction du manuscrit.

2.2. Abstract

Background: Co-dispersal of sperm-dependent hybrids and their sexual relatives is expected to result in consistent spatial patterns between assemblages of hybrids and genetic structure of parental species. However, local hybridization events may blur this signal as assemblages could be organized under different connectivity constraints. This study aims at testing the hypothesis of local hybridization events by comparing the assemblage of hybrid fish *Chrosomus eos-neogaeus* to the genetic diversity of one of its parental species, *Chrosomus eos*.

Results: An extensive survey performed on a total of 132 sites located in two regions of Southern Quebec (West-Qc and East-Qc) revealed a distinct organization of hybrid lineages. One of the six hybrid lineages detected in West-Qc is widespread throughout this region resulting in a low α -diversity (1.38) and β -diversity (4.35). On the other hand, 36 hybrid lineages were detected in East-Qc and displayed narrow geographic distributions leading to a high α -diversity (2.30) and β -diversity (15.68). In addition, the *C. eos* multilocus haplotype of several of these hybrids is assigned to their respective sympatric *C. eos* population. Finally, contrasting

with hybrids, the paternal species *C. eos* displayed a higher ρ_{ST} in West-Qc (0.2300) than in East-Qc (0.0734).

Conclusion: The unusually high diversity of hybrid lineages in East-Qc as well as the spatial organization and the close genetic relationship with *C. eos* sympatric populations support the hypothesis that multiple hybridization events occurred *in situ*. These findings coupled to the near absence of the maternal species *Chrosomus neogaeus* suggest that the decline of this species could be the trigger event at the origin of the high rates of spontaneous hybridization in this region.

Keywords: Local hybridization events, gynogenesis, *Chrosomus eos-neogaeus*, population genetics, spatial autocorrelation, sperm-dependence, host-parasite

2.3. Background

If contemporary evolutionary forces and current landscape elements contribute to the spatial organization of genetic diversity (Manel *et al.* 2003, Wofford *et al.* 2005, Coulon *et al.* 2006, Neville *et al.* 2006, Dionne *et al.* 2008, Whiteley *et al.* 2010), historical factors such as geological events, glacial cycles and post-glacial dispersal are also known to play a major role in shaping current species distributions (Hewitt 1996, Bernatchez & Wilson 1998, Poissant *et al.* 2005, Wilson & Veraguth 2010). Because all these factors act independently on species populations, two unrelated species are not expected to display a similar genetic structure except if they have been equally influenced by the action of important geological processes (*e.g.* vicariance; Arbogast & Kenagy 2001, Aubry *et al.* 2009, April *et al.* 2013) or are linked by strong ecological associations (*e.g.* host–parasite; Prugnolle *et al.* 2005, Poulin *et al.* 2011, Cyr *et al.* 2012, Laurin-Lemay *et al.* 2013).

In Metazoans, organisms resulting from interspecific hybridization are often associated with asexual reproduction and lead to the formation of all-female unisexual lineages (Vrijenhoek 1989, Dowling & Secor 1997, Simon *et al.* 2003, Kearney 2005, Bengtsson 2009). Gynogenesis is the most frequent mode of reproduction observed in unisexual vertebrates (Vrijenhoek *et al.* 1989, Beukeboom & Vrijenhoek 1998, Lamatsch & Stöck 2009) and is present in fishes and amphibians (Lamatsch & Stöck 2009, Neaves & Baumann 2011). Clonal

reproduction could result in the competitive exclusion of the parental species population by the asexual hybrids (Rhymer & Simberloff 1996, Quilodrán *et al.* 2015) benefiting from demographic advantages (the so-called "Two-fold cost of sex"; Maynard Smith 1978). In addition, asexual hybrids avoid outbreeding depression by perpetuating the F1 generation and the benefits of heterosis (Schultz 1971). However, gynogenesis, also called sperm-dependent parthenogenesis, requires the sperm of either parental species to trigger embryogenesis (Schlupp 2005). Sperm-dependent unisexual organisms are therefore closely tied to parental species for their persistence and are restricted to the geographic range of their sexual host (Schlupp *et al.* 2002).

Hybrids and their ecological relationships with parental species are of great importance to the study of evolution (Stebbins 1959, Lewontin & Birch 1966, Stebbins 1985, Dowling & Secor 1997, Mavárez & Linares 2008) and conservation biology (Rhymer & Simberloff 1996, Allendorf *et al.* 2001, Seehausen 2006). Hybridization also plays a substantial role in ecological differentiation (Rieseberg *et al.* 2003, Gompert *et al.* 2006) and species diversification (Dowling & Secor 1997, Schwenk *et al.* 2008, Stelkens & Seehausen 2009, Yakimowski & Rieseberg 2014). Studying the evolution of gynogenetic organisms is key in order to assess how genomes without recombination deal with genetic decay and what ecological and behavioural processes may create and maintain stable coexistences between sexual and sperm-dependent unisexual organisms (Schlupp 2005). Elucidating when and how often gynogenetic hybrid clones originate is particularly important as a prerequisite to approach these topics. However, uncovering the origin of hybrids often represents a challenging task (Otto & Whitton 2000, Linder & Rieseberg 2004, Mable 2004, Seehausen 2004).

This study aims at assessing the origin of sperm-dependent hybrid lineages by comparing the distribution of hybrids with one of their parental species. We used fishes from the *Chrosomus eos-neogaeus* complex (Cyprinidae; Teleostei) that includes paternal species northern redbelly dace *Chrosomus eos*, maternal species finescale dace *Chrosomus neogaeus* and gynogenetic hybrids *Chrosomus eos-neogaeus* (Goddard *et al.* 1989, Goddard *et al.* 1998). While these hybrids are widely distributed in North-America, previous studies reported a low number of hybrid lineages and the presence of the same lineage in different hydrographic networks, suggesting few hybridization events predating the end of the Pleistocene (Elder & Schlosser

1995, Angers & Schlosser 2007). However, the presence of distinct hybrid lineages within a drainage basin in the Eastern region of Quebec (Canada) raises new questions on the origin and diversity of hybrid lineages (Angers & Schlosser 2007).

In freshwater environments formerly covered by glaciers, the period during which hybridization events occurred relative to the Pleistocene-Holocene boundary strongly shaped current patterns of diversity at the regional scale (Angers & Schlosser 2007). Given the ecological dependence of gynogenetic hybrids to their parental species, different predictions could be formulated depending on whether hybridization events occurred in glacial refuges, during the Pleistocene, or *in situ*, during the Holocene.

Hybrids produced during the Pleistocene may have benefited from the pro-glacial lakes and temporary bridges among hydrographic networks (Bernatchez & Wilson 1998, Janko *et al.* 2005, Gagnon & Angers 2006, Neville *et al.* 2006, April *et al.* 2013) to spread throughout drainage basin(s) of one particular region (Angers & Schlosser 2007). This would have resulted in homogeneity in the initial assemblage of hybrids across drainage basins. Following colonization, isolation of hydrographic networks and the process of lineage sorting may have resulted in different patterns according to the number of lineages in the founder group. Whereas the dispersal of a single lineage would result in a homogeneous distribution of the same genotype across drainage basins (Quattro *et al.* 1992, Cunha *et al.* 2004, Janko *et al.* 2005, Angers & Schlosser 2007), colonization by multiple lineages would provide a patchwork of assemblages with narrower geographic distribution and lineages present in multiple assemblages. On the other hand, hybridization events may have occurred during the Holocene in conditions similar to the current landscape where each hydrographic network is isolated from each other. These assemblages of hybrids are expected to have a narrow geographic distribution (Quattro *et al.* 1991) but should harbor assemblage-specific lineages even in the absence of corresponding genetic structure in parental species. Both colonization by multiple lineages and local hybridization events are expected to produce a pattern of spatial autocorrelation limited by very short distances for the distribution of hybrid lineages. However, these scenarios can be discriminated, as only the multilocus genotypes from *in situ* hybridization events are expected to match the genetic diversity in the sympatric parental populations.

In this study, we report the results of an extensive survey of 132 sites from two regions (West-Qc and East-Qc) of Southern Quebec (Canada). We determined the diversity of hybrid lineages and the genetic diversity of parental species. Spatial autocorrelation analysis and assignment tests were performed to assess the hypothesis that hybrids were produced *in situ*.

2.4. Methods

2.4.1. Sampling and identification

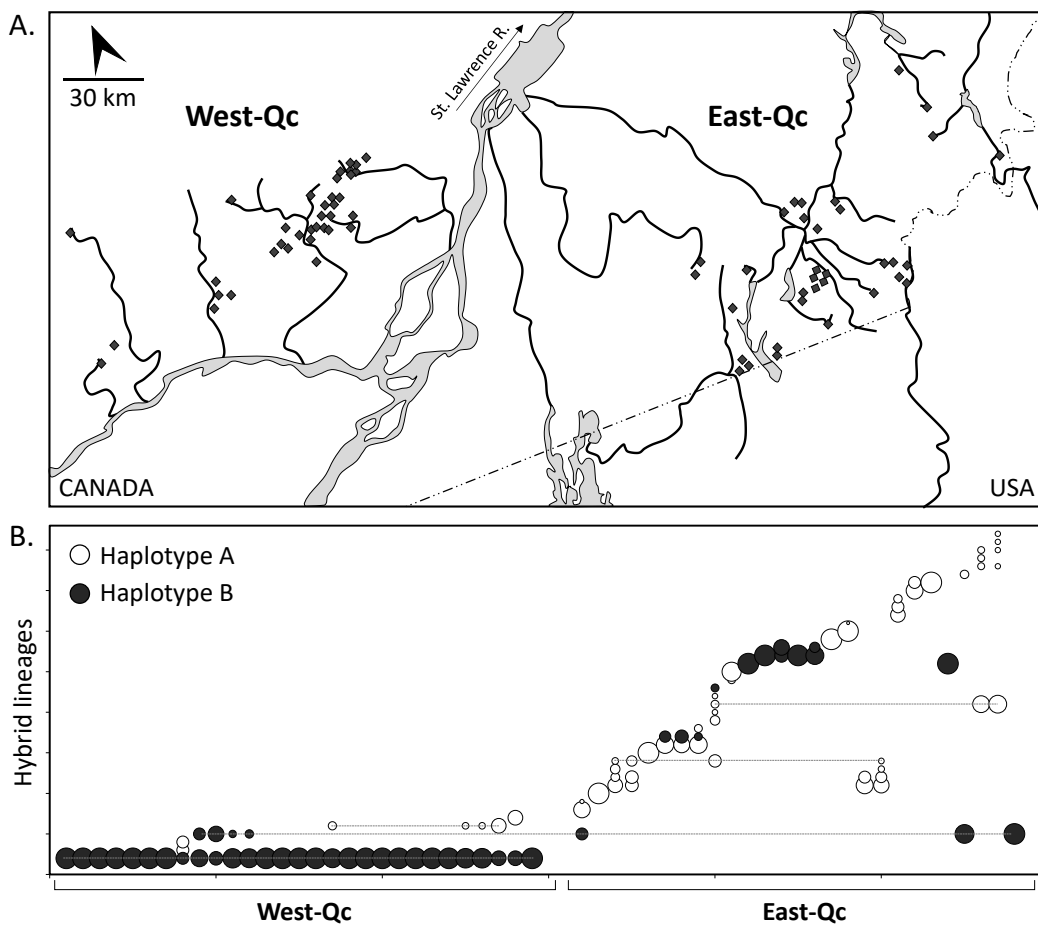


Figure 2.1. Distribution of individuals from *C. eos-neogaeus* complex. (A) Map of Southern Quebec (Canada) where *C. eos*, *C. neogaeus* and/or hybrid *C. eos-neogaeus* individuals were detected (refer to Table 2.S1 for the complete list of sampled sites). (B) Lineage distribution in West- and East-Qc. Sites follow the same order than Table 2.S1; circle areas refer to the relative abundance of lineages within a given site; horizontal lines connect lineages that are found in sites distant by more than 7 km.

A total of 132 sites were sampled throughout two regions in Southern Quebec (Canada) including 63 sites in the Laurentians region (West-Qc) and 69 sites in the Eastern Townships (East-Qc) that span areas of approximately 3,800 km² and 4,000 km² respectively (Figure 2.1.A, Table 2.S1). Sampled individuals were identified visually as *Chrosomus sp.* according to external morphological characteristics (New 1962). Morphological identification was confirmed using genetic markers. DNA was extracted from the upper lobe of the caudal fin and genetic identification of the different biotypes of the *C. eos-neogaeus* complex was performed according to Binet & Angers (2005).

2.4.2. Analysis of hybrid lineages

For each individual, a multilocus genotype was defined using the size variation of an intron of the PEG1/MEST gene as well as six microsatellite loci [Pho-1, Pho-2, Pho-60, Pho-61, Ca-12 and Seat-412 (Binet & Angers 2005, Skalski & Grose 2006, Angers & Schlosser 2007)] amplified according to Angers and Schlosser (2007). Pho-1, Pho-2, Pho-60, Pho-61 are specific to the *C. eos* genome while PEG1/MEST, Ca-12 and Seat-412 amplify both *C. eos* and *C. neogaeus* genomes leading to a total of ten nuclear loci for hybrid genotypes. *Chrosomus eos* and *C. neogaeus* alleles of hybrid genotypes could be distinguished for PEG1/MEST and Ca-12 loci, but not for Seat-412 for which allelic size ranges overlap between parental species. This locus was then excluded from the analyses that required *C. eos* genotypes.

A hybrid lineage is defined as all individuals originating from a given hybridization event (2007). In the absence of recombination and segregation, individuals of a given lineage were thus expected to display the same multilocus genotype. However, variants could be detected due to the high mutation rate of microsatellite loci. They generally differ by a single mutation at one or a few loci (Angers & Schlosser 2007). A given lineage is therefore characterized by a consensus genotype defined by the allele of invariant loci and the more abundant allele for the variable loci.

Triploid hybrids are abundant in the *Chrosomus eos-neogaeus* complex (Goddard *et al.* 1998). They are exclusively produced *de novo* following the incorporation of the spermatozoid genome into a diploid hybrid egg (Goddard *et al.* 1989). Since genotypes of triploid individuals include the consensus multilocus genotype of a given hybrid lineage in addition to the

spermatozoid haplome, it is possible to unambiguously identify the lineage from which triploid individuals derived. In the absence of a match between a triploid genotype and consensus lineages, this genotype is considered as an additional lineage. However, it becomes impossible to discriminate the *C. eos* multilocus hybrid haplotype from the spermatozoid haplome in lineages represented by a single triploid individual.

The hybrid lineages were further characterized at the mitochondrial level using a fragment of the cytochrome oxidase I (COI) gene to test the hypothesis of a unique vs multiple hybridization events. Amplifications were carried out using 5'-CCAGTGTTAGCAGCCGGAAT and 5'-GGGTGTCTACGTCTATGCC primers. PCR amplicons were differentiated using the SSCP (Single-Stranded Conformation Polymorphism) method (Orita *et al.* 1989) and variants were sequenced.

We infer genetic relationships among hybrid genotypes to assess whether they are derived from single or multiple hybridization events. The clonal distance (Meirmans & Van Tienderen 2004) was used to assess the number of pairwise differences over all microsatellite loci, except Seat-412, according to a stepwise mutation model (SMM). An unrooted Neighbor-Joining tree was constructed using the derived distance matrix. Assuming a SMM model, if the distinct hybrid lineages derived from a single clone, the unrooted tree should have a star-like conformation with short external branches.

Regional diversity of hybrid lineages was assessed by calculating α - and β -diversity. The degree of uniqueness in terms of their lineage composition was assessed with the Local Contribution to Beta Diversity (LCBD) index (Legendre & Cáceres 2013) for each site. LCBD values were computed using abundance-based Jaccard coefficient (Chao *et al.* 2006) and tested using 999 permutations to identify sites that contributed the most to the beta diversity index throughout the sampling area (Legendre & Cáceres 2013).

Mantel correlograms were also constructed to establish the spatial distribution of distinct hybrid lineages for each region (East-Qc and West-Qc). This analysis was used to determine whether sites closer geographically displayed higher similarity in their lineage composition (Oden & Sokal 1986, Legendre & Legendre 1998). Historical processes are not well characterized by elements of the current landscape (Boizard *et al.* 2009), especially when the

sampling sites are located in the headwaters of distinct hydrographic networks. Moreover, temporal interconnections may exist between two sites from distinct hydrographic networks (Boizard *et al.* 2009, Cyr & Angers 2011); we therefore used straight line distance between sites in addition to waterway distance. Binary (presence/absence) dissimilarity values among sites were used as a dependent variable and geographic distance matrix as an independent variable. Number of distance classes were determined according to Sturges' rule and Mantel statistics were tested with 999 permutation using the correction for multiple tests proposed by Holm (1979). Dissimilarity calculations, Mantel correlograms, and permutations tests were performed using the *vegan* package (Oksanen *et al.* 2015) for the R 3.2.2 software.

2.4.3. Analysis of parental species

Populations of parental species *C. eos* were analyzed using the same nuclear markers than those used for hybrids. For each population, 7 to 25 individuals were genotyped (Table 2.S2). Allele frequencies for each locus and genetic diversity (H_E) were calculated using FSTAT v.2.9.3 (Goudet 1995). Linkage disequilibrium between locus and departure from Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each and all nuclear loci for each population and significance was assessed by 10,000 iterations using GENEPOP v.4.2 (Raymond & Rousset 1995, Rousset 2008). Sequential Bonferroni corrections were applied to all multiple comparisons (Rice 1989).

A Principal Component Analysis (PCA), as implemented in the *ade4* package (Jombart 2008, Jombart & Ahmed 2011) for the R 3.2.2 software was realised to assess the organization of the genetic diversity among *C. eos* populations. To infer population differentiation, allelic differentiation over all loci and between populations was quantified by computing Weir and Cockerham's (1984) estimator of pairwise $F_{ST}(\theta)$ based only on the allelic diversity and Michalakis and Excoffier's (1996) estimator of pairwise $Rho_{ST}(\rho_{ST})$ taking into account allelic size using ARLEQUIN v. 5 (Excoffier *et al.* 2005). Significance of pairwise differences was assessed by 1,000 permutations. The comparison of F_{ST} and ρ_{ST} , which behave differently with regard to mutation, allows to make historical and demographical inferences on population differentiation processes (Rousset 1996, Hardy *et al.* 2003). We estimated $pRho_{ST}$ (ρ_{ST} computed after allele size permutation; Hardy *et al.* 2003) to test if the mutation process has contributed to population differentiation using the allele size permutation test with 20,000

randomization assuming that the loci analyzed follows an SMM-like model as implemented in SpaGeDi v.1.5 (Hardy & Vekemans 2002). A hierarchical analysis of genetic variation (AMOVA) implemented in ARLEQUIN v. 5 (Excoffier *et al.* 2005) was applied using both F_{ST} and ρ_{ST} to quantify the amount of genetic variance explained by the subdivision in regions (West-Qc and East-Qc) over the total genetic variance. Mantel correlograms were also constructed for *C. eos* populations from each region (East-Qc and West-Qc) by using Cavalli-Sforza and Edward's D_{CE} genetic distance (Cavalli-Sforza & Edwards 1967, Edwards 1971) as a function of both straight line and waterway distances.

2.4.4. Assignment of the hybrid lineages

Assignments of hybrid lineages to *C. eos* populations was performed using all *C. eos* nuclear loci, except Seat-412. The likelihood that the *C. eos* multilocus haplotype of hybrid lineages originated from a given *C. eos* population was computed using the method based on allele frequencies (Paetkau *et al.* 1995). The frequency of missing alleles was set at 10^{-5} and the probability was estimated by simulating 10,000 individuals based on the algorithm Cornuet *et al.* (1999), using the method implemented in GeneClass2 (Piry *et al.* 2004). A percentage score for each population was calculated by dividing the assignment likelihood of each population by the sum of likelihoods across all populations tested.

2.5. Results

2.5.1. Distribution of biotypes

Members of the *Chrosomus eos-neogaeus* complex (*C. eos*, *C. neogaeus* and/or hybrids) were captured in 70 of the 132 sampled sites, more specifically in 36 (57.14%) sites in West-Qc and 34 (49.28%) sites in East-Qc. The maternal species *Chrosomus neogaeus* was nearly absent from both regions as successful captures of this species were restricted to three sites (AS-3, SF-12 and CH-1, Table 2.S1). Because *C. neogaeus* has been sampled at multiple occasions at sites AS-3 and SF-12, we can exclude particular behaviours or habitat specificity that could hamper its capture and assume a very low abundance of this species through the sampled area. The

paternal species *C. eos* and hybrid individuals were respectively sampled in 27 and 29 sites in West-Qc and 24 and 27 sites in East-Qc (Figure 2.1, Table 2.S1).

The paternal species *C. eos* and hybrid individuals were sympatric in 37 sites (20 in West-Qc and 17 in East-Qc). A total of 14 sites (7 in each region) contained exclusively *C. eos* individuals. Hybrids were detected in absence of parental species in 18 sites (9 in each region). However, this should be interpreted with caution as the low number of captures at those sites (< 6 individuals) reduces the probability of detecting parental species.

2.5.2. Diversity of hybrid lineages

The genetic survey of hybrid individuals revealed a high diversity of genotypes that could be clustered in 41 distinct consensus genotypes. As observed in previous studies (Angers & Schlosser 2007), several genotypes differed from a consensus by a single or a few mutations (Tables 2.S1 and 2.S3). Two distinct mitochondrial haplotypes were detected over all hybrid lineages. Sequencing allowed recovery of the A and B haplotypes found by Angers and Schlosser (2007) (NCBI accession numbers [EU014286] and [EU014287] respectively). These haplotypes differ by a single bp out of 685 bp which corresponds to a divergence of 0.15%. Haplotypes A and B were associated to 34 and 7 distinct hybrid genotypes respectively (Figure 2.1.B, Table 2.S1).

Of the 41 hybrid lineages, 15 were represented by a single triploid individual (Table 2.S3) for which it was impossible to characterize the hybrid genotype. Analysis of the remaining 26 hybrid multilocus genotypes specific to the paternal *C. eos* species (Table 2.S3) revealed a high allelic diversity, ranging from 9 (Ca-12) to 15 (Pho-1 and Pho2) alleles. This represents an average of 10.5 alleles/loci and a Nei's gene diversity ranging from 0.815 (Ca-12) to 0.954 (Pho1), values that are similar to the ones measured within *C. eos* populations. The Neighbor-Joining tree of the multilocus genotypes (6 loci) of these 26 hybrid lineages showed long internal branches and did not exhibit a star-like topology (Figure 2.2). Lineages did not cluster according to regions, mitochondrial haplotypes or alleles at the intron of the PEG1/MEST gene. There was an average of 50.65 (± 21.73) stepwise mutations among consensus genotypes and up to 122 mutations between the most distant genotypes. On the other hand, the average number of pairwise differences within-lineage estimated on all lineages with more than a single individual

was 3.65 (± 2.50) stepwise mutations. In addition, variants of the mitochondrial and PEG1/MEST loci appeared to segregate independently and this topology requires four homoplasious mutations occurring on each of these markers. Altogether, this confirms that the diversity of hybrids is not the result of the diversification of one (or few) clone(s) via mutation process but originated from distinct hybridization events.

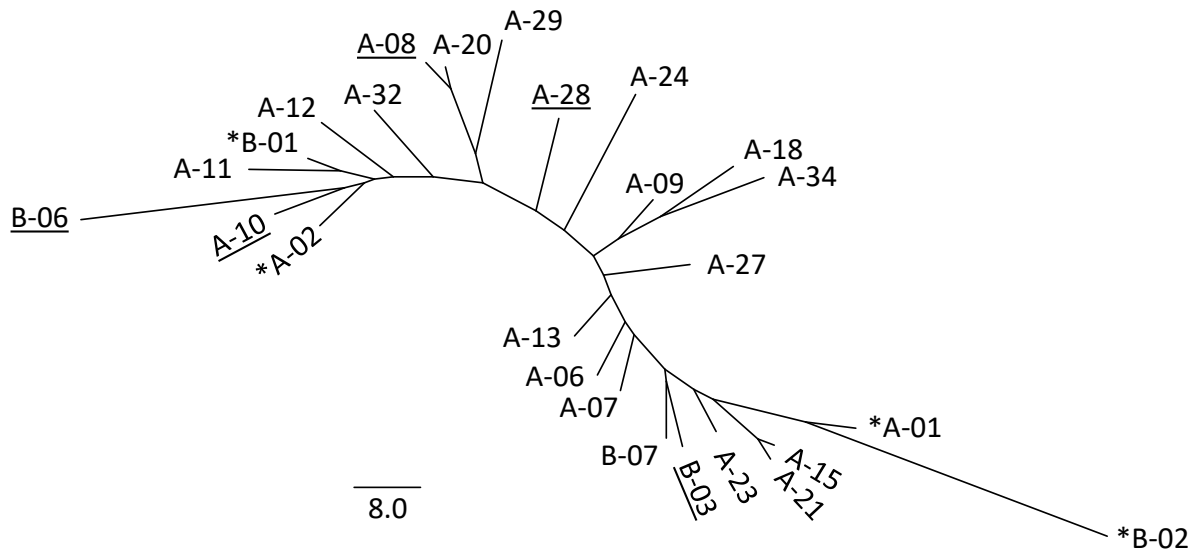


Figure 2.2. Relationships among hybrid lineages. Neighbor-Joining tree inferred from clonal distances calculated from microsatellite loci among the consensus genotypes of 26 hybrid lineages. Lineages are identified according to mitochondrial haplotypes (A or B), regions (asterisk refers to West-Qc) and *C. eos* alleles at PEG1/MEST locus (underlined or not)

The diversity of hybrid lineages was highly different between the two regions: sites in West-Qc ($0.0083 \leq \text{LCBD index} \leq 0.0192$) were less unique and diverse than those in East-Qc ($0.0243 \leq \text{LCBD index} \leq 0.0269$) and only sites from East-Qc contributed significantly (LCBD, $P < 0.05$) to the total β -diversity. Only 6 lineages were detected in West-Qc; 1 lineage was widespread and detected in all of the 29 sampling sites containing hybrids. Other lineages were limited to a single site or a few geographically close sites (Figures 2.1 and 2.3). This led to a very low α -diversity (1.38) as well as β -diversity (4.35). On the other hand, 36 lineages were detected in the 27 sampling sites containing hybrids in East-Qc (Figures 2.1 and 2.3). These lineages displayed a narrow geographic distribution and up to six lineages were found in

sympatry. This led to a higher α -diversity (2.30) and β -diversity (15.68) than observed in West-Qc. The geographically close sites harbouring similar hybrid diversity could be grouped into 15 assemblages of hybrids. Only 3 lineages were detected in distinct assemblages (A-09; A-15; B-02). Interestingly, the B-02 hybrid lineage was found in both West-Qc (sites AS-12 and AS-13; AS-14; AS-15; AS-16) and East-Qc (sites YA-1, SF-19, and SF-22) (Table 2.S1).

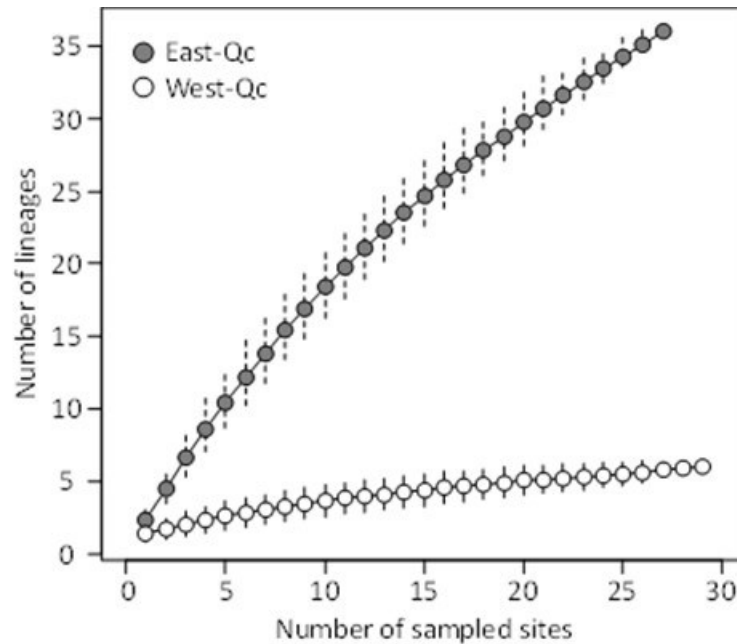


Figure 2.3. Lineages richness of West-Qc and East-Qc. Mean lineages accumulation curve according to sampled sites and standard deviation were estimated according to random permutations without replacement (Gotelli & Colwell 2001).

The assemblage of hybrids was similar among geographically close sites (*e.g.* within a given minor drainage), but were completely different as distance increases in East-Qc. Therefore, strong and significant positive spatial autocorrelations were observed for the first distance class using both straight or waterway distances (Figure 2.4), indicating that similar lineages were observed in close sites (< 7 km for straight line distance, 15 km for waterway distance) compared to more distant sites.

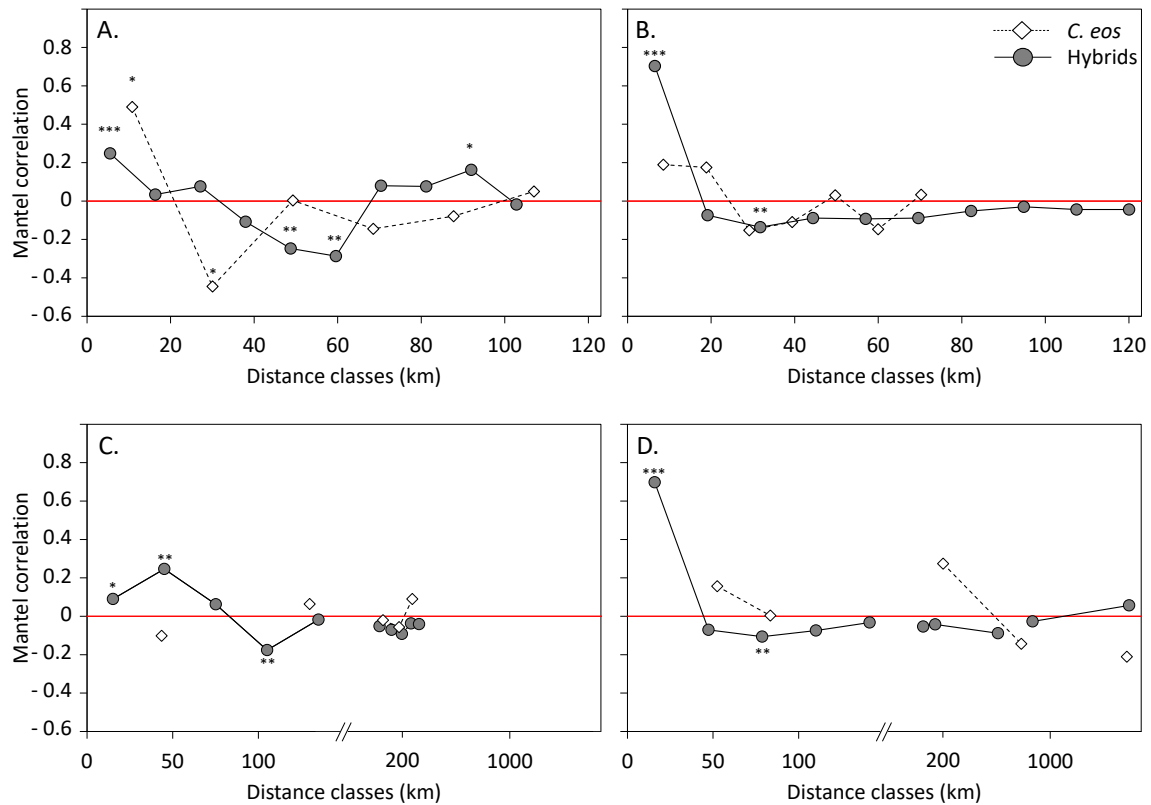


Figure 2.4. Mantel correlograms of the distribution of the hybrid lineages and *C. eos*. Jaccard distance and Cavalli-Sforza and Edward's D_{CE} genetic distance were used to assess the differences among sites respectively for hybrid lineages and *C. eos* populations. Straight line distance in (A) West-Qc and (B) East-Qc and waterway distance in (C) West-Qc and (D) East-Qc. Stars indicate significant autocorrelation values: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$ after Holm corrections.

Significant positive autocorrelations were also detected in West-Qc for the first distance classes (< 7 km for straight line distance, 16 and 47 km for waterway distance; Figure 2.4). The difference observed between straight line and waterway distances suggests the presence of historical and/or contemporary inter-connections between drainages for the West-Qc.

The correlation value was significantly higher for straight line distance in East-Qc ($r = 0.703$) compared to West-Qc ($r = 0.248$) (Fisher's $z = 4.1918$, $P < 0.0001$), as well as for waterway distance in East-Qc ($r = 0.6977$) compared to West-Qc (first distance class: $r = 0.0901$; Fisher's $z = 4.1119$, $P < 0.0001$; second distance class: $r = 0.2463$, Fisher's $z = 2.8310$, $P = 0.0023$; Fisher 1925).

2.5.3. Characterization of *Chrosomus eos* populations

Chrosomus eos populations were characterized according to 16 sites for which more than 7 individuals were sampled. High allelic diversity was observed for those populations, with the number of alleles per locus ranging from 25 (Ca-12) to 32 (Pho-1). An average of 10.76 alleles/locus/site and 0.88 for Nei's gene diversity (H_E) were observed (Table 2.1). The number of alleles and Nei's gene diversity were not significantly different between regions ($P > 0.240$).

Table 2.1. Genetic diversity in hybrid *Chrosomus eos-neogaeus* and in the sexual species *Chrosomus eos* between West-Qc and East-Qc regions.

Hybrids <i>C. eos-neogaeus</i>					
	N sites (n)	N lineages	α -diversity	β -diversity	
West-Qc	29 (346)	6	1.38	2.30	
East-Qc	27 (340)	36	4.35	15.68	
Total	56 (686)	41	1.82	22.51	
<i>Chrosomus eos</i> populations					
	N sites (n)	k	H_S	F_{ST}	ρ_{ST}
West-Qc	7 (132)	23.33	0.8653	0.0740	0.2302
East-Qc	9 (118)	25.27	0.8913	0.0327	0.0734
Total	16 (250)	28.33	0.8799	0.0579	0.1663

Number of sites and total number of individuals analysed is provided. For hybrids, diversity is represented by the number of lineages as well as α - and β -diversity. Diversity of the sexual species is given in number of alleles (k), mean of Nei's gene diversity, F_{ST} and ρ_{ST} .

No significant linkage disequilibrium between loci has been detected (Fisher's method, $P > 0.937$). Global H-W test revealed four populations from West-Qc (AS-5, AS-17, BA-1, RO-1) showing a significant deviation from H-W expectations (using sequential Bonferroni corrections). This was mainly due to a deficiency of heterozygotes at the microsatellite locus Pho-2. When this locus was excluded from the analysis, no further significant deviation from H-W expectations is detected.

Populations were genetically different as only 15 of the 120 pairwise comparisons were not significant (using sequential Bonferroni corrections). All of them involved populations from East-Qc. The PCA analysis revealed a very important overlap among all populations (Figure

2.5), as a result of a low global F_{ST} (0.0579) and p_{ST} (0.1663). Three populations from West-Qc (AS-17, AS-1, NO-10; Figure 2.5) were different from the rest. The difference of F_{ST} between regions (West-Qc: 0.0739; East-Qc: 0.0327) was not significant ($P = 0.180$) but allele size permutation tests performed on p_{ST} (West-Qc: 0.2300; East-Qc: 0.0734) provided a significant result ($P < 0.0005$).

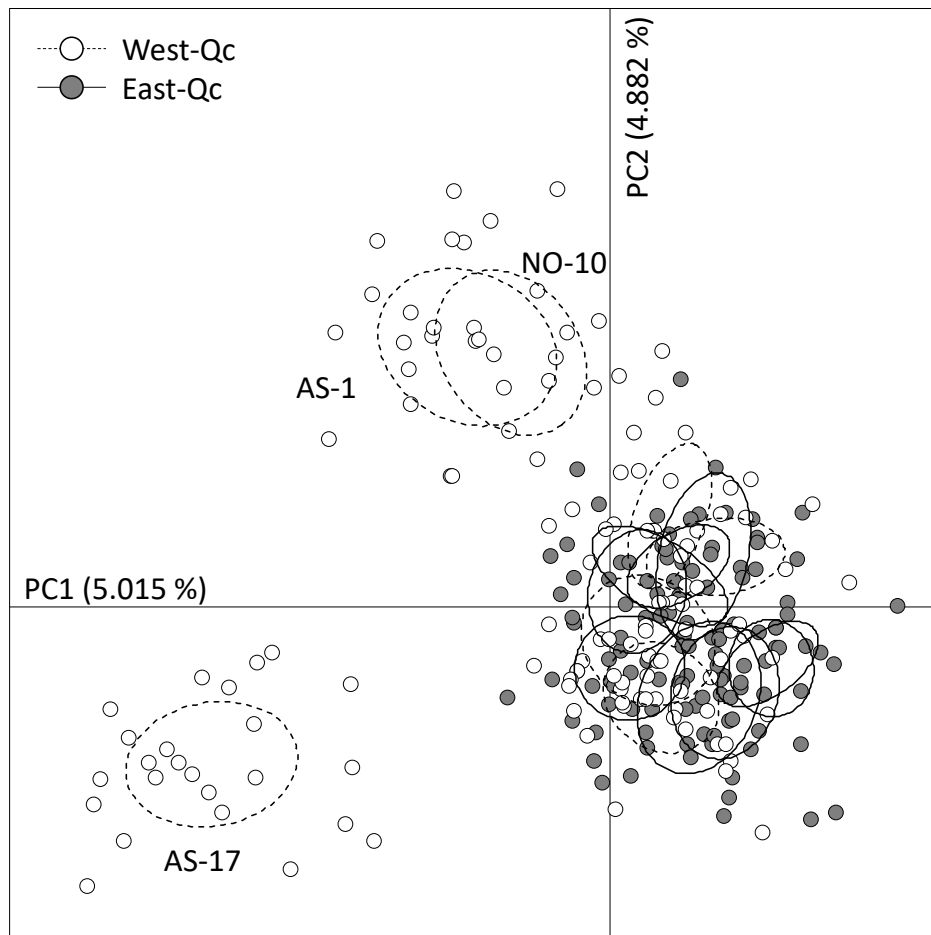


Figure 2.5. Results of principal component analysis of *C. eos* population genetics. Open and black circles refer to populations of West-Qc and East-Qc respectively. Only the most divergent populations are identified.

The lack of spatial patterning between regions was supported by hierarchical analyses of genetic variation (AMOVA) using either allele diversity ($F_{CT} = 0.00291$, $P = 0.23949$) or allele size diversity ($\rho_{CT} = 0.01620$, $P = 0.23656$). Moreover, Mantel tests revealed no significant isolation-by-distance patterns, neither for the whole area ($R^2 = 0.0137$, $P = 0.132$) nor within

each region (West-Qc: $R^2 = 0.0284$, $P = 0.266$; East-Qc: $R^2 = 0.0337$, $P = 0.146$). A significant positive spatial autocorrelation signal is detected in the first distance class in West-Qc but only for straight line distance (Figures 2.4.A and 2.4.C). This result was mostly due to the populations AS-1 and NO-10 that were genetically similar one to each other but highly divergent from the other populations; both populations are geographically close but in distinct hydrographic networks (Figures 2.4.A et 2.5). On the other hand, no significant spatial autocorrelation was observed for the East-Qc populations (Figures 2.4.B and 2.4.D). This result reflects a uniform distribution of alleles in *C. eos* populations, that strongly contrasts with the distribution of hybrid assemblages.

2.5.4. Assignment of hybrid lineages to *Chrosomus eos* populations

Because assignment tests are sensitive to sample size, sites geographically close and harboring the same assemblage of hybrids were pooled together. A total of 18 hybrid lineages are found at these sites (Table 2.2). However, 3 of them were represented by a single triploid individual and were excluded from this analysis because of our incapacity to infer the *C. eos* haplotype (Table 2.S3). Ten of the 12 lineages exclusive to East-Qc were assigned with a high probability to their respective sympatric *C. eos* population and 9 of them with the highest score over all sites (Table 2.2). Lineage A-01 exclusive to West-Qc was assigned with the higher score to East-Qc populations while lineage B-01 was assigned to one of the three sympatric *C. eos* populations with the highest score. The B-02 lineage detected in both regions was assigned to its sympatric *C. eos* population in East-Qc but not in West-Qc.

Table 2.2. Results of the assignment of hybrid lineages to the *Chrosomus eos* populations.

Lineages	East-Qc							West-Qc						
	CO-1 SF-14 n=23	RI-2 RI-4 n=22	SF-12 n=17	SF-2 n=11	YA-1 n=18	SF-4 n=17	SF-10 n=10	RO-1 n=11	AS-1 n=16	AS-16 n=12	NO-10 n=19	AS-5 n=25	AS-17 n=24	BA-1 n=25
A-06	99.60											0.40		
A-07	50.62			19.53	7.13	22.67								0.02
A-08		4.92		12.26		82.80								
A-09	89.65	0.08		10.22										
A-11				12.83	87.17									
A-12		10.81		18.86	24.03	12.22				23.67				
B-03	0.08	99.92												
A-18			70.65	13.01						16.33				
A-27				70.34								29.64		
A-34		9.04				73.69			15.79					1.28
B-06								99.94	0.03					
B-07	33.94					15.78	50.17			0.05				
B-02				11.23		46.93								41.85
A-01	47.35	0.04						52.49						
B-01	40.33							6.62			52.78	0.25		

Assignment score of the *C. eos* genotype for the 15 hybrid lineages detected to a given *C. eos* population (Table 2.S1). Shaded indicated site(s) where hybrid lineage was detected. Bold number refers to a probability of 100% that a given lineage belongs to a reference population.

2.6. Discussion

The joint analysis of *C. eos-neogaeus* hybrid diversity and the paternal species *C. eos* populations genetic diversity in two regions of southern Quebec revealed two striking results. First, a highly distinct geographic organization of the assemblages of hybrids was observed between the two regions. Second, in spite of the sperm dependence of hybrids, there was a lack of correspondence between the spatial organization of hybrid lineages and the genetic diversity of paternal species *C. eos*, this was especially clear in East-Qc.

2.6.1. Uniform distribution of *Chrosomus eos*

The results revealed a lack of population structure for the *C. eos* species in the studied areas. Even the separation of both regions by the St-Lawrence River had a limited impact on the phylogeographic structure of *C. eos* populations as less than 2% of the total genetic variance was explained by the subdivision in regions. Drainage basins did not seem to explain population genetics structure of *C. eos* either. Although allele frequencies of most populations were significantly different, the differentiation was limited and only three populations from West-Qc were clearly distinct from the other populations. Such organization of the genetic diversity suggests that most of the *C. eos* populations likely dispersed through temporary hydrologic bridges from one single founding group after the ice-sheet retreated (Gagnon & Angers 2006, April *et al.* 2013).

2.6.2. Contrasting patterns in hybrid diversity

The hybrids sampled in this study were highly diverse with 41 distinct hybrid lineages. The number of stepwise mutations among genotypes was 14 times larger than the average number of pairwise difference within lineage. In addition, phylogenetic relationships among hybrids revealed that lineages did not cluster according to variants of the mitochondrial and PEG1/MEST loci. These results rule out the probability of derived clones from a unique hybridization event and suggest hybrid lineages have been produced through distinct hybridization events (*e.g.* Vollmer & Palumbi 2002, Delmotte *et al.* 2003, Vergilino *et al.* 2011). This high diversity contrasts with previous studies on *Chrosomus eos-neogaeus* reporting a

single or a few lineages within a given region (Goddard *et al.* 1989, Elder & Schlosser 1995, Angers & Schlosser 2007).

The striking difference in the distribution of hybrid lineage diversities between the two regions likely reflects distinct scenarios in the origin and colonization of hybrid lineages in West-Qc and East-Qc. In West-Qc, the widespread distribution of the B-01 hybrid lineage leads us to conclude, as previously stated by Angers and Schlosser (2007), that this lineage occurred during the Pleistocene period and has colonized the sites of West-Qc via pro-glacial temporary drainages. This pattern has been observed previously, including in the *Chrosomus eos-neogaeus* complex (Elder & Schlosser 1995, Angers & Schlosser 2007) and is common in sperm-dependent unisexual hybrid species (Quattro *et al.* 1992, Cunha *et al.* 2004, Janko *et al.* 2005).

The narrow distribution of the other lineages specific to West-Qc (A-02, A-03 and A-04) is however more difficult to interpret in a context of postglacial colonization. If a postglacial colonization appears unlikely, these hybrid lineages are good candidates for the hypothesis of locally produced hybrids in West-Qc. These lineages have a narrow distribution similar to the one observed in the assemblages of hybrids of East-Qc, they were always in sympatry with the B-01 lineage and two of these additional lineages occurred in the same site while most of the West-Qc sites harbored only a single lineage.

Contrasting with the homogeneity of West-Qc, 15 distinct assemblages of hybrids composed of 36 distinct lineages were observed in East-Qc. Except for three lineages that could be found in assemblages distant by more than 7 km using straight line distance (15 km using waterway distance), most assemblages harbored specific lineages and had a narrow distribution leading to highly significant positive spatial autocorrelation patterns. Assignment tests revealed a close genetic relationship between hybrids from East-Qc and sympatric *C. eos* populations as most of the hybrids tested were assigned to their respective *C. eos* population. In addition to the large diversity and the positive spatial autocorrelations detected in hybrids compared to the lack of organization in the genetic diversity of the paternal species *C. eos*, these results give weight to the hypothesis that multiple hybridization events between *C. eos* and *C. neogaeus* occurred locally in several sites in East-Qc. Given the high waterway distances among drainages, positive spatial autocorrelations detected at short distances using straight line as well as waterway

distances also support the hypothesis that hybridization events occurred after disappearance of pro-glacial temporary bridges.

Post-glacial colonization alone cannot explain the observed distribution of hybrid lineages in both regions. The wide distribution of the B-01 lineage in West-Qc suggests a post-glacial colonization. However, hybridization events likely occurred *in situ* in order to yield the current distribution of the alternative lineages. In East-Qc, the distribution of few lineages in different assemblages is likely the result of dispersal although numerous local hybridization events are responsible for the observed hybrid assemblages. *In situ* hybridization events appear to be rare in most sperm-dependent unisexual hybrids (but see Quattro *et al.* 1991) and our results provide the first strong evidence of locally produced hybrid lineages during the Holocene in the *Chrosomus eos-neogaeus* system.

2.6.3. Diversity and landscape elements

In spite of a higher number of sites sampled in this survey compared to the one performed by Angers and Schlosser (2007), no additional lineages was detected in the lakes of West-Qc. Interestingly, all of the additional hybrid lineages detected in this survey were found in small streams. This leads us to associate the difference in diversity of the assemblages of hybrids between regions to the different geomorphologic characteristics of their respective hydrographic networks. West-Qc is characterized by thousands of lakes and ponds whereas a dendritic system of ephemeral and permanent streams is observed in East-Qc; lakes and ponds are nearly absent from this last region.

The very low diversity of the West-Qc region may be explained by the presence of the widespread B-01 lineage. The high abundance of this lineage in most of the lakes could be related to extensive postglacial colonization. Its presence in most of the lakes may prevent the persistence of other hybrid lineages in lakes as expected under the neutral theory of biodiversity (Hubbell 2001), or be the result of competitive exclusion of alternative lineages in lake environments.

2.6.4. Demographic decline of *Chrosomus neogaeus*

The results of this survey are consistent with previous studies reporting low abundance of the maternal species *Chrosomus neogaeus* (Angers & Schlosser 2007). In addition, the presence of *C. eos-neogaeus* × *eos* as triploid hybrids, never *C. eos-neogaeus* × *neogaeus*, indirectly confirmed the near absence of *C. neogaeus* in both regions. Gynogenetic *C. eos-neogaeus* require the sperm of either parental species to reproduce, the spermatozoid genome is occasionally incorporated into the diploid hybrid egg leading to the formation of triploid hybrids. These triploid hybrids are observed in high proportion in every hybrid populations but are only produced *de novo* (Goddard *et al.* 1989). The presence of an additional *C. eos* genome in triploid individuals indicates that hybrids use the sperm of the *C. eos* species, not *C. neogaeus* to trigger the development of their eggs.

The reasons for the scarcity of the *C. neogaeus* species in these regions remains to be investigated, however, multiple local hybridization events may be indicative. According to the Hubbs principle, hybridization is more likely to occur if one of the sympatric species becomes rare (Hubbs 1955). Hybridization events involving now extinct species have been reported in multiple species including fishes (Bernatchez *et al.* 1995, Wilson & Bernatchez 1998). Environmental changes following the end of the Pleistocene may have triggered the demographic decline of *C. neogaeus* populations, increasing the probability of interspecific mating by *C. neogaeus* females. Production of gynogenetic unisexual hybrids may have accelerated the disappearance of *C. neogaeus* populations by outcompeting them due to the alleviation of the “double cost of sex” in hybrids. While this scenario is hypothetical, it provides an explanation to the high diversity of hybrids as well as to the near lack of maternal species.

2.7. Conclusion

This study supports the hypothesis of multiple hybridization events between *Chrosomus eos* and *C. neogaeus* occurring during the Holocene in East-Qc. This explains the difference in the diversity and distribution of hybrid lineages between regions separated by the St Lawrence River in absence of marked differences among *C. eos* populations. This highlights distinct historical processes that act in shaping the diversity in the assemblage of hybrids in each region. This

unusually high diversity of hybrid lineages in East-Qc coupled to the near absence of the maternal species *Chrosomus neogaeus* suggests that the decline of this species could be the trigger event at the origin of the high rates of spontaneous hybridization in this region.

Ethics approval

This research was performed under institutional animal care guidelines (permit #13-084 delivered by the *Université de Montréal*), and conforms to the mandatory guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Sampling permits were provided by the Quebec Ministry of Natural Resources and Wildlife (MRNF).

2.8. Acknowledgments

We thank the anonymous reviewers for their constructive comments that improved the manuscript. The authors are extremely grateful to the numerous students who assist us in this survey and biologists from Quebec minister of natural resources and wildlife who provide us with fish from several sampling sites. CL was supported by *Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies* (FRQNT), J-A Bombardier and Étienne-Magnin scholarships. This research was supported by a research grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA.

2.9. Additional Tables

Table 2.S1. Characteristics of the different sampled sites. Biotypes E, N and H respectively refer to *Chrosomus eos*, *C. neogaeus* and the hybrids.

Region	Drainage Bassin	Sites	Latitude	Longitude	Biotype	No. of hybrid lineages	Names of hybrid lineages	
West-Qc	Assomption	AS-1	N 45° 55' 32.4"	W 74° 03' 51.1"	E	-	-	
		AS-2	N 45° 57' 58.3"	W 74° 01' 43.5"	E, H	1	B-01	
		AS-3	N 45° 54' 53.3"	W 74° 01' 40.9"	E, H, N	1	B-01	
		AS-4	N 45° 58' 59.2"	W 74° 01' 06.0"	E, H	1	B-01	
		AS-5	N 45° 59' 17.1"	W 74° 00' 24.7"	E	-	-	
		AS-6	N 45° 59' 22.7"	W 74° 00' 18.4"	E, H	1	B-01	
		AS-7	N 45° 59' 23.5"	W 74° 00' 00.0"	E, H	1	B-01	
		AS-8	N 46° 05' 20.8"	W 73° 57' 21.8"	E, H	1	B-01	
		AS-9	N 45° 57' 09.9"	W 73° 56' 13.2"	E	-	-	
		AS-10	N 46° 06' 01.7"	W 73° 55' 50.8"	H	1	B-01	
		AS-11	N 45° 55' 10.7"	W 73° 55' 09.3"	E, H	3	A-02; A-03; B-01	
		AS-12	N 46° 04' 39.4"	W 73° 53' 02.5"	H	2	B-01; B-02	
		AS-13	N 46° 05' 13.6"	W 73° 52' 44.0"	E, H	2	B-01; B-02	
		AS-14	N 46° 05' 32.3"	W 73° 52' 26.5"	E, H	2	B-01; B-02	
		AS-15	N 46° 05' 34.6"	W 73° 52' 20.4"	E, H	2	B-01; B-02	
		AS-16	N 46° 05' 35.3"	W 73° 52' 15.5"	E, H	1	B-01	
		AS-17	N 46° 05' 32.3"	W 73° 48' 33.0"	E	-	-	
				N 45° 56' 18.8"	W 74° 02' 08.1"	-	-	-
				N 45° 56' 59.0"	W 73° 59' 23.1"	-	-	-
				N 46° 03' 36.9"	W 73° 57' 21.0"	-	-	-
				N 45° 51' 55.9"	W 73° 57' 02.2"	-	-	-
				N 45° 51' 51.4"	W 73° 56' 39.2"	-	-	-
				N 45° 51' 48.8"	W 73° 55' 48.7"	-	-	-
				N 46° 04' 06.7"	W 73° 55' 40.2"	-	-	-
				N 46° 03' 30.2"	W 73° 55' 37.9"	-	-	-
				N 45° 54' 37.2"	W 73° 54' 15.3"	-	-	-
				N 46° 04' 56.6"	W 73° 52' 50.5"	-	-	-
		N 46° 02' 20.8"	W 73° 48' 27.4"	-	-	-		

Blanche	BA-1	N 45° 47' 08.1"	W 75° 14' 57.4"	E	-	-	
Du Nord	NO-1	N 46° 07' 51.7"	W 74° 26' 46.2"	E, H	1	B-01	
	NO-2	N 45° 53' 41.9"	W 74° 21' 40.7"	E, H	1	B-01	
	NO-3	N 45° 54' 17.9"	W 74° 19' 17.7"	E, H	1	B-01	
	NO-4	N 45° 54' 16.3"	W 74° 18' 46.0"	E, H	2	A-01; B-01	
	NO-5	N 45° 59' 38.0"	W 74° 18' 21.0"	H	1	B-01	
	NO-7	N 45° 56' 37.6"	W 74° 11' 37.7"	E, H	1	B-01	
	NO-8	N 45° 52' 31.4"	W 74° 08' 44.6"	E	1	B-01	
	NO-9	N 45° 56' 04.3"	W 74° 06' 11.3"	H	1	B-01	
	NO-10	N 45° 55' 00.9"	W 74° 04' 22.5"	E, H	1	B-01	
	NO-11	N 46° 02' 16.0"	W 74° 03' 16.0"	E, H	1	B-01	
	NO-12	N 45° 57' 35.9"	W 74° 03' 13.8"	H	1	B-01	
	NO-13	N 45° 54' 29.4"	W 74° 00' 20.7"	H	1	B-01	
			N 45° 54' 43.6"	W 74° 21' 13.0"	-	-	-
			N 45° 54' 36.9"	W 74° 21' 07.8"	-	-	-
		N 45° 54' 54.1"	W 74° 20' 45.5"	-	-	-	
		N 45° 54' 11.8"	W 74° 18' 54.3"	-	-	-	
		N 45° 55' 59.5"	W 74° 09' 15.6"	-	-	-	
		N 45° 55' 56.0"	W 74° 09' 12.6"	-	-	-	
		N 45° 55' 55.3"	W 74° 09' 11.0"	-	-	-	
		N 45° 55' 58.0"	W 74° 08' 44.1"	-	-	-	
		N 45° 50' 52.0"	W 74° 06' 53.3"	-	-	-	
		N 45° 50' 11.7"	W 74° 05' 51.9"	-	-	-	
		N 45° 55' 56.0"	W 74° 04' 36.1"	-	-	-	
		N 45° 57' 43.1"	W 74° 03' 03.7"	-	-	-	
		N 45° 54' 30.5"	W 74° 00' 36.5"	-	-	-	
Petite Nation	PN-1	N 46° 12' 43.0"	W 75° 13' 60.0"	E	-	-	
Rouge	RO-1	N 45° 46' 38.9"	W 74° 34' 25.8"	E, H	2	A-01; B-01	
	RO-2	N 45° 51' 44.0"	W 74° 33' 55.5"	H	2	A-01; B-01	
	RO-3	N 45° 50' 42.6"	W 74° 33' 24.2"	E, H	2	A-01; B-01	
	RO-4	N 45° 49' 44.0"	W 74° 31' 53.2"	H	2	A-04; B-01	
			N 45° 49' 45.0"	W 74° 30' 52.5"	-	-	-
			N 45° 49' 49.8"	W 74° 30' 43.2"	-	-	-
			N 45° 49' 43.0"	W 74° 30' 18.6"	-	-	-
St. Sixte	SS-1	N 45° 47' 37.7"	W 75° 12' 02.9"	H	1	B-01	
East-Qc	Yamaska	YA-1	N 45° 23' 23.0"	W 72° 27' 01.7"	E, H	3	A-33; A-34; B-02
		YA-2	N 45° 24' 25.0"	W 72° 25' 18.8"	E	-	-

Chaudière	CH-1	N 45° 22' 48.9"	W 70° 50' 02.9"	H, N	1	A-05
	CH-2	N 45° 29' 03.7"	W 71° 04' 48.3"	E	-	-
Connecticut	CO-1	N 45° 09' 15.1"	W 71° 32' 53.3"	E, H	4	A-06; A-07; A-08; A-09
	CO-2	N 45° 09' 04.4"	W 71° 32' 48.6"	E, H	3	A-06; A-07; A-09
	CO-3	N 45° 10' 27.2"	W 71° 29' 46.5"	E	-	-
		N 45° 08' 25.9"	W 71° 28' 06.2"	-	-	-
		N 45° 08' 40.2"	W 71° 32' 54.2"	-	-	-
Richelieu	RI-1	N 45° 15' 03.5"	W 72° 18' 20.8"	H	1	A-10
	RI-2	N 45° 02' 35.8"	W 72° 21' 43.1"	E, H	2	A-11; B-03
	RI-3	N 45° 04' 09.0"	W 72° 21' 11.9"	E, H	2	A-11; B-03
	RI-4	N 45° 03' 01.4"	W 72° 19' 03.3"	E, H	3	A-11; A-12; B-03
		N 45° 02' 28.6"	W 72° 22' 03.9"	-	-	-
		N 45° 06' 31.9"	W 72° 21' 37.0"	-	-	-
		N 45° 01' 33.0"	W 72° 25' 44.5"	-	-	-
		N 45° 01' 47.4"	W 72° 25' 34.6"	-	-	-
		N 45° 06' 31.2"	W 72° 23' 20.9"	-	-	-
		N 45° 01' 52.8"	W 72° 26' 46.5"	-	-	-
		N 45° 16' 05.2"	W 72° 19' 58.0"	-	-	-
		N 45° 06' 02.6"	W 72° 21' 46.3"	-	-	-
		N 45° 01' 46.6"	W 72° 18' 11.7"	-	-	-
		N 45° 10' 02.1"	W 72° 25' 49.1"	-	-	-
	Saint-François	SF-1	N 45° 27' 00.1"	W 71° 49' 32.1"	E, H	6
SF-2		N 45° 21' 17.1"	W 72° 13' 05.5"	E, H	2	A-26; A-27
SF-3		N 45° 03' 05.8"	W 72° 11' 39.0"	H	1	B-05
SF-4		N 45° 14' 01.8"	W 71° 54' 28.0"	E, H	1	B-06
SF-5		N 45° 13' 30.4"	W 71° 54' 33.6"	E, H	2	B-06; B-07
SF-6		N 45° 13' 20.6"	W 71° 55' 01.3"	E	-	-
SF-7		N 45° 12' 56.7"	W 71° 54' 31.5"	E, H	1	B-06
SF-8		N 45° 13' 58.5"	W 71° 54' 19.4"	E, H	2	B-06; B-07
SF-9		N 45° 12' 23.0"	W 71° 56' 33.4"	E	-	-
SF-10		N 45° 12' 37.3"	W 71° 56' 10.2"	E	-	-
SF-11		N 45° 04' 23.4"	W 71° 52' 37.9"	H	1	A-17
SF-12		N 45° 07' 48.5"	W 71° 40' 21.9"	E, H, N	2	A-18; A-19
SF-13		N 45° 10' 36.7"	W 71° 32' 09.5"	E, H	2	A-06; A-07

SF-14	N 45° 11' 04.5"	W 71° 33' 13.2"	E, H	4	A-06; A-07; A-08; A-09
SF-15	N 45° 24' 53.2"	W 71° 46' 53.4"	H	3	A-20; A-21; A-22
SF-16	N 45° 42' 10.6"	W 71° 09' 59.9"	H	2	A-23; A-24
SF-17	N 45° 38' 15.4"	W 71° 02' 53.8"	H	1	A-24
SF-18	N 45° 03' 45.8"	W 72° 11' 49.5"	H	1	B-05
SF-19	N 45° 32' 15.2"	W 71° 49' 40.5"	H	2	A-25; B-02
SF-20	N 45° 25' 36.0"	W 71° 39' 40.9"	E, H	4	A-15; A-29; A-30; A-32
SF-21	N 45° 25' 50.1"	W 71° 40' 19.4"	E, H	5	A-15; A-28; A-29; A-31; A-32
SF-22	N 45° 32' 12.9"	W 71° 47' 55.6"	H	1	B-02
SF-23	N 45° 30' 30.3"	W 71° 58' 48.4"	E	-	-
	N 45° 21' 43.2"	W 71° 49' 44.5"	-	-	-
	N 45° 14' 46.8"	W 71° 55' 08.7"	-	-	-
	N 45° 06' 15.3"	W 71° 39' 35.9"	-	-	-
	N 45° 31' 45.4"	W 71° 15' 50.3"	-	-	-
	N 45° 11' 33.6"	W 72° 19' 30.2"	-	-	-
	N 45° 10' 58.7"	W 71° 58' 13.5"	-	-	-
	N 45° 03' 47.6"	W 71° 53' 16.9"	-	-	-
	N 45° 44' 04.4"	W 71° 07' 46.9"	-	-	-
	N 45° 06' 15.8"	W 71° 38' 54.2"	-	-	-
	N 45° 45' 54.8"	W 71° 05' 50.1"	-	-	-
	N 45° 14' 16.1"	W 71° 51' 58.6"	-	-	-
	N 45° 11' 18.2"	W 71° 33' 60.0"	-	-	-
	N 45° 11' 06.0"	W 72° 18' 30.3"	-	-	-
	N 45° 10' 39.6"	W 71° 52' 53.0"	-	-	-
	N 45° 10' 27.9"	W 71° 53' 13.2"	-	-	-
	N 45° 11' 03.3"	W 71° 32' 36.2"	-	-	-
	N 45° 05' 40.2"	W 72° 18' 27.9"	-	-	-
	N 45° 13' 58.6"	W 71° 52' 55.4"	-	-	-
	N 45° 07' 45.4"	W 72° 13' 56.3"	-	-	-
	N 45° 13' 32.3"	W 71° 32' 36.8"	-	-	-
	N 45° 11' 12.0"	W 71° 51' 06.8"	-	-	-
	N 45° 27' 17.6"	W 71° 55' 10.8"	-	-	-
	N 45° 37' 59.5"	W 71° 03' 06.7"	-	-	-

Table 2.S2. Multiloci genotype of the parental species *C. eos* individuals.

Region	Site	Individuals	Microsatellite loci										PEG1/MEST			
			Pho-1	Pho-2	Pho-60	Pho-61	Ca-12	Seat-412								
West-Qc	AS-1	eos-001	290	302	216	216	160	184	NULL	NULL	233	233	220	232	222	222
	AS-1	eos-002	NULL	NULL	216	216	192	208	NULL	NULL	245	253	212	220	222	222
	AS-1	eos-003	282	286	216	216	192	200	NULL	NULL	245	253	212	224	222	222
	AS-1	eos-004	282	318	236	240	148	156	150	154	229	245	220	220	222	222
	AS-1	eos-005	274	282	216	216	136	184	150	154	233	245	220	224	222	222
	AS-1	eos-006	282	302	232	236	196	204	166	170	213	233	220	232	222	222
	AS-1	eos-007	254	302	220	220	164	172	166	174	217	253	212	220	222	222
	AS-1	eos-008	274	302	216	216	136	192	154	166	233	245	220	224	222	222
	AS-1	eos-009	282	302	212	216	136	204	150	154	209	249	224	224	222	222
	AS-1	eos-010	274	282	216	220	168	196	154	162	237	237	208	220	222	222
	AS-1	eos-011	254	274	216	236	148	164	154	178	213	253	216	224	227	227
	AS-1	eos-012	274	282	216	240	136	160	162	174	205	213	216	224	222	222
	AS-1	eos-013	254	274	216	240	192	204	154	154	249	253	220	224	222	222
	AS-1	eos-014	282	290	216	216	196	228	162	166	205	253	224	224	222	222
	AS-1	eos-015	286	302	216	236	168	192	170	174	213	253	220	224	222	222
	AS-1	eos-016	254	282	228	236	184	204	150	154	225	233	220	224	222	222
	AS-1	eos-017	254	286	216	216	136	192	150	166	213	245	220	220	222	222
	AS-1	eos-018	282	298	200	240	148	192	154	166	233	253	216	232	222	222
	AS-1	eos-019	226	282	216	244	NULL	NULL	146	166	217	253	220	220	222	222
	AS-16	eos-020	266	298	208	232	188	188	154	222	209	245	224	280	222	222
	AS-16	eos-021	NULL	NULL	212	220	172	196	162	190	221	233	220	224	222	222
	AS-16	eos-022	274	298	220	232	192	204	142	178	209	233	228	232	222	222
	AS-16	eos-023	258	266	224	232	184	188	174	206	205	237	200	228	222	222
	AS-16	eos-024	286	298	220	220	204	220	170	174	209	229	212	216	222	222
	AS-16	eos-025	266	278	224	228	172	188	170	202	221	245	224	224	222	222
	AS-16	eos-026	282	294	224	228	200	204	178	254	221	225	212	232	222	222
	AS-16	eos-027	282	294	208	212	180	184	154	170	209	221	216	220	222	222
	AS-16	eos-028	230	274	224	232	160	188	222	242	217	257	224	232	222	222
	AS-16	eos-029	NULL	NULL	212	216	NULL	NULL	146	170	225	269	212	220	222	222
	AS-16	eos-030	262	274	224	224	152	184	138	166	209	225	216	232	222	222
	AS-16	eos-031	262	298	204	204	200	208	158	178	217	225	212	212	222	222
	AS-17	eos-032	262	262	236	236	188	192	150	154	217	241	220	236	222	222

AS-17	eos-033	258	266	204	208	144	192	154	198	213	217	220	240	227	227
AS-17	eos-034	318	330	220	220	144	144	182	194	229	241	220	240	227	227
AS-17	eos-035	314	330	240	240	144	196	182	194	205	215	224	224	227	227
AS-17	eos-036	258	258	220	220	184	188	182	182	241	241	224	244	227	227
AS-17	eos-037	258	262	228	228	144	192	154	182	241	241	220	240	222	222
AS-17	eos-038	258	282	240	240	184	188	198	218	213	217	216	240	227	227
AS-17	eos-039	258	282	220	240	184	188	154	182	241	241	220	232	227	227
AS-17	eos-040	258	270	228	228	188	192	154	170	213	241	220	228	227	227
AS-17	eos-041	302	326	228	228	144	196	154	182	205	241	216	220	227	227
AS-17	eos-042	250	250	228	228	152	188	146	150	215	241	220	236	227	227
AS-17	eos-043	254	302	228	228	192	196	154	154	213	241	224	240	222	222
AS-17	eos-044	302	338	192	228	144	196	154	154	241	245	220	224	227	227
AS-17	eos-045	262	262	208	208	184	192	158	186	213	241	220	240	227	227
AS-17	eos-046	262	322	228	240	NULL	NULL	154	198	241	241	220	232	227	227
AS-17	eos-047	262	262	240	248	196	200	150	182	241	241	220	240	227	227
AS-17	eos-048	242	326	188	228	184	184	182	198	241	241	224	240	227	227
AS-17	eos-049	258	266	188	240	180	184	150	178	205	241	220	244	222	227
AS-17	eos-050	262	314	228	228	184	184	154	194	241	241	220	240	222	227
AS-17	eos-051	262	302	240	240	144	196	178	182	215	241	224	240	222	227
AS-17	eos-052	262	266	228	240	144	192	154	182	213	241	232	240	227	227
AS-17	eos-053	262	302	232	232	184	196	182	222	241	241	224	236	227	227
AS-17	eos-054	262	338	NULL	NULL	144	144	154	154	NULL	NULL	NULL	NULL	227	227
AS-17	eos-055	326	342	NULL	NULL	144	196	154	190	205	241	NULL	NULL	222	227
AS-5	eos-056	258	330	176	228	176	176	162	190	225	225	220	228	222	222
AS-5	eos-057	258	270	188	200	152	196	154	202	217	229	208	228	222	222
AS-5	eos-058	234	254	220	232	148	216	NULL	NULL	221	225	220	248	222	222
AS-5	eos-059	234	266	196	232	144	200	182	206	229	245	220	228	222	222
AS-5	eos-060	262	262	216	224	144	188	158	194	221	221	204	208	222	222
AS-5	eos-061	262	262	200	224	140	140	194	206	225	245	220	220	222	222
AS-5	eos-062	262	262	192	196	144	200	198	214	225	233	204	228	222	222
AS-5	eos-063	242	254	216	224	200	204	158	186	233	233	216	220	222	222
AS-5	eos-064	262	266	220	224	200	200	170	186	217	221	216	232	222	222
AS-5	eos-065	258	270	224	232	140	144	146	154	217	225	200	216	222	222
AS-5	eos-066	278	282	196	212	176	184	194	194	213	241	212	232	222	222
AS-5	eos-067	270	286	216	228	140	184	162	210	233	237	192	192	222	222
AS-5	eos-068	282	306	200	232	152	152	NULL	NULL	NULL	NULL	208	212	222	222
AS-5	eos-069	270	278	200	200	140	200	154	154	205	217	216	224	222	222

AS-5	eos-070	258	278	196	212	140	144	142	206	209	229	216	220	222	222
AS-5	eos-071	270	282	196	208	140	144	150	162	205	229	212	236	222	222
AS-5	eos-072	254	262	216	224	136	188	150	158	225	241	216	224	222	222
AS-5	eos-073	258	270	208	216	144	144	174	174	225	241	212	216	222	222
AS-5	eos-074	262	274	248	260	188	188	138	142	217	237	212	236	222	222
AS-5	eos-075	278	282	NULL	NULL	144	204	NULL	NULL	NULL	NULL	NULL	NULL	222	222
AS-5	eos-076	274	286	212	212	140	148	150	154	221	237	212	220	222	222
AS-5	eos-077	262	262	224	228	136	200	NULL	NULL	213	221	212	224	222	222
AS-5	eos-078	262	302	228	232	140	192	154	154	217	233	204	216	222	222
AS-5	eos-079	262	270	196	196	148	156	138	146	217	217	212	232	222	222
AS-5	eos-080	258	266	224	228	152	180	NULL	NULL	209	221	NULL	NULL	222	222
BA-1	eos-081	258	266	220	220	144	148	154	162	201	201	196	252	222	222
BA-1	eos-082	258	270	110	110	144	156	154	162	197	237	196	200	222	222
BA-1	eos-083	254	274	192	196	168	172	174	174	225	229	208	220	222	222
BA-1	eos-084	250	278	110	232	156	160	150	150	225	233	196	204	222	222
BA-1	eos-085	282	294	110	110	148	148	150	150	201	249	200	212	222	222
BA-1	eos-086	282	302	110	212	152	168	150	162	229	237	220	232	222	222
BA-1	eos-087	286	298	NULL	NULL	120	144	NULL	NULL	NULL	NULL	NULL	NULL	222	222
BA-1	eos-088	282	294	196	212	152	164	146	146	237	245	192	248	222	222
BA-1	eos-089	258	302	114	184	136	192	146	158	229	237	196	204	222	222
BA-1	eos-090	266	286	180	184	144	148	154	178	205	257	200	256	222	222
BA-1	eos-091	262	278	110	200	156	192	146	154	233	237	212	252	222	222
BA-1	eos-092	254	278	188	188	148	156	166	166	201	241	208	220	222	222
BA-1	eos-093	262	298	180	216	148	184	150	170	221	233	200	200	222	222
BA-1	eos-094	234	286	204	204	144	160	142	158	217	221	204	232	222	222
BA-1	eos-095	282	294	110	110	152	168	158	158	225	241	204	216	222	222
BA-1	eos-096	250	250	110	110	144	148	146	154	229	237	204	216	222	222
BA-1	eos-097	294	298	200	200	132	152	154	158	213	249	196	216	222	222
BA-1	eos-098	290	290	204	204	156	168	154	178	201	229	188	212	222	222
BA-1	eos-099	250	258	NULL	NULL	160	192	142	146	213	233	196	208	222	222
BA-1	eos-100	278	306	204	204	144	148	150	158	241	241	188	248	222	222
BA-1	eos-101	266	282	110	208	136	172	162	162	205	229	204	212	222	222
BA-1	eos-102	290	294	188	208	148	180	114	158	201	233	208	216	222	222
BA-1	eos-103	286	298	110	110	156	156	146	174	217	221	200	208	222	222
BA-1	eos-104	282	294	NULL	NULL	144	160	146	158	217	233	220	228	222	222
BA-1	eos-105	238	258	NULL	NULL	144	172	150	174	229	237	188	216	222	222
NO-10	eos-106	282	294	184	216	156	192	154	162	205	213	216	228	222	222

NO-10	eos-107	250	302	228	244	136	156	154	166	233	253	220	228	222	222	
NO-10	eos-108	250	282	212	248	184	192	166	170	233	233	208	232	222	222	
NO-10	eos-109	250	290	196	244	136	192	154	166	205	213	212	232	222	222	
NO-10	eos-110	282	302	216	224	136	148	154	166	233	233	212	220	222	222	
NO-10	eos-111	282	282	216	236	136	172	142	154	249	253	220	224	222	222	
NO-10	eos-112	250	306	204	236	136	136	142	166	201	213	220	220	222	222	
NO-10	eos-113	282	302	216	236	136	192	154	154	205	245	220	228	222	222	
NO-10	eos-114	254	290	224	240	136	172	166	166	249	253	220	224	222	222	
NO-10	eos-115	302	306	216	240	136	156	142	154	245	253	212	224	222	222	
NO-10	eos-116	302	302	216	220	136	192	154	166	213	245	212	224	222	222	
NO-10	eos-117	302	354	216	220	184	192	166	166	233	245	212	220	222	222	
NO-10	eos-118	286	298	220	244	136	136	166	166	201	233	212	220	222	222	
NO-10	eos-119	298	302	240	260	136	156	154	166	213	233	212	212	222	222	
NO-10	eos-120	254	282	240	240	136	136	154	174	201	253	212	216	222	222	
NO-10	eos-121	282	302	244	248	184	184	166	166	213	233	220	220	222	222	
RO-1	eos-122	266	282	216	240	152	156	146	146	201	225	228	240	227	227	
RO-1	eos-123	278	314	236	236	136	152	154	158	201	203	212	220	222	227	
RO-1	eos-124	278	286	212	232	144	160	170	170	205	217	216	220	227	227	
RO-1	eos-125	262	278	224	224	132	136	NULL	NULL	201	205	224	244	227	227	
RO-1	eos-126	254	270	252	252	168	168	154	170	203	209	212	228	227	227	
RO-1	eos-127	266	270	220	228	152	152	150	150	201	221	200	228	227	227	
RO-1	eos-128	270	274	212	228	148	168	150	158	201	203	224	236	227	227	
RO-1	eos-129	274	286	236	244	144	164	154	170	209	229	216	228	222	227	
RO-1	eos-130	282	282	248	248	140	152	178	178	203	205	216	232	227	227	
RO-1	eos-131	254	274	212	232	148	184	166	202	191	199	224	232	227	227	
RO-1	eos-132	266	282	200	224	144	160	NULL	NULL	209	209	224	236	222	227	
East-Qc	YA-1	eos-133	242	290	110	288	140	144	154	158	241	245	216	220	222	222
	YA-1	eos-134	250	254	192	276	144	164	162	174	221	241	204	212	222	222
	YA-1	eos-135	286	310	208	208	152	152	162	170	217	225	204	208	222	222
	YA-1	eos-136	258	306	224	228	156	156	166	174	237	245	208	232	222	222
	YA-1	eos-137	278	278	110	116	136	168	138	170	213	233	204	232	222	222
	YA-1	eos-138	282	298	NULL	NULL	164	172	162	162	219	221	204	224	222	222
	YA-1	eos-139	298	326	110	192	148	152	158	158	219	245	208	208	222	222
	YA-1	eos-140	242	318	110	220	144	156	162	162	203	245	208	208	222	222
	YA-1	eos-141	246	254	204	204	144	148	158	158	217	221	NULL	NULL	222	222
	YA-1	eos-142	258	278	110	200	156	164	174	178	217	229	204	208	222	222
	YA-1	eos-143	270	314	184	184	156	164	154	170	213	229	204	220	222	222

YA-1	eos-144	266	282	196	196	156	160	158	166	201	229	212	232	222	222
YA-1	eos-145	262	286	110	228	152	160	154	166	209	221	216	232	222	222
YA-1	eos-146	258	270	180	216	152	156	138	174	241	249	196	204	222	222
YA-1	eos-147	290	306	110	184	160	160	174	178	237	245	202	204	222	222
YA-1	eos-148	258	326	110	180	152	156	174	222	221	241	200	220	222	222
YA-1	eos-149	250	298	110	232	156	156	154	162	217	217	208	216	222	222
YA-1	eos-150	258	310	208	208	156	156	NULL	NULL	229	241	192	232	222	222
CO-1	eos-151	306	306	212	220	140	160	162	182	221	221	216	236	222	222
CO-1	eos-152	290	306	200	212	152	160	166	166	225	225	200	216	222	222
CO-1	eos-153	286	306	176	228	148	160	148	166	225	225	208	284	222	222
CO-1	eos-154	302	310	192	236	140	156	150	162	217	225	224	228	222	222
CO-1	eos-155	310	310	244	244	156	160	158	166	209	229	236	280	222	227
CO-1	eos-156	306	310	110	212	140	184	150	158	205	217	216	280	222	227
CO-1	eos-157	NULL	NULL	208	216	152	152	166	170	225	225	188	204	222	222
CO-1	eos-158	286	294	176	208	140	152	162	166	209	221	192	204	222	222
RI-2	eos-159	282	310	212	236	148	180	158	170	209	225	240	240	222	222
RI-2	eos-160	270	282	224	228	148	176	154	158	229	253	204	236	222	222
RI-2	eos-161	258	278	220	220	152	156	154	174	197	241	208	208	222	222
RI-2	eos-162	246	322	212	216	152	164	182	182	201	225	204	212	222	222
RI-2	eos-163	270	274	184	192	152	156	154	158	201	261	204	212	222	222
RI-2	eos-164	294	322	188	216	152	164	NULL	NULL	209	225	208	212	222	222
RI-2	eos-165	258	286	212	216	160	164	154	162	201	245	200	212	222	222
RI-2	eos-166	290	290	236	236	144	148	NULL	NULL	225	245	216	220	222	222
RI-2	eos-167	274	274	184	196	148	156	154	166	225	233	196	224	222	222
RI-2	eos-168	266	274	228	228	148	160	146	170	201	205	212	212	222	222
RI-2	eos-169	266	266	224	228	144	156	170	186	221	241	196	220	222	222
RI-2	eos-170	278	322	180	224	148	160	158	166	229	241	212	212	222	222
RI-2	eos-171	286	290	184	240	148	152	138	170	225	225	212	212	222	222
RI-2	eos-172	250	274	184	220	176	180	150	166	209	233	212	220	222	227
RI-4	eos-173	266	278	180	192	144	152	186	186	197	249	212	228	222	222
RI-4	eos-174	242	278	224	232	144	152	166	166	225	237	192	232	222	227
RI-4	eos-175	262	278	184	212	152	152	146	174	241	257	200	228	222	227
RI-4	eos-176	282	282	212	212	152	152	170	174	225	241	216	228	222	222
RI-4	eos-177	270	270	212	216	144	180	162	190	221	237	200	204	222	227
RI-4	eos-178	306	322	184	188	148	148	154	174	241	245	212	236	222	227
RI-4	eos-179	262	322	208	212	140	156	138	166	237	245	208	228	222	227
RI-4	eos-180	274	274	200	224	160	164	146	166	245	269	212	216	227	227

SF-2	eos-181	270	282	110	110	164	164	158	166	225	233	220	232	222	222
SF-2	eos-182	282	326	232	236	168	220	154	170	213	237	208	220	222	222
SF-2	eos-183	270	314	208	212	168	172	138	146	201	205	208	212	222	227
SF-2	eos-184	262	294	228	232	144	164	150	150	205	213	212	220	222	222
SF-2	eos-185	286	286	172	172	152	156	154	186	229	241	200	212	222	222
SF-2	eos-186	266	306	208	224	144	148	142	166	213	217	200	216	222	227
SF-2	eos-187	266	282	208	212	164	196	146	146	229	233	204	224	222	222
SF-2	eos-188	294	322	212	236	148	192	146	186	197	205	208	220	222	222
SF-2	eos-189	250	314	216	224	156	164	NULL	NULL	201	209	NULL	NULL	222	222
SF-2	eos-190	282	302	110	216	160	172	162	174	221	237	200	268	222	227
SF-2	eos-191	262	266	110	224	160	168	162	166	209	229	204	208	222	227
SF-4	eos-192	234	282	212	220	152	156	166	178	221	225	200	220	227	227
SF-4	eos-193	258	298	110	240	160	172	162	178	217	221	212	216	227	227
SF-4	eos-194	258	266	110	204	140	216	138	166	213	241	216	280	222	222
SF-4	eos-195	270	302	196	216	144	204	170	174	209	233	208	268	222	222
SF-4	eos-196	254	286	110	212	140	160	162	162	217	237	208	226	227	227
SF-4	eos-197	286	298	196	200	140	148	NULL	NULL	209	249	NULL	NULL	227	227
SF-4	eos-198	234	266	212	212	148	152	NULL	NULL	209	233	216	264	227	227
SF-4	eos-199	274	298	192	276	156	156	NULL	NULL	213	233	NULL	NULL	227	227
SF-4	eos-200	262	334	204	244	172	200	178	186	209	233	204	264	227	227
SF-4	eos-201	246	270	188	188	140	148	170	178	229	241	216	216	227	227
SF-4	eos-202	274	298	208	248	156	168	142	142	221	241	208	216	227	227
SF-4	eos-203	246	262	212	212	148	200	146	158	209	237	224	268	227	227
SF-4	eos-204	254	262	196	196	136	164	146	162	229	245	216	220	222	222
SF-4	eos-205	258	262	196	204	212	216	126	162	217	221	208	208	222	227
SF-4	eos-206	274	278	200	208	168	200	166	170	225	241	220	264	227	227
SF-4	eos-207	258	298	200	272	152	156	166	182	221	241	204	272	222	222
SF-4	eos-208	290	302	212	244	140	196	134	170	225	241	212	268	227	227
SF-10	eos-209	306	306	196	228	140	144	150	170	209	225	212	220	222	227
SF-10	eos-210	266	306	176	236	140	148	158	166	209	209	216	216	222	227
SF-10	eos-211	278	298	114	216	140	148	NULL	NULL	209	209	220	220	227	227
SF-10	eos-212	266	266	196	216	148	188	NULL	NULL	209	221	216	228	227	227
SF-10	eos-213	278	306	114	216	140	152	150	194	209	233	200	220	227	227
SF-10	eos-214	190	306	196	216	148	164	166	166	209	233	216	220	227	227
SF-10	eos-215	298	306	188	216	164	164	150	194	221	221	292	292	227	227
SF-10	eos-216	190	290	110	228	140	164	150	166	209	221	216	216	227	227
SF-10	eos-217	190	266	110	196	148	156	166	166	209	221	200	216	222	227

SF-10	eos-218	266	306	196	196	148	156	166	170	209	209	200	220	227	227
SF-12	eos-219	310	318	110	224	152	196	154	162	209	213	212	236	227	227
SF-12	eos-220	290	294	196	224	152	156	150	154	209	233	212	216	227	227
SF-12	eos-221	246	314	192	192	148	200	170	182	209	233	216	224	227	227
SF-12	eos-222	310	330	196	228	156	192	154	170	229	229	212	224	227	227
SF-12	eos-223	226	238	228	228	148	152	NULL	NULL	209	217	NULL	NULL	227	227
SF-12	eos-224	290	290	204	240	148	160	NULL	NULL	225	241	208	216	222	227
SF-12	eos-225	238	302	110	204	152	192	NULL	NULL	217	245	212	216	222	227
SF-12	eos-226	294	294	240	240	160	192	150	150	229	229	212	216	222	227
SF-12	eos-227	294	318	110	216	152	152	162	178	225	229	220	228	222	227
SF-12	eos-228	282	290	200	200	152	196	170	170	201	233	204	216	222	222
SF-12	eos-229	302	322	192	240	156	196	146	158	221	225	224	228	227	227
SF-12	eos-230	318	318	220	264	128	152	138	154	209	225	224	224	222	222
SF-12	eos-231	238	298	114	212	148	192	142	158	213	221	208	224	227	227
SF-12	eos-232	290	310	110	216	140	148	154	162	213	225	196	220	222	222
SF-12	eos-233	282	330	200	204	140	156	166	166	237	245	232	252	222	222
SF-12	eos-234	294	314	110	220	148	188	142	166	213	237	228	252	227	227
SF-12	eos-235	294	294	212	216	196	196	NULL	NULL	229	313	NULL	NULL	227	227
SF-14	eos-236	NULL	NULL	196	224	144	164	142	166	213	213	208	216	222	222
SF-14	eos-237	282	314	220	234	148	160	162	170	209	219	232	280	222	222
SF-14	eos-238	298	306	192	216	184	184	142	170	209	209	212	228	222	227
SF-14	eos-239	274	282	204	204	152	184	170	174	217	221	224	228	222	227
SF-14	eos-240	302	310	228	228	148	156	154	158	209	229	148	154	222	227
SF-14	eos-241	230	238	216	260	148	148	154	166	209	217	216	244	222	227
SF-14	eos-242	294	306	244	244	148	184	134	154	207	207	204	256	222	227
SF-14	eos-243	266	302	212	212	164	184	154	226	217	221	224	240	222	222
SF-14	eos-244	270	286	216	216	148	152	162	166	209	221	196	200	222	227
SF-14	eos-245	302	310	216	220	148	148	150	170	205	225	200	228	222	227
SF-14	eos-246	274	298	204	212	148	156	146	162	213	217	200	224	222	227
SF-14	eos-247	278	314	NULL	NULL	140	144	162	166	205	213	200	220	222	222
SF-14	eos-248	286	310	188	232	144	148	154	178	205	209	216	220	222	227
SF-14	eos-249	294	298	212	272	152	188	174	198	215	217	228	240	222	227
SF-14	eos-250	282	298	204	228	152	184	174	198	205	213	220	232	222	227

Table 2.S3. Consensus nuclear genotype and mitochondrial haplotype of the different lineages. Allele size refers to the more common clone and bold characters to variable loci within a given lineage.

Hybrid lineage	Nuclear loci								Sample size	
	PEG1/MEST		Pho-1	Pho-2	Pho-60	Pho-61	Ca-12			Seat-412
	<i>C. eos</i>	<i>C. neogaeus</i>					<i>C. eos</i>	<i>C. neogaeus</i>		
A-01	222	170	270	204	148	146	209	375	210 / 212	50
A-02	222	170	278	220	152	154	213	245	190 / 258	1
A-03*	222	170	302 / 310	196 / 200	168 / 176	166	249	357	204 / 242	2
A-04*	222 / 227	170	278 / 290	224 / 228	168 / 180	NULL	207 / 217	247	204 / 214 / 234	1
A-05*	227	170	302 / 322	200 / 204	148 / 156	162 / 170	201 / 225	265	222 / 228	1
A-06	222	170	306	176	184	162	205	281	230 / 280	60
A-07	222	170	298	200	148	158	209	325	216 / 226	28
A-08	227	170	262	208	152	166	209	317	238 / 264	12
A-09	222	170	302	236	152	158	225	305	214 / 240	15
A-10	227	170	278	204	136	170	209	241	174 / 252	4
A-11	222	170	326	208	164	174	221	245	222 / 242	27
A-12	222	170	286	208	152	170	233	253	206 / 222	2
A-13	222	170	286	228	156	166	217	317	214 / 228	3
A-14*	222	170	266 / 294	252	156	158 / 178	221 / 229	309	204 / 218	1
A-15	222	170	274	212	160	146	221	349	210 / 240	19
A-16*	222 / 227	170	298 / 306	192 / 204	148 / 156	182 / 186	209	337	204 / 214 / 224	1
A-17*	222	170	326	204/236	152	170	225	321	214 / 216 / 234	1
A-18	222	170	294	212	196	170	229	309	196 / 222	47
A-19*	222	170	274 / 310	212	152 / 160	148 / 166	217	245	210 / 216 / 240	1
A-20	222	170	306	180	188	166	209	277	222 / 288	3
A-21	222	170	274	216	164	150	225	349	210 / 236	2
A-22*	222	170	278 / 302	212	156 / 164	148 / 154	209	225	208 / 210 / 244	1
A-23	222	170	278	208	164	142	217	337	210 / 240	2
A-24	222	170	310	260	148	150	209	289	220 / 226	4
A-25*	222	170	278 / 302	204 / 244	144 / 152	174	209 / 211	213	218 / 224	1
A-26*	222	170	262 / 322	204 / 220	160 / 212	158 / 162	225	241	216 / 220 / 238	1
A-27	222	170	262	228	148	146	213	305	218 / 220	6
A-28	227	170	286	176	156	142	217	293	234 / 244	1
A-29	222	170	290	172	144	178	209	269	230 / 232	2
A-30*	222	170	282 / 310	180	136 / 184	166	205 / 225	277	216 / 232 / 290	1

A-31*	222	170	298 / 318	184 / 204	144 / 148	162 / 182	209	329	216 / 218 / 268	1
A-32	222	170	326	204	152	170	225	269	216 / 218	2
A-33*	222	170	254 / 334	216	160 / 164	166 / 176	209	241	198 / 210 / 236	1
A-34	222	170	306	220	156	174	245	309	208 / 234	15
B-01	222	170	298	212	160	174	209	245	220 / 230	280
B-02	222	170	250	112	172	162	217	389	208 / 212	30
B-03	227	170	274	192	176	150	209	329	204 / 206	10
B-04*	222 / 227	170	302	244 / 236	160	170	217	225	208 / 216	2
B-05*	222	170	286 / 290	228	164	162	213	225	196 / 244	2
B-06	227	170	254	112	160	170	217	237	208 / 226	39
B-07	222	170	266	204	156	170	209	333	206 / 208	4

*Triplod individuals for which the hybrid genotype was not determined

Chapitre 3 :

VARIATION ÉPIGÉNÉTIQUE ET CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES

Facing environmental predictability with different sources of epigenetic variation

Christelle Leung, Sophie Breton et Bernard Angers

Publié dans *Ecology and Evolution* (2016) 6(15): 5234–5245. DOI 10.1002/ece3.2283

(Format modifié pour les besoins de la présente thèse)

3.1. Résumé et contributions

Les modifications épigénétiques peuvent contribuer à augmenter la variation phénotypique. Les changements épigénétiques induits par l'environnement et les épimutations sont respectivement associés à la plasticité phénotypique et au *bet-hedging*. Leur contribution relative est donc censée refléter la capacité d'un génotype à faire face à des changements environnementaux distincts puisque ces stratégies sont différenciellement sélectionnées en fonction de la prédictibilité des changements environnementaux. Pour tester cette hypothèse, nous avons estimé les sources de variation épigénétique en utilisant des poissons clonaux provenant d'environnements prévisibles (lacs) ou imprévisibles (ruisseaux intermittents). L'analyse du patron de méthylation de l'ADN des individus clonaux provenant de populations naturelles a révélé une contribution différente des sources de variation épigénétique selon leur origine. Ces différences ont été validées *via* des expériences de milieux contrôlés et sont en adéquation avec les modèles théoriques. Cependant, l'environnement et les processus stochastiques influencent conjointement la variation épigénétique, suggérant que la plasticité phénotypique et le *bet-*

hedging sont deux stratégies mutuellement non-exclusives. Cette approche permet ainsi d'explorer davantage la capacité des organismes à faire face aux différentes conditions environnementales.

Les idées à la base de cet article ont été conçues par CL et BA. Les manipulations en laboratoire (milieux contrôlés, identifications génétiques et détermination du patron de méthylation) ainsi que l'analyse des données ont été effectuées par CL. CL a rédigé le manuscrit sous la supervision de SB et BA.

3.2. Abstract

Different sources of epigenetic changes can increase the range of phenotypic options. Environmentally-induced epigenetic changes and stochastic epimutations are respectively associated to phenotypic plasticity and diversifying bet-hedging. Their relative contribution is thus expected to reflect the capacity of a genotype to face distinct changes since these strategies are differentially selected according to environmental uncertainty. To test this hypothesis, we assessed the sources of epigenetic changes on clonal fish from predictable (lakes) or unpredictable (intermittent streams) environments. DNA methylation of clones from natural conditions revealed contrasting contribution of environmentally-induced vs stochastic changes according to their origins. These differences were validated in common garden experiments. Consistent with theoretical models, distinct sources of epigenetic variation prevail according to the environmental uncertainty. However, both sources act conjointly, suggesting that plasticity and random processes are complementary strategies. This represents a rigorous approach for further exploring the capacity of organisms to respond to environmental conditions.

Keywords: Epigenetics, environmental variation, phenotypic plasticity, bet-hedging, clonal organisms, *Chrosomus eos-neogaeus*

3.3. Introduction

Epigenetic processes are known to extend the phenotypic options of a genotype by fine-tuning gene expression and triggering development of alternative phenotypes (Jaenisch & Bird 2003, Kucharski *et al.* 2008, Matsumoto *et al.* 2013). Environmentally-induced and spontaneous

stochastic modifications (epimutations) are two fundamentally different mechanisms enabling epigenetic variation. Following the perception of an environmental signal, specific genes may be epigenetically silenced or activated, resulting in a modified and environment-specific phenotype (Rando & Verstrepen 2007, Chinnusamy & Zhu 2009, Beldade *et al.* 2011, Verhoeven & Preite 2014). Environmentally-induced epigenetic variation has therefore been proposed to mediate phenotypic plasticity (Angers *et al.* 2010, Bollati & Baccarelli 2010). This strategy depends on the perception and integration of environmental signals during development (Pigliucci 1996, Bateson *et al.* 2014), and thus results from interactions between environmental stimuli and epigenetic processes. Theoretical studies demonstrated that phenotypic plasticity would be selected for dealing with predictable environmental changes, *e.g.* when environmental conditions change between generations but remain stable within a generation, allowing organisms to develop proper phenotypes until reproduction (Lachmann & Jablonka 1996, DeWitt *et al.* 1998, Reed *et al.* 2010, Scheiner & Holt 2012).

On the other hand, stochastic epigenetic changes can also result in the production of different phenotypes (Cubas *et al.* 1999, Rakyan *et al.* 2002, Manning *et al.* 2006, Miura *et al.* 2009). Stochastic variation may be generated because of the high error rate of DNA methyltransferase in the establishment of methylation marks during DNA replication (Riggs *et al.* 1998). The rate of epigenetic changes is extremely variable, and epimutations can be 10^4 times higher than somatic mutations in some genes (Bennett-Baker *et al.* 2003, Massicotte *et al.* 2011, Schmitz *et al.* 2011). Epimutations can occur spontaneously (Becker *et al.* 2011), but their rates may also increase when organisms are exposed to environmental stresses (Rapp & Wendel 2005). The stochastic establishment of epigenetic marks has been proposed to be among the potential mechanisms underlying diversified bet-hedging strategy (Piggot 2010, Casadesús & Low 2013, Herman *et al.* 2014, Vogt 2015). Indeed, this risk-spreading strategy is based on the stochastic production of phenotypically variable offspring, irrespective of environmental conditions (Slatkin 1974, Veening *et al.* 2008, de Jong *et al.* 2011). Stochastic production of phenotypes makes this strategy more advantageous to organisms coping with unpredictable environmental changes, *e.g.* when environmental signals experienced during development do not predict environmental conditions that individuals will cope with until reproduction (Balaban

et al. 2004, Kussell & Leibler 2005, Acar *et al.* 2008, Fraser & Kærn 2009, Rajon *et al.* 2014, Scheiner 2014b, Botero *et al.* 2015).

Either environmentally-induced or stochastic DNA methylation variation can alter gene expression (Wolff *et al.* 1998, Morgan *et al.* 1999, Kucharski *et al.* 2008). These mechanisms are not alternative to each other but complementary in producing phenotypic diversity in the absence of genetic variation. The relative contribution of environmentally-induced and stochastic epigenetic variation is thus expected to differ according to the predictability of environmental changes and reflect the capacity of a given genotype to be either more plastic or more bet-hedger. However, this hypothesis, fundamental to our understanding of the capacity of a given genotype to respond to environmental conditions, still needs to be empirically tested.

Our study aims at determining whether distinct contribution of environmentally-induced epigenetic changes vs randomly established epigenetic marks would be observed according to the predictability of environmental changes. Theoretical models predict that organisms found in predictably or unpredictably changing environments are respectively more likely to be plastic or adopt bet-hedging strategy (Kussell & Leibler 2005, Scheiner & Holt 2012, Starrfelt & Kokko 2012, Scheiner 2013). Therefore, our prediction is that high proportion of environmentally-induced epigenetic changes will be present in organisms distributed in multiple and spatially different but predictable environments whereas high randomly established epigenetic marks will be present in organisms living in unpredictable environments.

We assess environmentally-induced and stochastic epigenetic variation on a clonal organism to rule out the effect of DNA polymorphism on epigenetic variation by analysing replicates of a genotype within and among environments. Specifically, the asexual *Chrosomus eos-neogaeus* hybrid fish (Figure 3.1.A) provide a suitable system as several lineages from distinct hybridization events occur naturally (Schlosser *et al.* 1998, Angers & Schlosser 2007). These fish are found in different and contrasting environmental conditions such as ponds, lakes and ephemeral streams (Scott & Crossman 1973, Goddard *et al.* 1998, Schlosser *et al.* 1998), which represent different level of environmental predictability according to the fish ecology (Giller & Malmqvist 1998, Wetzel 2001). Lakes are considered as stable and predictable environments compared to intermittent headwater streams given the morphology and the short-term variability in physico-chemical conditions of the latter (Wetzel 2001). Intermittent

headwater streams display more unstable channel morphology because of flowing water erosive action, resulting in a higher sensitivity to flood variation and a higher dynamism and unpredictability in fish habitats. Moreover, streams respond more rapidly to precipitation events, resulting in faster and larger changes in both physical and chemical conditions (Weyhenmeyer *et al.* 2012). Because the physico-chemical conditions of water are primary regulators of species composition, the numbers/diversity of prey as well as predators are therefore more unpredictable in intermittent streams than in lakes and ponds.

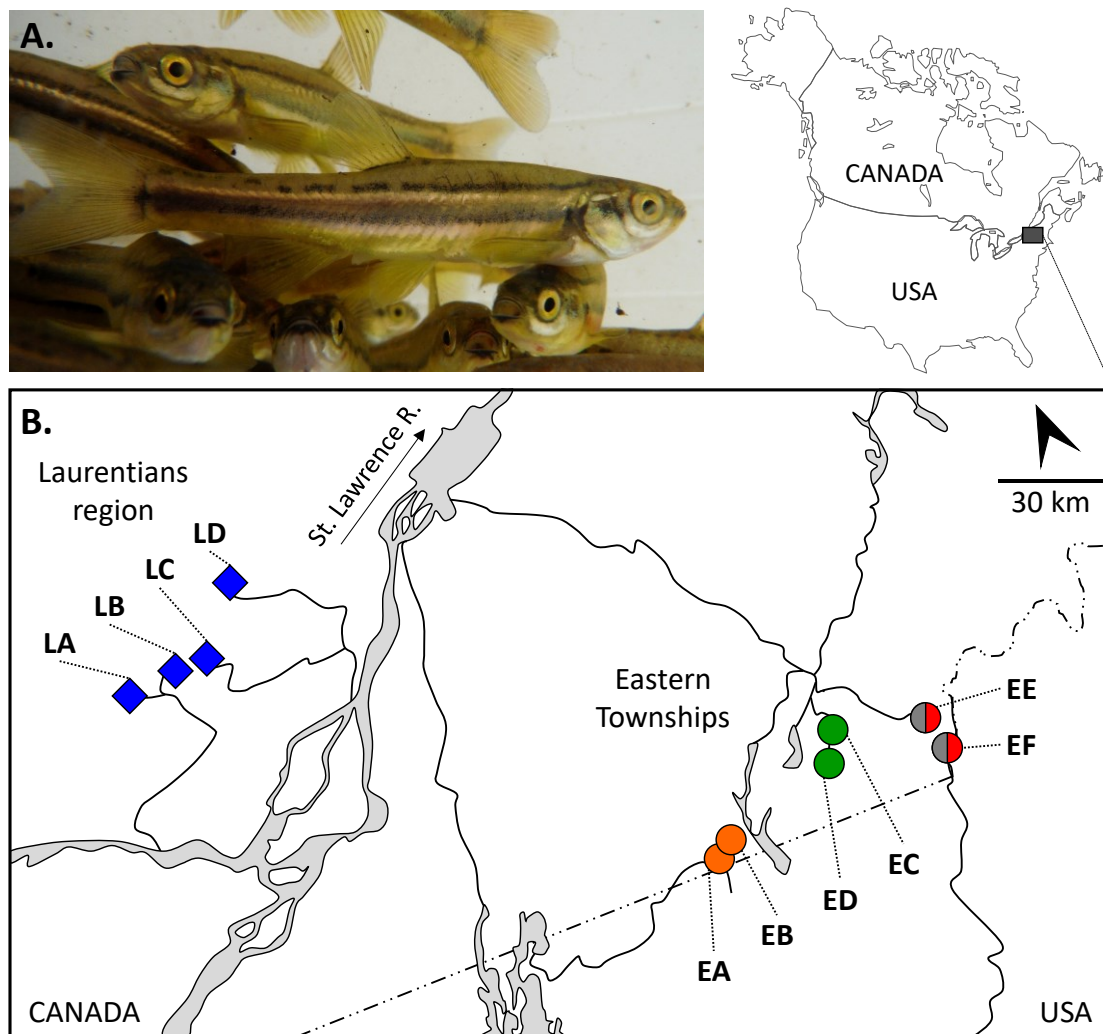


Figure 3.1. Model species *Chrosomus eos-neogaeus* and study sites. (A) Adult individuals of the complex *Chrosomus eos-neogaeus*. (B) Map of southern Quebec (Canada) indicating the field sites in Eastern Townships (circles) and Laurentians (diamonds) regions. Colours refer to distinct hybrid lineages (LR-1 = blue, ET-1 = green, ET-2 = orange, ET-3 = grey and ET-4 = red) and site names are in capital letters.

Environmentally-induced and spontaneous stochastic epigenetic changes were assessed by partitioning of epigenetic variability within clonal lineages from distinct natural populations of *C. eos-neogaeus*. Specifically, environmentally-induced variation was inferred from epigenetic differences among sampling sites while stochastic changes referred to residual epigenetic variation, explained neither by genetic variation nor sampling sites. Because confounding effects may be encountered in the epigenetic signals from natural populations, epigenetic variation was also analysed in individuals reared in common garden experiments.

3.4. Materials and Methods

3.4.1. Ethics statement

This research was performed under institutional animal care guidelines (permit #13-084 delivered by the *Université de Montréal*), and conforms to the mandatory guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Sampling permits were provided by the Quebec Ministry of Natural Resources and Wildlife (MRNF).

3.4.2. Biological model, sampling and genetic identification

The asexual *Chrosomus eos-neogaeus* results from hybridization events between the redbelly dace *C. eos* and the finescale dace *C. neogaeus* (Dawley *et al.* 1987) and reproduces clonally by gynogenesis (Goddard & Dawley 1990, Goddard *et al.* 1998). Distinct hybridization events have resulted in the formation of multiple lineages (Angers & Schlosser 2007). Hybrids are present in contrasting environments (Schlosser *et al.* 1998). In addition, both environmental and stochastic effects on DNA methylation have been previously reported as sources of epigenetic variation in *C. eos-neogaeus* (Massicotte *et al.* 2011, Massicotte & Angers 2012).

Two regions in southern Quebec (Canada) where the presence of different *C. eos-neogaeus* lineages has been reported (Angers & Schlosser 2007) were retained for this study. Sampling of adults *C. eos-neogaeus* was conducted in lakes (predictable environments) of the Laurentians region (LR-1 lineage) and in Eastern Townships (ET-2 to ET-5 lineages) streams (unpredictable environments) (Figure 3.1.B).

Total DNA from the caudal fin of each individual was extracted according to Sambrook *et al.* (1989). Genetic identification was performed according to Binet and Angers (2005). The assignment of individuals to a given lineage was achieved using the multilocus genotype of 8 hypervariable microsatellites amplified according to Angers & Schlosser (2007): Pho-1, Pho-2, Pho-60, and Pho-61 specific to *C. eos* and Ca-12, Seat-412, amplifying both *C. eos* and *C. neogaeus* haplotypes (Binet & Angers 2005, Skalski & Grose 2006, Angers & Schlosser 2007). A lineage is defined as all individuals expected to originate from a given hybrid zygote; in the absence of mutation, recombination and segregation, individuals of a given lineage are thus expected to be genetically identical (Angers & Schlosser 2007). Given the high mutation rate of microsatellite loci, mutations (generally one or a few number of repeats away from the consensus size) can be observed at one or few loci between individuals of a given lineage (Angers & Schlosser 2007). Therefore, these markers allow the assessment of genetic differences among individuals within a given lineage.

3.4.3. Common garden experiments

The common garden experiments allowed the elimination of most of the confounding factors (*e.g.* lineages found in different environmental conditions or genetic variation among individuals from distinct sites). The experimental setup was designed to provide a stable and homogeneous environment in an aquarium: natural photoperiod, constant temperature at 19°C, saturated oxygenation and *ad libitum* feeding to avoid competition. Thirty fish larvae (< 1cm) per lineage were sampled randomly from natural populations for lineages LR-1 from the lake LD (N 46°05'35.5" W 73°52'15.7") and ET-2 from the intermittent stream EA (N 45°02'35.8" W 72°21'43.1") (Figure 3.1.B; Table 3.1). Individuals were then reared together in a constant and uniform environment until adults. After 5 months in the experimental conditions, individuals reached approximately 5 cm; they were sacrificed and genetically identified according to the procedure described above.

3.4.4. Methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) analysis

Because epigenetic profiles are tissues-specific (Shiota *et al.* 2002, Massicotte *et al.* 2011), the survey of DNA methylation was exclusively performed on the caudal fin. Epigenetic analysis

was performed on 156 individuals from five lineages in natural populations (Table 3.1). An additional 20 individuals from two lineages (10 individuals randomly selected for LR-1 and ET-2) reared in controlled conditions were analyzed.

Table 3.1. Epigenetic and genetic intra-site variation for each lineage. Individuals were grouped according to lineage and sampled environment. For each group, intra-environment epigenetic variation (E_{-INTRA}) refers to mean individuals' distance-to-centroid (Anderson 2006) with standard deviation (*s.d*) and gene diversity were estimated with Nei's gene diversity (Nei 1978).

Lineages	Environments	Geographic coordinates		Sampling size	Epigenetic diversity		Gene diversity (H_E)
					# of variable loci	E_{-INTRA} (\pm <i>s.d.</i>)	
LR-1	LA	45°54'18.9"N	74°19'20.8"W	10	12	1.48 (\pm 0.29)	0.07
	LB	45°55'03.1"N	74°04'30.0"W	30	7	1.21 (\pm 0.14)	0.03
	LC	45°57'58.3"N	74°01'43.5"W	10	3	0.83 (\pm 0.17)	0.14
	LD	46°05'32.4"N	73°52'09.6"W	8	3	0.90 (\pm 0.11)	0.06
			Total	58	40		0.15
LR-1	Common garden	-	-	10	2	0.57 (\pm 0.32)	0.08
ET-1	EC	45°14'01.8"N	71°54'28.0"W	10	22	2.08 (\pm 0.15)	0.14
	ED	45°12'56.7"N	71°54'31.5"W	8	19	2.12 (\pm 0.29)	0.00
			Total	18	27		0.10
ET-2	EA	45°02'35.8"N	72°21'43.1"W	10	25	2.12 (\pm 0.41)	0.21
	EB	45°03'01.4"N	72°19'03.2"W	10	22	2.04 (\pm 0.41)	0.23
			Total	20	31		0.25
ET-2	Common garden	-	-	10	9	1.37 (\pm 0.23)	0.15
ET-3	EE	45°11'04.5"N	71°33'13.2"W	29	12	1.28 (\pm 0.30)	0.12
	EF	45°09'15.1"N	71°32'53.3"W	13	12	1.35 (\pm 0.43)	0.15
			Total	42	16		0.15
ET-4	EE	45°11'04.5"N	71°33'13.2"W	10	13	1.52 (\pm 0.22)	0.29
	EF	45°09'15.1"N	71°32'53.3"W	8	10	1.33 (\pm 0.38)	0.15
			Total	18	15		0.38

Survey of DNA methylation was performed using MSAP technique (Xiong *et al.* 1999). This method allows for a genome-wide analysis of methylation patterns by using a subsample of the whole variation. Massicotte *et al.* (2011) confirmed that loci targeted by MSAP method are functionally relevant, being located within genes, in gene regulatory regions or within

transposable elements. In this study, only the frequent cutter *MspI* or *HpaII* restriction enzymes were used to increase the number of restriction sites within a selective PCR. Three selective PCR were performed using *MspI/HpaII*-CAG, -CCT and -CTC primers for both *MspI* and *HpaII* treatments. Loci were separated by electrophoresis on denaturing 6 % polyacrylamide (19:1 acrylamide:bis-acrylamide) gels and visualized by silver nitrate staining (Benbouza *et al.* 2006). Banding pattern was used to construct a presence/absence matrix for both treatments. Loci within the *HpaII* treatment associated with polymorphic loci within the *MspI* treatment were excluded since these specific bands are likely associated to genetic variation. To assess the reproducibility of the method, 3 separate MSAP reactions were performed for a sub-sample of 20 individuals randomly chosen. Only clearly amplified and reproducible bands over the 3 replicates were retained for analyses and non-reproducible loci were discarded for all individuals.

3.4.5. Statistical analyses

The statistical programming environment R 3.2.2 was used for the computation of all statistics. Specifically, we used the *vegan* package 2.3-2 (Oksanen *et al.* 2015) for multivariate analyses and *ade4* 2.0-0 (Jombart 2008, Jombart & Ahmed 2011) for genetic analyses.

Euclidean distances among individuals were computed from the presence/absence matrix of MSAP bands and were used to infer unrooted trees using the neighbour-joining (NJ) method. Relative support for the different groups was assessed by bootstrap analysis with 1,000 replicates.

Partial redundancy analyses (Borcard *et al.* 1992) were used to determine the relative contribution of the lineage and the environment (different sampling sites or aquarium) on the total epigenetic variation. To investigate the extent to which epigenetic variation was affected by the environment for a given lineage, we performed redundancy analyses by taking into account the degree of genetic differences among individuals. First, genetic distances were calculated according to the number of mutation steps among individuals of a given lineage. Genetic distance was thereafter summarized according to a Principal Coordinate Analysis. The percentages of the total epigenetic variation that can be attributed to the different factors (genetics and environment) were based on the adjusted R^2 (R^2_a) and significance of each fraction

was tested by permutation tests using 999 randomizations (Peres-Neto *et al.* 2006). This approach has been shown to be the most appropriate to decompose the variation according to different factors (Legendre *et al.* 2005) and provides a standard and comparable measure to describe the environmental effect for the different lineages.

Stochastic epigenetic variation was assessed with the residual epigenetic variation that cannot be attributed either to genetics or the environment. In natural populations, confounding effect (*e.g.* intra-site genetic composition and/or spatial heterogeneity) may however blur the environmental effect on epigenetic variation. Hence, stochastic epigenetic variation was also assessed according to the variation within a homogeneous environment (common garden) for two lineages compared to the variation within their respective natural populations. Variation was assessed according to the dispersion of individuals within a given environment, *i.e.* mean distance-to-centroid (Anderson 2006). Analyses of multivariate homogeneity of group dispersions, a multivariate analogue of Levene's test, were performed using Euclidean distances matrix. Each group was defined by all individuals of a given lineage and from the same environment. Distances between individuals and group centroids were then computed with a bias correction for unequal sample sizes (Stier *et al.* 2013). Pairwise comparisons of mean distance-to-centroid of each lineage within a given environment were performed with 999 permutations under the null hypothesis that there is no difference in dispersion between groups.

Since genetic differentiation among populations can affect epigenetic variation, we tested whether epigenetic differences detected among sites were not related to genetic differentiation. Correlation between genetic and epigenetic inter-site distances was assessed from Euclidean and Chord distance measured respectively on MSAP and microsatellite loci. Similarly, genetic diversification of a clonal lineage can also occur within a given site and thus increase epigenetic variation. Nei's gene diversity, unbiased heterozygosity H_E (Nei 1978), and mean individuals' distance-to-centroid were used to estimate respectively intra-site genetic and epigenetic diversity. Correlations between intra-site genetic and epigenetic variation were assessed. For both correlations, Pearson's correlation coefficient was performed and significance was tested with 999 permutations.

Environmental parameters [temperature (°C); conductivity (S/cm); dissolved oxygen (mg/L); pH; oxidation-reduction potential] for each sampled sites were measured using the YSI

556 Multiprobe System over a short period of a week during summer 2013 to avoid temporal variation. Euclidean distances of standardized data were used to construct a dissimilarity matrix for the different sites. These parameters were used only to assess whether environmental heterogeneity exists among sites containing the 5 lineages because many other parameters may influence species' ecology (habitat types, predations, disturbance patterns, substrate, etc.).

3.5. Results

3.5.1. Epigenetic diversity in natural populations

Genomic screening of DNA methylation of the 5 lineages provided a total of 62 polymorphic loci from 113 reproducible fragments. Less than 3% of non-reproducible bands were removed from the analysed data. A total of 54 loci were variable in more than one lineage, whereas 8 loci were lineage specific. The number of polymorphic loci per lineage per site varied from 3 to 25 in natural populations (Table 3.1). The total epigenetic variation also differs among lineages, as LR-1, ET-1 and ET-2 display more than twice the number of variable loci than ET-3 and ET-4 (Table 3.1). The low variability detected in some lineage/site combination is not correlated to sample size ($R^2 = 0.049$; $P = 0.488$).

NJ tree revealed that individuals clustered according to lineage with groups supported by very high bootstrap values for most of the lineages (Figure 3.2.A). Epigenetic profiles strongly vary among genotypes, even when they occur in sympatry (e.g. lineages ET-3 and ET-4). Individuals of the widespread lineage LR-1 display a site-specific epigenetic signature and clustered according to their site of capture. This sharply contrasts with lineages from the ET region where individuals of a given lineage captured in different sites are intermingled.

Partition of total epigenetic variation revealed significant contribution of lineage ($R^2_a = 9.83\%$; $P = 0.001$) and site ($R^2_a = 8.31\%$; $P = 0.001$). The variation explained simultaneously by both factors is much higher (61.16%; Figure 3.2.B) since the different lineages occur in some but not all sites. Nevertheless, results indicate that pure genetics and pure environment factors play a crucial role in epigenetic variation in *C. eos-neogaeus*.

Partition of epigenetic variation was performed separately for each lineage to remove the impact of genetic differences. Mutations that occurred on the multiloci genotype of the clones (Table 3.1) were also taken into account in the partition of epigenetic variation. Results revealed that all the lineages were not plastic since only lineages LR-1, ET-2 and ET-3 displayed a significant proportion of epigenetic changes in response to the environment (Figure 3.2.C). The different genotypes may display a specific epigenetic response when confronted with a given environment as observed between the sympatric lineages ET-3 and ET-4 (Figure 3.2.C). The widespread lineage LR-1 displays the highest proportion of epigenetic variation explained by the environment ($R^2_a = 57.82\%$, $25.93\% \leq R^2_a \leq 65.96\%$ for pairwise comparisons among sites), compared to ET lineages ($R^2_a \leq 21.50\%$, Figure 3.2.C).

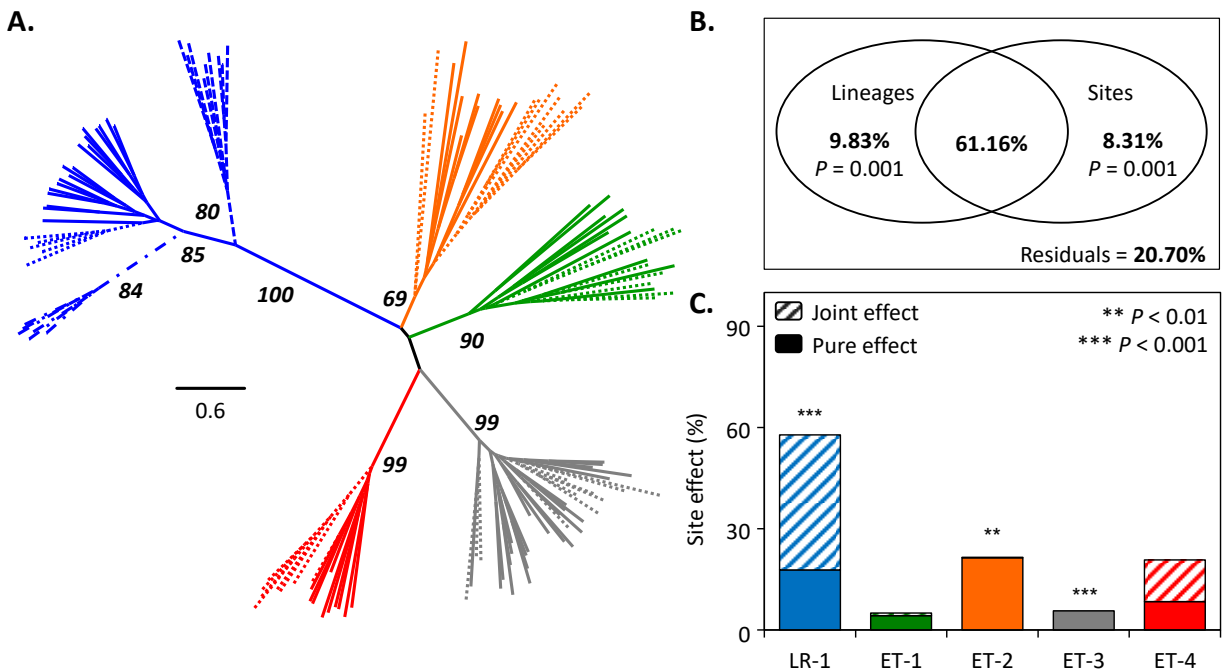


Figure 3.2. Epigenetic variation in natural populations. (A) Unrooted neighbour-joining tree constructed from Euclidean distances between individuals epigenetic profile (colour = lineage according to Figure 3.1 legend and line type = sampled site); bold numbers refer to bootstrap support values > 50% for lineages and sites. (B) Partition of the total epigenetic variation according to lineages and field sites. (C) Proportion of site effect on epigenetic variation for each lineage. Site and genetic joint effect (hatched) is separated from the pure site effect (plain) and P -values refer to significance of the proportion of epigenetic variation explained uniquely by site.

Comparison of sympatric lineages ET-3 and ET-4 revealed a high lineage effect ($R^2_a = 57.08\%$, $P = 0.001$), indicating that important epigenetic differences may exist among genotypes. However, the proportion of epigenetic variation explained only by intra-lineage genetic variation was significant for none of the lineages ($P > 0.05$, see Table 3.S1 in Supporting Information). Moreover, no correlation was detected between intra-lineage genetic and epigenetic differences among sites ($R^2 = 0.007$, $P = 0.824$), indicating that greater epigenetic differences among environments are not due to higher genetic differences among populations (Figure 3.3). Also, the low unexplained intra-site variation found in LR-1 compared to ET lineages is not correlated to intra-site genetic variation ($R^2 = 0.072$, $P = 0.354$). For instance, individuals of the lineage ET-1 from the site ED are all genetically identical ($H_E = 0$) and display at the same time one of the highest intra-site epigenetic variation (Table 3.1).

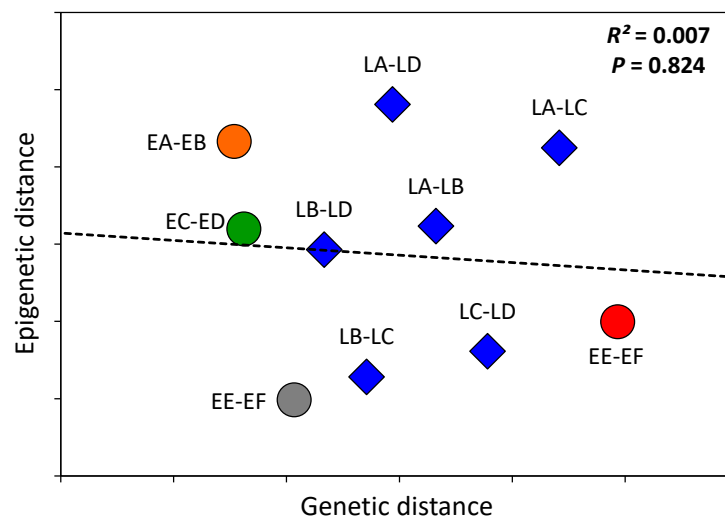


Figure 3.3. Relationship between genetic and epigenetic distances. Genetic and epigenetic distances refer, respectively, to the Chord distance performed on microsatellite loci and Euclidean distance performed on methylation profiles from MSAP analysis. Comparisons were performed among sites for each lineage (see Figure 3.1.B for names and locations of sites and lineages color code).

Since all the different lineages of the hybrid *C. eos-neogaeus* were not found in sympatry, they may experience different environmental variation among sites. However, no significant difference in the variation of physico-chemical conditions was observed between ET and LR regions ($P = 0.758$; Figure 3.4 and Table 3.S2).

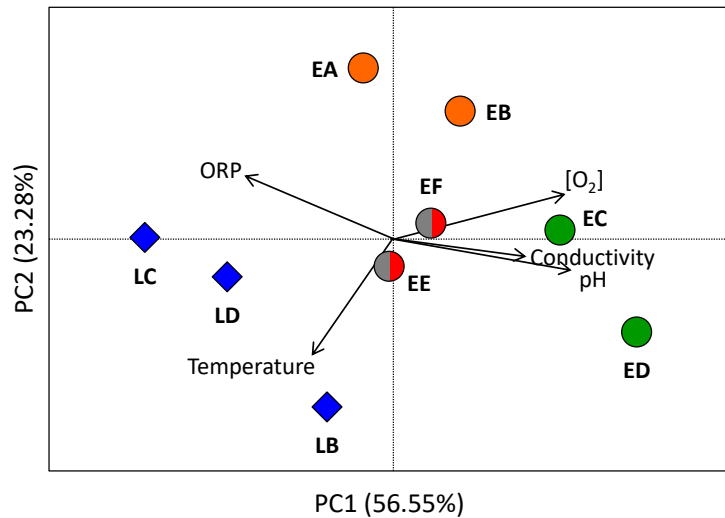


Figure 3.4. Variation of the environmental conditions in natural sites. Genetic Principal component analysis of the physico-chemical parameters (temperature [°C]; conductivity [S/cm]; [O₂], dissolved oxygen [mg/L]; pH; ORP, oxidation–reduction potential) among sites; lineages found in each site are represented by different colors according to Figure 3.1.B.

Finally, 20.70 % of the total epigenetic variation remained unexplained by lineages and environments (Figure 3.2.B). Unexplained variation (the variation explained neither by site-environment nor microsatellite variation, Figure 3.2.C) accounts for a very low proportion of the total variation in the widespread lineage LR-1 whereas it represents up to 98 % of the total variation in lineages from the ET region (see Table 3.S1).

3.5.2. Common garden experiments

Epigenetic variability was measured on individuals reared in controlled conditions and compared to individuals from their respective sampled site for two lineages that displayed the highest epigenetic variation in natural populations (Table 3.1). No epigenetic variation explained uniquely by intra-lineage genetic variation was observed for both LR-1 ($R^2_a = 0.048\%$, $P = 0.359$) and ET-2 ($R^2_a = 4.37\%$, $P = 0.264$) lineages. For each lineage, epigenetic profiles of individuals from natural environments and those reared in controlled conditions clustered together (Figure 3.5.A). The different epigenetic profiles observed between lineages reared in the same controlled conditions confirm the genetic influence on the epigenetic response to the environment ($R^2_a = 86.57\%$, $P = 0.001$).

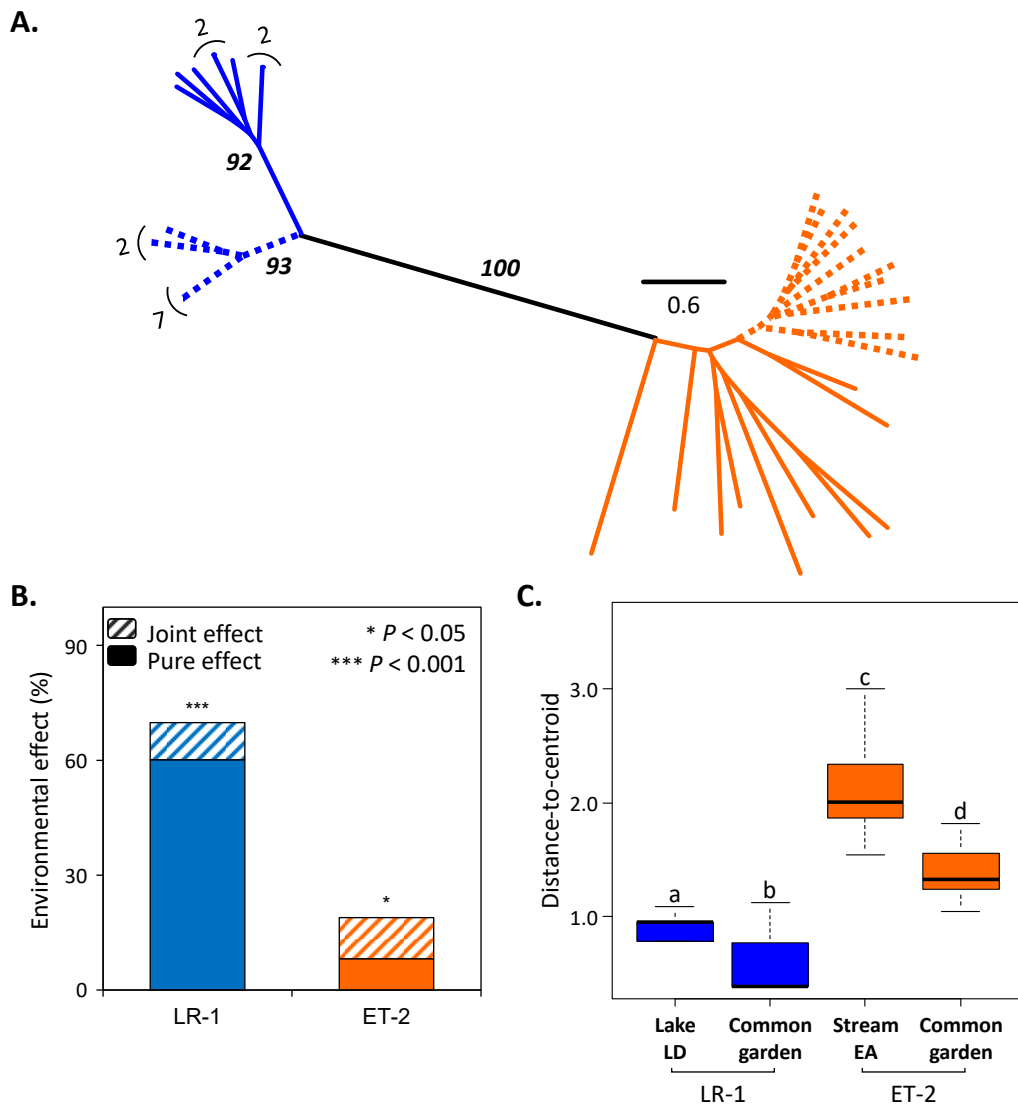


Figure 3.5. Epigenetic variation in controlled conditions. (A) Unrooted neighbour-joining tree constructed from Euclidean distances between epigenetic profiles of individuals reared in common garden (dotted line) vs field sites (solid line). Numbers with bracket indicate the number of identical individuals and bold numbers refer to bootstrap support values $>50\%$ for lineages and sites. (B) Proportion of environmental effect on epigenetic variation. Site and genetic joint effect (hatched) is separated from the pure site effect (plain) and P -values refer to significance of the proportion of epigenetic variation explained uniquely by site. (C) Boxplot with median, quartiles and range of individuals' distance-to-centroids to assess within environment variation. Lowercase letters refer to the results of the pairwise comparisons of group mean dispersions.

Importantly, both LR-1 and ET-2 lineages responded to environmental changes as epigenetic profiles in controlled conditions differed from the ones observed in natural conditions (Figure 3.5.A). However, both lineages did not respond to environmental changes to the same extent. Indeed, 5 monomorphic loci for individuals from natural populations have changed for all individuals in controlled conditions for LR-1, indicating a consistent response to the transfer for individuals of this lineage. At the opposite, no such loci were observed for ET-2. This was also illustrated by the clear discrimination of LR-1 individuals in controlled *vs* natural conditions supported by high bootstrap values whereas ET-2 individuals did not form two monophyletic groups (Figure 3.5.A). Partition of variation analysis confirmed that epigenetic changes associated to development in natural *vs* controlled conditions are more extreme for LR-1 ($R^2_a = 69.83\%$, $P = 0.001$) than ET-2 ($R^2_a = 18.91\%$, $P = 0.001$). Higher pure environmental effect was also detected for LR-1 ($R^2_a = 60.14\%$, $P = 0.001$) than for ET-2 ($R^2_a = 8.17\%$, $P = 0.031$) when taking into account the genetic variation measured with microsatellites loci. At the opposite of natural populations (Figure 3.2.C), only a low confounding effect with genetic variation was detected in common garden experiments (Figure 3.5.B). Levels of epigenetic variation measured in common gardens therefore represent a response to environmental change rather than a consequence of genetic diversity. Interestingly, epigenetic changes in response to transfer in experimental conditions were of the same magnitude as those detected between different sites in natural conditions for both lineages (LR-1: 57.82 %, ET-2: 21.50 %, Figures 3.2.C and 3.5.B).

The epigenetic variation measured in individuals reared in uniform common garden conditions in absence of mortality is expected to reveal the stochastic variation. A significant reduction of the intra-environment variation was detected in both lineages LR-1 ($P = 0.014$) and ET-2 ($P = 0.001$), indicating that natural sites were heterogeneous compared to controlled condition (Figure 3.5.C). Nevertheless, the variation in ET-2 remains significantly higher than the one detected in LR-1 in the same environment ($P = 0.001$) (Figure 3.5.C). Among the monomorphic loci for individuals from the field sites, 4 of them turned to be variable in common gardens for ET-2, whereas no such response was observed for LR-1. Similarly, a higher proportion of epigenetic variation remains unexplained by microsatellite and environmental

effects for the lineage ET-2 (76.72%) compared to the lineage LR-1 (29.69%), confirming the higher level of stochastic variation in ET-2.

3.6. Discussion

This study shows that the contribution of environmentally-induced and stochastic epigenetic changes strongly differ between predictable and unpredictable environments. Results from both natural sites and common garden experiments revealed the predominant role of the environment in modulating epigenetic variation in the lineage LR-1, as expected from stable environments (Angers *et al.* 2010, Pujadas & Feinberg 2012, Scheiner 2014b). This lineage displayed very low amount of epigenetic changes within site, the highest proportion of epigenetic variation among natural sites and the highest level of epigenetic changes following the transfer to experimental conditions. Significant site-effect on epigenetic variation indicates that the environmental signal(s) of a site is/are consistently interpreted by individuals of the LR-1 lineage.

On the other hand, the multiple lineages found in unpredictable environmental conditions were all characterized by high amount of epigenetic variation, but more particularly by a high contribution of stochastic epimutations. The high level of stochastic variation in the lineage ET-2 is well illustrated by several monomorphic loci in natural populations that turned out to be polymorphic among individuals reared in a homogenous environment whereas no such loci were observed for the lineage LR-1 from stable environments. Several processes resulting in diverse error rates are responsible for stochastic establishment of epigenetic marks (Bird 2002). Even if the mechanistic details behind these processes are not completely understood yet, variation in the perception and/or interpretation (Botero *et al.* 2015) of environmental cues can, for instance, result in some errors/variations that may explain epigenetic variation among individuals.

Altogether, our results suggest that organisms found in predictable environments display environmentally-induced epigenetic changes whereas those living in unpredictable environments mostly exhibit randomly established epigenetic marks. This relationship between

the level of environmentally induced epigenetic variation and the predictability of environmental conditions is consistent with our predictions.

3.6.1. Epigenetics, genetics and environment

The epigenetic changes observed in all individuals transferred from natural to experimental conditions confirmed the environmental influence on epigenetic variation and highlighted the rapid epigenetic response of individuals following changes in environmental conditions. Epigenetic variation measured within natural populations may result from stochastic epigenetic variation but also from plasticity due to the heterogeneity of environmental conditions within a given site. The reduction of within-site variation observed in controlled conditions suggests that environmental heterogeneity may account for a part of the observed epigenetic variation within natural environments. Such a reduction of variation could not be attributed to the elimination of unfit phenotypes resulting from random changes because no mortality was recorded during the experiment. The epigenetic variation detected within a given lineage in common garden experiments is therefore expected to represent spontaneous stochastic epigenetic modifications. As expected, stochastic variation accounts for the lowest amount and the lowest proportion of the total variation in the lineage LR-1.

The epigenetic response to a given environmental signal is however strongly influenced by the genotype as evidenced by the distinct sympatric lineages in natural conditions or reared in similar experimental conditions. Because the extent of plasticity has a genetic basis (Scheiner 1993, de Jong 1995, Scheiner & Berrigan 1998), each genotype may have a different perception or interpretation of environmental signals, resulting in different environmentally-induced epigenetic responses. For instance, the widespread lineage LR-1 found in a stable and predictable system of lakes and ponds displayed higher environmentally-induced epigenetic variation than ET lineages. LR-1 may have had therefore the highest fitness in predictable environments because of its capacity to adjust its phenotype to a wide range of environmental conditions, explaining the higher success of colonization of this lineage in the LR region (Angers and Schlosser 2007).

Genomic composition is known to play an important role for obligatory and/or facilitated epigenetic variation (Morgan *et al.* 1999, Richards 2006, Lippman & Zamir 2007,

Furrow & Feldman 2014). Because of this genetic effect, accumulation of mutations with coalescent time within a lineage could make individuals of a sub-lineage more epigenetically similar than individuals from different sub-lineages. Long-term inheritance of epigenetic variation (Bossdorf *et al.* 2008, Jablonka & Raz 2009, Bollati & Baccarelli 2010) may also lead to the very same results. However, these factors did not explain the epigenetic variation measured within lineages as no significant pure genetic effect was detected. Comparison of individuals from the same population but reared in different environments (field sites vs controlled conditions) confirmed the lack of correlation between genetic and epigenetic variation within a given lineage as no genetic effect was detected either. Moreover, the high environmental and genetic joint effect observed among natural populations was strongly reduced in controlled conditions while the total environmental effect remained to the same extent as the one measured in natural conditions. This is in accordance with a previous study where individuals displaying the same genotype but found in different environments were epigenetically more different than distinct genotypes found within the same environment (Massicotte & Angers 2012).

The lack of correlation between pairwise genetic and epigenetic distances indicates that higher epigenetic differences among sites for the lineage LR-1 cannot be attributed to higher genetic differences among LR sites. Similarly, the higher unexplained variation in ET lineages could not be attributed to higher genotypic diversity. Furthermore, using physico-chemical parameters as a surrogate to environmental conditions, sites from the LR region are as different as sites from the ET region. Therefore, the largest environmentally-induced epigenetic variation detected in the LR-1 lineage could not be attributed to a larger environmental difference among sites in this region.

3.6.2. Epigenetics, plasticity and bet-hedging

Phenotypic plasticity and diversified bet-hedging are two ecological models developed to describe how organisms maximize their fitness in changing environments (Slatkin 1974, Stearns 1989, DeWitt *et al.* 1998, Simons 2011). However, both strategies rely essentially on phenotypic variability in coping with environmental fluctuations, explaining why different sources of epigenetic variation have been proposed as the underlying mechanisms of these strategies

(Bossdorf *et al.* 2008, Angers *et al.* 2010, Piggot 2010, Casadesús & Low 2013, Herman *et al.* 2014, Vogt 2015). Environmentally-induced epigenetic changes underline the capacity of a genotype to adjust the phenotype to match the environment for plasticity while stochastic epigenetic changes highlight the propensity to randomly diversify the phenotypes for bet-hedging.

The exact environmental parameters or genes associated to the survival of individuals can be different or unknown according to the studied organisms. Thus, in contrast to previous empirical studies focussing on phenotypic traits or fitness to assess the consequences of plasticity or bet-hedging, we rather assessed the inherent mechanisms of these strategies, namely epigenetic variation, to evaluate the capacity of a genotype to be plastic or bet-hedger. As expected, our results are fully consistent with theoretical studies, revealing that the contribution of the different sources of epigenetic variation is clearly different according to the environmental uncertainty. In addition, for a given lineage, each source of epigenetic changes is largely predominant at the level of the genome, with environmentally-induced epigenetic marks for the lineage in predictable environments or random epimutations for the different lineages found in unpredictable environments. Therefore, we suggest the contribution of environmentally-induced *vs* spontaneous stochastic epigenetic variation may provide information about the capacity of a genotype to modify its phenotype according to environmental conditions or, alternatively, to display phenotypic variation notwithstanding environmental conditions.

3.6.3. Two sides of the same coin?

Plasticity and diversifying bet-hedging models seem to be completely opposite to one another in their perception and their response to the environment. However, our results reveal that their respective source of epigenetic variation act conjointly, while at a different extents according to environmental uncertainty. The inherent mechanisms are not alternative to each other but complementary in producing phenotypic diversity. This also indicates that plasticity and diversifying bet-hedging are not mutually exclusive strategies.

Because variation in the predictability of environmental conditions may be encountered, compromise between plasticity and bet-hedging strategies may be optimal. Our results indicated that even when individuals display a consistent response to environmental signals, random

changes occurred resulting in stochastic variation around the optimal epigenetic profile. Such a “mixed-strategy” may represent a compromise between pure strategies that can be considered as both extremes of the response to environmental uncertainty. For instance, it may provide a higher survival rate than only bet-hedging if environment changes turned to be temporarily predictable as well as a higher survival rate than only plasticity if changes are occasionally unpredictable. This idea of maximizing sources of phenotypic variation has been already explored in the conditional bet-hedging (Jablonka *et al.* 1995). This concept is based on the principle that some individuals of a population will modify their phenotypes according to environmental changes whereas the rest of the population will retain phenotypes of the previous generation whatever the environmental conditions (Jablonka *et al.* 1995).

3.7. Conclusion

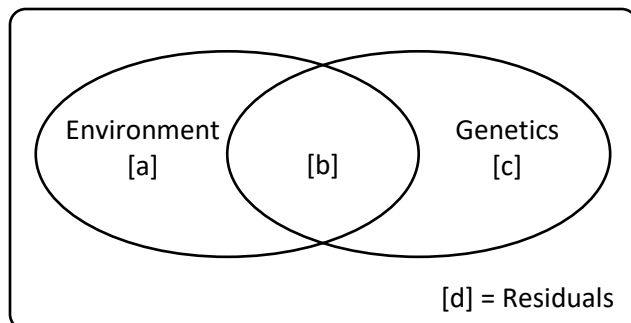
This study performed in natural populations and controlled conditions provides strong empirical evidence that different sources of epigenetic variation can be conjointly used, but at different extents to cope with environmental uncertainty. Because both environmentally-induced and stochastic epigenetic changes may result in phenotypic variation, they are expected to play a crucial role in plasticity and bet-hedging strategies, although this remains to be formally demonstrated for the latter strategy. This study also highlights the importance of recognizing these distinct sources of epigenetic variation because total variation is not sufficient to assess the capacity of a genotype to respond to environmental changes. Therefore, we believe this study provides a framework to further assess the potential of organisms to respond to environmental changes.

3.8. Acknowledgements

We are grateful to Eva Jablonka for valuable discussion and comments on the manuscript. This research was supported by *Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies* (FRQNT), J-A Bombardier and Étienne Magnin scholarships to C.L and research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to B.A (#RGPIN/238600-2013) and S.B (#RGPIN/435656-2013).

3.9. Supporting Information

Table 3.S1. Partition of epigenetic variation. Details of the partition of epigenetic variation performed among environments for each lineage. The fractions explained uniquely by environment (field sites or common garden) and genetics (differences among individuals) are respectively [a] and [c], and their joint effect is [b]; [d] = residuals. Significance of the R^2_a values for [a] and [b] was tested by permutation tests using 999 randomizations.



Lineage	Environments		Df	R^2	R^2_a	P value
ET-1	EC vs ED	[a+b]	1	0.10597	0.05010	-
		[a]	1		0.04219	0.094 .
		[b]	0		0.00791	-
		[c]	3		-0.03756	0.86
		[d]			0.98746	-
ET-2	EA vs EB	[a+b]	1	0.25635	0.21504	-
		[a]	1		0.21391	0.003 **
		[b]	0		0.00113	-
		[c]	8		0.02578	0.358
		[d]			0.75919	-
ET-2	EA vs CG (Aquariums)	[a+b]	1	0.23177	0.18909	-
		[a]	1		0.08170	0.031 *
		[b]	0		0.10740	-
		[c]	7		0.04372	0.264
		[d]			0.76719	-
ET-3	EE vs EF	[a+b]	1	0.07352	0.05036	-
		[a]	1		0.05686	0.001 ***
		[b]	0		-0.00651	-
		[c]	6		0.04074	0.08 .
		[d]			0.90890	-
ET-4	EE vs EF	[a+b]	1	0.25416	0.20755	-
		[a]	1		0.08417	0.063 .
		[b]	0		0.12337	-
		[c]	6		0.11148	0.055 .
		[d]			0.68098	-

LR-1	LA, LB, LC, LD	[a+b]	3	0.60035	0.57815	-	0.001 ***
		[a]	3		0.17809	-	
		[b]	0		0.40006	-	
		[c]	7		-0.01434	0.936	
		[d]			0.43619	-	
LR-1	LD vs CG (Aquariums)	[a+b]	1	0.71603	0.69828	-	0.001 ***
		[a]	1		0.60142	-	
		[b]	0		0.09686	-	
		[c]	2		0.00481	0.359	
		[d]			0.29691	-	
LR-1	LA vs LB	[a+b]	1	0.42497	0.40983	-	0.375
		[a]	1		0.00079	-	
		[b]	0		0.40904	-	
		[c]	2		-0.00792	0.780	
		[d]			0.59809	-	
LR-1	LA vs LC	[a+b]	1	0.65952	0.64061	-	0.461
		[a]	1		0.00031	-	
		[b]	0		0.6403	-	
		[c]	4		-0.03976	0.956	
		[d]			0.39915	-	
LR-1	LA vs LD	[a+b]	1	0.67966	0.65964	-	0.001 ***
		[a]	1		0.18636	-	
		[b]	0		0.47328	-	
		[c]	2		-0.00801	0.641	
		[d]			0.34837	-	
LR-1	LB vs LC	[a+b]	1	0.27826	0.25927	-	0.012 *
		[a]	1		0.04422	-	
		[b]	0		0.21505	-	
		[c]	6		-0.01522	0.707	
		[d]			0.75595	-	
LR-1	LB vs LD	[a+b]	1	0.46208	0.44714	-	0.004 **
		[a]	1		0.03811	-	
		[b]	0		0.40902	-	
		[c]	2		0.00371	0.34	
		[d]			0.54916	-	
LR-1	LC vs LD	[a+b]	1	0.59392	0.56854	-	0.002 **
		[a]	1		0.08731	-	
		[b]	0		0.48123	-	
		[c]	4		0.03347	0.138	
		[d]			0.39799	-	

Table 3.S2. Physico-chemical parameters of natural environments. Site codes refer to sites in Figure 3.1.B.

Sites	Temperature (°C)	Conductivity (S/cm)	Disolved oxygene (mg/L)	pH	Oxidation-reduction potential
LB	29.06	48	5.69	7.83	27.60
LD	23.37	52	3.66	7.29	48.60
LC	23.40	64	3.08	6.61	59.00
EA	12.46	43	9.21	7.38	49.02
EB	13.01	82	10.28	8.02	40.10
EC	16.31	384	9.43	8.04	27.60
ED	20.70	230	11.30	8.95	9.30
EE	16.84	138	5.02	7.33	15.20
EF	17.68	33	8.55	8.02	26.90

Chapitre 4 :

PLASTICITÉ PHÉNOTYPIQUE ET NICHES ÉCOLOGIQUES

The role of phenotypic plasticity in niche diversification of a sperm-dependent clonal fish

Christelle Leung, Sophie Breton et Bernard Angers

4.1. Résumé et contributions

La coexistence d'une espèce sexuée et des gynogènes est un phénomène intrigant dans la mesure où l'avantage démographique des organismes asexués peut être responsable de leur propre extinction s'ils surpassent leur hôte sexué. De plus, les gynogènes doivent faire face à la même hétérogénéité des conditions environnementales que les sexués, malgré l'absence de différences génétiques entre les individus. Dans cette étude, nous avons empiriquement testé l'hypothèse selon laquelle les hybrides gynogénétiques utilisent la plasticité phénotypique pour diversifier leurs niches écologiques. La variation phénotypique des hybrides *Chrosomus eos-neogaeus* a été comparée à celle de l'espèce sexuée *C. eos* à l'aide de la morphologie trophique des individus, en milieux contrôlés et naturels. Les individus asexués et sexués affichent le même niveau de plasticité phénotypique lorsqu'ils sont transférés des conditions naturelles vers un milieu contrôlé. Toutefois, les individus asexués sont moins variables que les sexués dans un environnement uniforme. À l'opposé, les individus asexués sont aussi variables que les sexués en milieux naturels. Ces résultats suggèrent que les gynogènes utilisent la plasticité phénotypique afin de faire face à différentes conditions environnementales à la fois au sein d'un même site qu'entre différents sites. Une telle diversification des niches occupées permet de réduire le niveau de compétition entre les individus asexués et sexués et pourrait, du moins en partie, expliquer leur coexistence d'apparence paradoxale.

Les idées à la base de cet article ont été conçues par CL, SB et BA. Les manipulations en laboratoires (milieux contrôlés, identifications génétiques et analyses en morphométrie géométrique en 2D) ainsi que l'analyse des données ont été effectuées par CL. CL a rédigé le manuscrit sous la supervision de SB et BA.

4.2. Abstract

Coexistence of sexual and sperm-dependent parthenogenetic species is a challenging puzzle as demographic advantage of asexual organisms may drive them to extinction if they outcompete and replace their sexual host. In addition, asexual species must deal with the same spatial heterogeneity of environmental conditions than sexual species on which they depend, but with restricted genetic variation among individuals. In this study we empirically assessed whether gynogenetic hybrids use phenotypic plasticity to promote niche diversification. Variation in trophic morphology of the all-female clonal fish *Chrosomus eos-neogaeus* was compared to that of the sexual species *C. eos* in common garden as well as natural conditions. Clonal and sexual organisms displayed the same level of phenotypic plasticity when transferred from natural to controlled conditions. However, clonal individuals displayed less phenotypic variation than sexual individuals when reared in uniform environmental conditions. This contrasted with natural conditions where clones were as variable as sexual individuals. These results suggest that gynogenetic hybrids rely on phenotypic plasticity to evolve in a range of niches with different environmental conditions found within and among sampled sites. Such niche diversification may help to avoid niche overlapping and reduce competition with the sexual form, explaining, at least partially, their paradoxical coexistence.

Key-words: *Chrosomus eos-neogaeus* complex, frozen niche variation, general purpose genotype, geometric morphometrics, gynogenesis, trait-based ecology, trophic niche.

4.3. Introduction

Explaining the coexistence of sexual and asexual organisms is a challenging task. On the one hand, sexually reproducing organisms have to deal with different short-term costs (Williams 1975, Bell 1982, West & Peters 2000, Agrawal 2001), especially the production of males which

entails a demographic cost, *i.e.* the “twofold cost of sex” (Maynard Smith 1978). On the other hand, asexual organisms are often defined as “evolutionary dead-end” because of the long-term costs associated to asexual reproduction, namely the limited ability to adapt to changing environmental conditions and the accumulation of deleterious mutations (Stalker 1956, Müller 1964, Mayr 1970, Uzzell 1970, Smith & Maynard-Smith 1978). Nevertheless, the cost of sex represents an immediate problem threatening sexual organisms as they need to produce at least twice as many offspring than asexual organisms, which would otherwise quickly replace sexual species if they use the same resources (Tomlinson 1966, Tomiuk & Köhler 2007).

Gynogenesis, also known as sperm-dependent parthenogenesis, is a fascinating mode of reproduction resulting from altered mechanisms of sex. In vertebrates, all-females organisms result from hybridization events and rely on the sexual species from which they were derived for mating. While unisexual individuals benefit from the demographic advantage of asexuality, they cannot outcompete sexual related species as they rely on their sperm to trigger embryogenesis of their eggs (Hubbs 1964, Beukeboom & Vrijenhoek 1998, Vrijenhoek 1998, Schlupp 2005). Therefore, the coexistence of both asexual and sexual sperm-donor species is obligatory in such systems, resulting in a complex ecological dynamic as the demographic advantage of asexual organisms could result in the extinction of their sexual hosts and ultimately lead to their own demise due to the lack of sperm source.

Several hypotheses have been proposed to explain the stable persistence of gynogenetic systems. In metapopulation models, local extinction of both sexual and asexual forms cannot be prevented but the persistence of the system is ensured by dispersion from nearby patches (Hellriegel & Reyer 2000, Kokko *et al.* 2008). Other models proposed disadvantageous life history traits in asexual forms (Schley *et al.* 2004, Schlupp 2005) or discrimination against asexual females (McKay 1971, Heubel *et al.* 2009, Mee & Otto 2010) to restrict their proliferation. However, given the hybrid origin of gynogens in vertebrate taxa (Vrijenhoek 1989, Beukeboom & Vrijenhoek 1998, Lamatsch & Stöck 2009), such models may not be likely realistic in natural systems as gynogens are often more performant than their sexual parents because of perpetual F1 heterosis (Shull 1948, Schultz 1977, Hansson & Westerberg 2002, Lippman & Zamir 2007). Moreover, discrimination against asexual females is not empirically supported in some gynogenetic systems (Booij & Guldmond 1984, Balsano *et al.* 1985,

Schlupp *et al.* 1991, Barron *et al.* 2016). Actually, the opposite is sometimes observed as males can increase their attractiveness, and therefore their reproductive success by mating with heterospecific females (Schlupp *et al.* 1994, Heubel *et al.* 2008, Heubel *et al.* 2009).

Niche separation was also proposed as a means to reduce competition between asexual organisms and their sexual hosts, explaining the long-term persistence of asexual lineages (Weeks *et al.* 1992, Vrijenhoek 1994, Gray & Weeks 2001). For instance, the frozen niche variation (FNV) model (Vrijenhoek 1984) requires multiple specialized clonal lineages that are restricted to a narrow ecological niche. Such a partitioning of available ecological space would allow to avoid competition among clonal lineages as well as with the sexual species. On the other hand, the general-purpose genotype (GPG) model (Baker 1965) involves a generalist genotype, which is capable of tolerating a broad range of environmental conditions. Such flexibility of a genotype would therefore allow a given clonal lineage to cope with spatially and temporally heterogeneous environments (Lynch 1984). Similar to the niche separation hypothesis, a given clonal lineage would be able to diversify its ecological niche under the GPG model and thus to demographically proliferate without interfering with the sexual forms.

Genomic differences between gynogenetic hybrids and their sexual hosts may contribute to phenotypic differences between the two biotypes, making the niche separation hypothesis likely. Epigenetic processes can also result in phenotypic variation even in absence of genetic variation (Jaenisch & Bird 2003, Kucharski *et al.* 2008, Matsumoto *et al.* 2013). Phenotypic plasticity, by the interaction between environmental cues and epigenetic processes, or stochastic factors such as epimutations may contribute to phenotype diversification in asexual organisms, explaining their ecological success (Angers *et al.* 2010, Castonguay & Angers 2012, Vogt 2015, Leung *et al.* 2016). Thus, environmentally induced epigenetic variation is therefore in accordance with the GPG model as niche diversification is possible from a single genetic lineage (Massicotte & Angers 2012). On the other hand, niche partitioning is also possible with such epigenetic variation, as individuals of a given lineage would be able to partition the available ecological niches among different acclimated epigenotypes.

This study aimed to assess whether sperm-dependant clonal fish use phenotypic plasticity to promote niche diversification. We used trait-based ecology to understand the role of phenotypic plasticity in mediating species interactions. Morphological characteristics are

known to be a reliable indicator of ecological niche, like mouth shape and size for trophic niche (Keast & Webb 1966, Karpouzi & Stergiou 2003, Spreitzer *et al.* 2012) or locomotor-associated traits for habitat conditions such as water velocity (Magnan *et al.* 2014, Laporte *et al.* 2016).

The *Chrosomus eos-neogaeus* fish complex was used as a biological model because they are found in contrasting environmental conditions (Scott & Crossman 1973, Goddard *et al.* 1998, Schlosser *et al.* 1998). Moreover, previous studies have shown their capacity to cope with environmental heterogeneity through epigenetic processes (Massicotte *et al.* 2011, Massicotte & Angers 2012, Leung *et al.* 2016), underlying their potential for phenotypic plasticity. We first compared the extent of phenotypic plasticity for both gynogens and sexual parental species by performing common garden experiments. Hybrids are expected to display lower morphological variation than sexual individuals within a homogeneous environment in absence of genetic difference among clonal individuals. Comparison of morphological variation among and within sampled sites was thereafter made in natural environments. Both biotypes are expected to display morphological differences according to contrasting environmental conditions, but under the niche diversification hypothesis, gynogenetic hybrids are expected to display higher morphological variation within a given natural locality than within a homogeneous environment.

4.4. Materials and Methods

4.4.1. Study system

Gynogenetic *Chrosomus eos-neogaeus* originated from hybridization events between the redbelly dace *C. eos* and the finescale dace *C. neogaeus* (Dawley *et al.* 1987, Goddard & Dawley 1990, Goddard *et al.* 1998). Hybrids are found in various type of environments, such as ponds, streams or lakes (Scott & Crossman 1973, Schlosser *et al.* 1998, Leung *et al.* 2016, Vergilino, Leung & Angers 2016), and, as sperm-dependent, they co-occur with at least one of the parental species. Within natural conditions, *C. eos-neogaeus* clones are phenotypically as variable as their sexual sperm-donor, suggesting that they may cope with environmental heterogeneity with as much phenotypic variation than a genetically variable sexual species (Doeringsfeld *et al.* 2004). Their capacity to adjust their phenotype according to environmental conditions was also

highlighted by recent studies that reported distinct epigenetic profiles according to environmental conditions (Massicotte & Angers 2012, Leung *et al.* 2016). In addition to the absence of male preference for sexually-reproducing females (Barron *et al.* 2016), hybrids *C. eos-neogaeus* present fitness advantages that promote their proliferation compared to sexual parental species, as they display higher absolute fecundity and growth rate (Mee *et al.* 2013), and greater physiological tolerance to oxygen stress (Schlosser *et al.* 1998) compared to sexual *C. eos*. The two biotypes exhibit however distinct parasite load (Mee & Rowe 2006) and morphology (Schlosser *et al.* 1998, Doeringsfeld *et al.* 2004), suggesting that they use distinct niches, which may explain the stable coexistence of the sperm-dependent hybrids with their sexual hosts.

4.4.2. Sampling and genetic identification

Two regions in southern Quebec (Canada) were surveyed for this study. The contrasting distribution of the different lineages in southern Quebec allows an interesting experimental design to compare the GPG and FNV models (Leung *et al.* 2016, Vergilino, Leung & Angers 2016). Indeed, the Western region is characterized by the presence of a single widespread hybrid lineage, whereas the presence of distinct hybrid lineages within one drainage basin was reported in the Eastern region. These two regions are also characterized by the scarcity of the parental species *C. neogaeus*, making the parental species *C. eos* the principal sperm-donor of *C. eos-neogaeus* (Angers & Schlosser 2007, Vergilino, Leung & Angers 2016).

Adults of *C. eos-neogaeus* and *C. eos* were sampled from a total of 20 localities (Table 4.1). Because high- and low-velocity habitat conditions are known to influence fish morphology (McGuigan *et al.* 2003, Berner *et al.* 2008, Collin & Fumagalli 2011, Senay *et al.* 2015), 10 small lakes or ponds and 10 streams were selected in order to maximize phenotypic differences according to contrasting environmental conditions in natural populations.

Table 4.1. Characteristics of sampled sites in natural conditions. Site and lineage codes are according to Vergilino, Leung & Angers (2016).

Region	Habitat type	Hybrid lineages	Site	Geographic coordinates		Sample size		
						<i>C. eos</i>	hybrids	Total
West-QC	Lake	B-01	AS-1	45°55'00.9"N	74°04'22.5"N	12	19	31
West-QC	Lake	B-01	AS-16	46°05'35.3"N	73°52'15.5"N	19	35	54
West-QC	Lake	B-01	AS-7	45°59'23.5"N	74°00'00.0"N	11	17	28
West-QC	Lake	B-01	NO-7	45°56'37.6"N	74°11'37.7"N	1	13	14
West-QC	Stream	B-01	AS-15	46°05'34.6"N	73°52'20.4"N	1	10	11
West-QC	Stream	B-01	AS-8	46°05'20.8"N	73°57'21.8"N	4	28	32
West-QC	Stream	B-01	NO-4	45°54'16.3"N	74°18'46.0"N	4	16	20
West-QC	Stream	B-01	NO-9	45°56'04.3"N	74°06'11.3"N	2	29	31
West-QC	Lake	-	AS-5	45°59'17.1"N	74°00'24.7"N	32	0	32
West-QC	Lake	-	NO-10	45°55'32.4"N	74°03'51.1"N	20	0	20
West-QC	Lake	-	PN-1	46°12'43.0"N	75°13'60.0"N	23	0	23
East-QC	Stream	A-06	CO-1	45°09'15.1"N	71°32'53.3"N	16	17	33
East-QC	Stream	A-06	SF-14	45°11'04.5"N	71°33'13.2"N	13	35	48
East-QC	Stream	A-11	RI-2	45°02'35.8"N	72°21'43.1"N	16	17	33
East-QC	Stream	A-11	RI-4	45°03'01.4"N	72°19'03.3"N	16	10	26
East-QC	Lake	A-18	SF-12	45°07'48.5"N	71°40'21.9"N	22	31	53
East-QC	Stream	B-06	SF-4	45°14'01.8"N	71°54'28.0"N	18	19	37
East-QC	Lake	B-06	SF-7	45°12'56.7"N	71°54'31.5"N	22	16	38
East-QC	Lake	-	CH-2	45°29'03.7"N	71°04'48.3"N	20	0	20
East-QC	Stream	-	SF-10	45°12'37.3"N	71°56'10.2"N	30	0	30
Total						302	312	614

Total DNA from the caudal fin of each individual was extracted according to Sambrook *et al.* (1989). Genetic identification of individuals was performed according to Binet & Angers (2005) to discriminate the different biotypes and according to Vergilino, Leung & Angers (2016) to identify the different hybrid lineages. As the hybrid biotype reproduces clonally, individuals of a given lineage are expected to be genetically identical, whereas genetic differences are observed among lineages (Vergilino, Leung & Angers 2016).

4.4.3. Common garden experiments

The transfer from natural to controlled conditions allowed the manipulation of the potential for phenotypic plasticity by measuring alternative induced phenotypes according to different environmental cues. Common garden experiments were performed to provide a stable and homogeneous environment in aquarium: luminosity was set up according to natural photoperiod, temperature was constant at 19°C, oxygen was maintained at saturation level and individuals were fed *ad libitum*. A single trophic niche was mimicked by feeding fish with floating micro-pellets fish food, constraining individuals to reach the surface of the water to eat. Larvae (< 1 cm) were sampled from one lake (n = 24; site AS-16: 46°05'35.5"N 73°52'15.7"W) and one stream (n = 39; site RI-2: 45°02'35.8"N 72°21'43.1"W). Because morphological changes can occur rapidly in controlled conditions (Proulx & Magnan 2004, Laporte *et al.* 2016), experimental conditions were maintained during five months. At the end of the experiment, individuals reached adult size (\approx 5 cm), and were sacrificed and genetically identified according to the procedure described above.

4.4.4. Morphological measurement

Given the link between mouth morphology and trophic niche (Keast & Webb 1966, Langerhans *et al.* 2003, Carlson & Wainwright 2010, Gerry *et al.* 2013), the shape of the head was measured on individuals reared in common gardens and those sampled from natural localities. Geometric morphometrics (Adams *et al.* 2004, Mitteroecker & Gunz 2009, Klingenberg 2010, Zelditch *et al.* 2012) was used to quantify shape variation of fishes based on a two-dimensional system. Close-up of the left side of head was digitized using macro photography with the camera lens positioned parallel to the plane of the fish in lateral view, and eight homologous landmarks were positioned (Figure 4.1) on digitized pictures using TPSDIG2 software (Rohlf 2010).

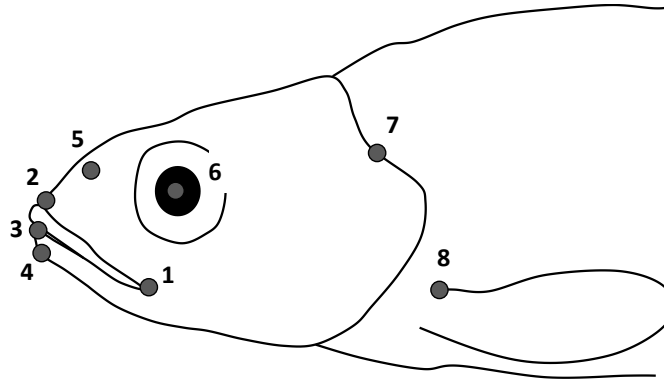


Figure 4.1. Schematic positions of the eight landmarks. The shape of the head was assessed with landmarks around the mouth (1 to 4), the posterior part of the nostril (5), the middle of the eye (6), the dorsal peak of the operculum (7) and the insertion of the most dorsal pelvic spin (8).

4.4.5. Statistical analyses

All statistical analyses were computed with the statistical programming environment R version 3.2.4. Specifically, we used the *geomorph* package version 3.0.2 (Adams & Otárola-Castillo 2013) for standard geometric morphometric analyses and the *vegan* package version 2.3-2 (Oksanen *et al.* 2015) for multivariate analyses.

The configurations of landmarks were subjected to a Generalized Procrustes Analysis that standardizes and rotates landmarks coordinates. This analysis allowed to rule out any information not related to intrinsic form; *i.e.* size, position and orientation of individuals relative to picture digitization (Gower 1975, Rohlf & Slice 1990, Rohlf 1999, Mitteroecker & Gunz 2009). Shape variables were thereafter extracted from the resulting aligned Procrustes coordinates projected to the shape-tangent space (Dryden & Mardia 1993, Rohlf 1999) before their use for subsequent multivariate analyses.

To estimate measurement error due to parallax in 2D imaging, a subsample of 100 individuals randomly chosen from natural populations were digitized twice by different operators. Similarly, landmark positioning error was estimated by placing landmarks twice for a subsample of 100 pictures randomly chosen from a given digitizing session. The relative amount of shape variation attributable to image digitizing or landmark positioning were assessed

using a Procrustes ANOVA analysis (Klingenberg & McIntyre 1998) and significance were tested with permutation tests using 999 randomization.

Individuals were identified according to their biotype (sexual species *vs* hybrid lineages) and the environment where they came from (common garden *vs* sampled localities). Partial redundancy analyses (Borcard *et al.* 1992) were used to assess the genetic and environmental effects on the total shape variation. Orthogonal dummy variables obtained by Helmert contrast (Legendre & Legendre 1998, Legendre & Anderson 1999) were used to code the different factors and their interactions. The percentages of the total shape variation that can be attributed to biotypes and environments were based on the adjusted R^2 (R^2_a) (Peres-Neto *et al.* 2006) and significance of each fraction was tested by permutation tests using 999 randomizations. When comparisons involved nested factors (*e.g.* habitat-types/sampled-localities or hybrids/lineages), fixed and random factors were identified and *P*-values were adjusted accordingly (Collyer *et al.* 2015). Phenotypic trajectory analyses (Collyer & Adams 2007, Adams & Collyer 2009, Collyer & Adams 2013) were used to compare the magnitudes and direction of shape changes due to the transfer from natural to controlled condition for clonal and sexual individuals.

Within-site shape variation was used to assess the extent of niche use in natural localities. Analyses of multivariate homogeneity of group dispersions (Anderson 2006), a multivariate analogue of Levene's test for homogeneity of variance, were performed to compared within-site variation for individuals in both controlled and natural conditions. Euclidean distances between all pairs of specimens in tangent space were used as an approximation of Procrustes distances (Dryden & Mardia 1998) because distortions are expected to be negligible even in the case of large shape variation (Marcus *et al.* 2000). Groups of individuals were defined according to their sampled location (specific natural localities *vs* common garden) and their biotypes (sexual species *vs* hybrids). Groups of hybrid individuals were also specified according to their lineage to emphasize the genetic uniformity of individuals within a given lineage. For each group, distances between individuals and centroid were computed. The mean distance to centroid of each individual within a given environment was then subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) if normality and homoscedasticity of the data were observed. Otherwise, data were log-transformed before ANOVA analyses. *Post-hoc* corrections were performed for cases of multiple comparisons, using Tukey's 'Honest Significant Difference' (HSD) test.

4.5. Results

4.5.1. Measurement error

Procrustes ANOVA analyses revealed that shape variations are not different between the landmark positioning ($P = 0.999$) or imaging ($P = 0.168$) sessions. Moreover, variation due to inter-individual differences was much higher than within-individual variation due to landmark positioning ($R^2 = 97.31\%$, $P = 0.001$) or individual digitizing ($R^2 = 87.99\%$, $P = 0.001$). These results indicated that shape differences detected between two different randomly selected individuals were higher than differences due to landmark positioning or imaging of one individual. Measurement error was therefore considered as low since inter-individual variation was expected to be higher than the proportion of variation due to fish manipulation or landmark positioning.

4.5.2. Common garden experiments

Genetic identification of individuals from common garden revealed a total of 28 sexual *C. eos* and 11 individuals of the A-11 lineage from the RI-2 stream and 24 individuals of the B-01 lineage from the AS-16 lake. Focusing on individuals reared in homogeneous conditions enabled to minimize the environmental effect on phenotypic variation, and thus, a group of genetically identical individuals (clonal biotype) is predicted to be less variable than a group of genetically variable individuals (sexual biotype) because of the genetic influence on phenotypic variation. As expected, analysis of variation of individuals in controlled conditions revealed that both clones displayed lower morphological variation than the group of sexual individuals ($P < 0.012$, Tukey HSD *post-hoc*, Figure 4.2). Partition of shape variation revealed also significant shape differences among the three groups ($R^2_a = 13.03\%$, $P = 0.001$), confirming – once again – the genetic effect on phenotypic variation. Moreover, shape differences were still detected among genetically identical individuals reared in a homogeneous environment, suggesting that stochastic factors might play a role on phenotypic variation.

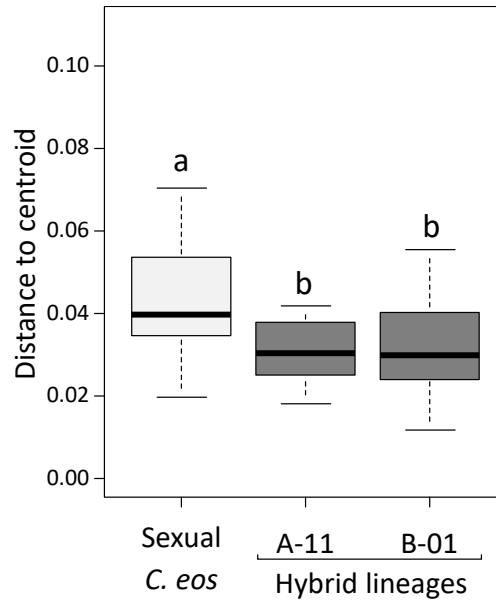


Figure 4.2. Morphological variation within common garden. Results of ANOVA analysis of groups' dispersion. Pairwise comparisons sharing different lowercase letters are significantly different ($P < 0.012$, Tukey HSD).

Transfer from natural to controlled conditions induced significant changes in the shape of both *C. eos* and clonal individuals ($R^2_a = 14.26\%$, $P = 0.001$). The proportion of shape variation explained by the transfer was of the same extent for *C. eos* individuals ($R^2_a = 22.36\%$, $P = 0.001$) and the two clones ($R^2_a = 24.31\%$ and 19.51% , $P = 0.001$ for A-11 and B-01 respectively).

However, sexual *C. eos* and both clonal lineages did not respond to the transfer in the same way (Groups \times Environments interaction: $R^2_a = 2.74\%$, $P = 0.001$). Interestingly, trajectory analyses confirmed that no difference in shape changes was detected in term of path distance magnitude ($P > 0.204$) among the three groups (Figure 4.3.A). At the opposite, shape trajectory differed in term of direction of changes according to the type of natural site origin: shape change trajectories of *C. eos* and lineage A-11 individuals, that came from the same natural sampling stream, displayed the same direction ($P = 0.704$), whereas a non-parallel shape trajectory was observed for lineage B-01 individuals that were sampled from a lake, compared to the two other groups ($P < 0.003$; Figure 4.3.A).

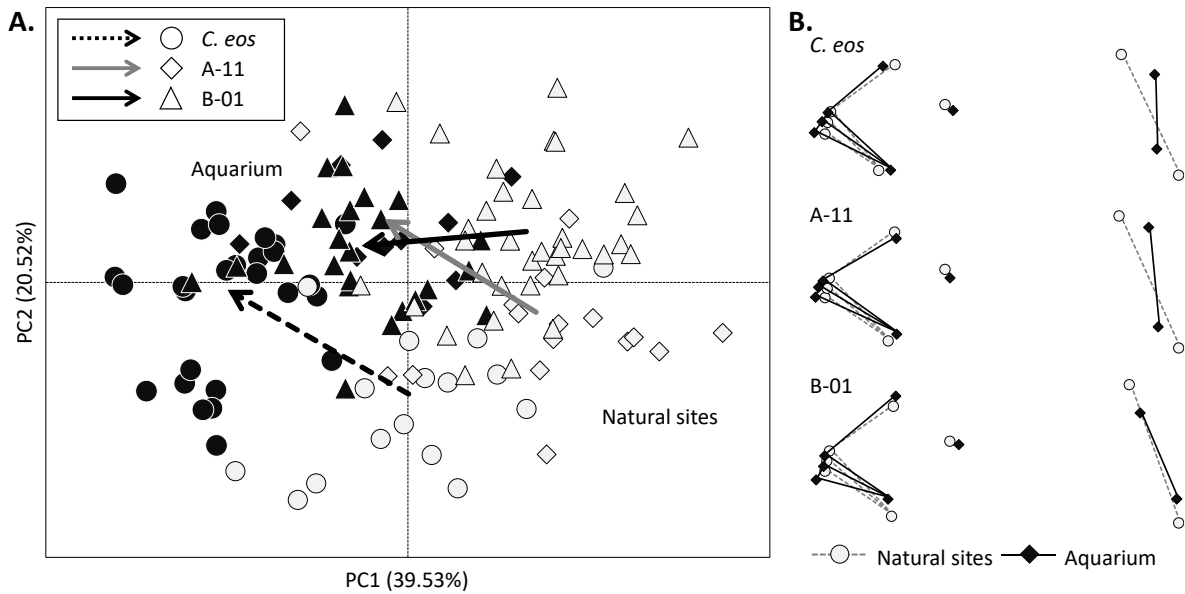


Figure 4.3. Morphological changes due to the transfer from natural to controlled conditions. (A) Principal component analysis with individuals from natural conditions (open symbols) and those reared in common garden (filled symbols). Arrows represent the magnitude and direction of morphological changes for *C. eos* (dotted black), lineage A-11 (solid gray) and lineage B-01 (solid black). (B) Landmarks of the mean shape of natural (open symbols) and controlled (filled symbols) conditions for each group. Morphological changes were magnified tree times to show shape differences.

Transfer from natural to controlled conditions induced a similar change in the shape of the mouth's angle for the three groups (Figure 4.3.B), suggesting that identical feeding mode resulted in the same morphological changes. However, a more pronounced shift was observed at landmarks #7 and #8 for *C. eos* and lineage A-11 individuals sampled from the same stream compared to lineage B-01 individuals sampled from the lake (Figure 4.3.B). This difference indicated that changes at the level of the operculum and the pectoral fin occurred according to sampled sites but not the biotype.

4.5.3. *C. eos* and hybrids in natural conditions

The sexual *C. eos* was found in allopatry in five localities while both sexual and clonal individuals were found in sympatry in the remaining 15 sampled sites (Table 4.1). Given the

low sample size relative to the number of landmarks (< 8), *C. eos* individuals were not included in morphological analyses for 5 sites. For each of the 10 remaining sites where sexual and clonal individuals were found in sympatry, biotypes occurred in equal proportion (χ^2 , $P > 0.265$ after Holm (1979) correction for multiple comparisons), except in site SF-14 where more hybrid individuals were sampled compared to *C. eos* individuals (χ^2 , $P = 0.018$ after Holm correction for multiple comparisons). From the total of 614 individuals, 602 individuals, 290 *C. eos* and 312 clonal individuals, sampled from 20 field sites were retained for geometric morphometric analyses.

The sexual *C. eos* and clonal hybrid individuals displayed the same amount of morphological variation as both groups displayed the same dispersion to group centroid ($F_{1,600} = 0.8635$; $P = 0.383$). This result highlights the propensity of clonal individuals to display as much phenotypic variation as the sexual species despite less genetic variation among individuals. A significant difference in shape was detected between *C. eos* and hybrids ($R^2_a = 19.03\%$, $P = 0.001$). However, there is an important overlap between biotypes indicating that individuals of a given biotype can be more different than individuals from distinct biotypes (Figure 4.4).

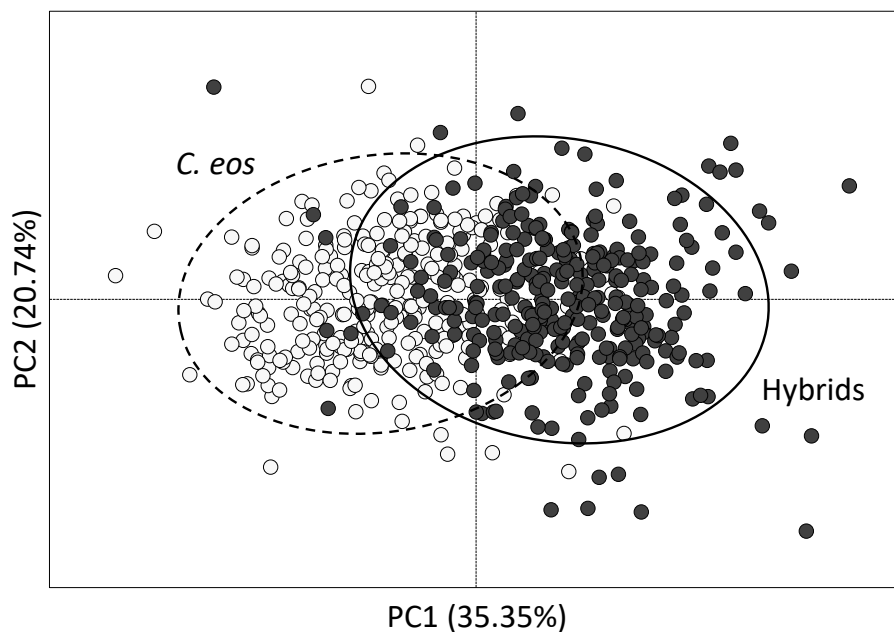


Figure 4.4. Shape variation of individuals from natural populations. PCA scatter plot with 95% confidence interval ellipses for *C. eos* (open circles and dotted line) and hybrid *C. eos-neogaeus* (filled circles and solid line).

Despite the presence of several lineages in some sample sites (Vergilino, Leung & Angers 2016), only five distinct lineages (genotypes) within hybrid individuals, *i.e.* those represented by more individuals, were included in morphological analyses (Table 4.1). Because every hybrid lineage was not found in all sites, sites were sorted according to the genotype of the clonal hybrids they harbored. Those groups were thereafter used as co-variable in subsequent partition of variation analyses to control for the genetic differences that exist among the distinct lineages of clonal individuals as well as for the sexual *C. eos* species at those sites.

Significant shape differences were detected among sampled sites for sexual individuals ($R^2_a = 26.31\%$, $P = 0.001$). Despite this site effect, the shape of *C. eos* individuals was significantly different according to the type of environments (lake vs streams: $R^2_a = 9.26\%$, $P = 0.001$, after update for nested factors) and the presence or absence of hybrids within the same sampled site ($R^2_a = 5.10\%$, $P = 0.009$). However, when considering populations of *C. eos* in sympatry with hybrids, the shape of *C. eos* individuals was not influenced by the genotype of hybrid lineages: populations sharing the same hybrid lineage were not significantly different from those with distinct hybrid lineages ($R^2_a = 9.87\%$, $P = 0.245$).

For clonal individuals, significant shape differences were also detected among sampled sites ($R^2_a = 25.02\%$, $P = 0.001$) and among different hybrid lineages ($R^2_a = 9.28\%$, $P = 0.001$). But, contrary to *C. eos* individuals, the shape of clonal individuals was not significantly different between the two type of environments (lake vs streams: $R^2_a = 1.36\%$, $P = 0.293$). Despite this lack of shape differences between lake- and stream-type environments, clonal individuals were however more different among stream-localities than lake-localities. Indeed, restricting analyses with lineage B-01 that was found in the two types of environment, partition of variation revealed that lower inter-site variation is observed among lake-type environments ($R^2_a = 6.49\%$, $P = 0.001$) compared to stream-type ones ($R^2_a = 16.29\%$, $P = 0.001$).

4.5.4. *C. eos* and hybrids in sympatry

To take into account environmental differences among sites, comparison of sexual and clonal individuals was restricted to the 10 localities where both biotypes are sympatric. Morphological variation can be explained by biotypes ($R^2_a = 20.20\%$, $P = 0.001$) and sites ($R^2_a = 7.89\%$, $P = 0.001$). However, a significant Biotypes \times Sites interaction ($R^2_a = 5.59\%$, $P = 0.001$) indicated

that variation among sites is dependent of the biotype. Partition of variation was made separately for each biotype by taking the different populations sharing the same hybrid lineages as co-variable. This analysis revealed a higher site effect in sexual individuals ($R^2_a = 8.19\%$, $P = 0.001$) than in clonal hybrids ($R^2_a = 5.32\%$, $P = 0.001$). Except for the lineage A-18 that was found in a single lake, the proportion of morphological variation explained by sampled site is identical (lineages A-06 and A-11 from exclusively stream-type environments) or half lower (lineages B-01 and B-06 involving lake-type environments) for the clonal individuals compared to their relative sympatric sexual species (Figure 4.5; Table 4.1).

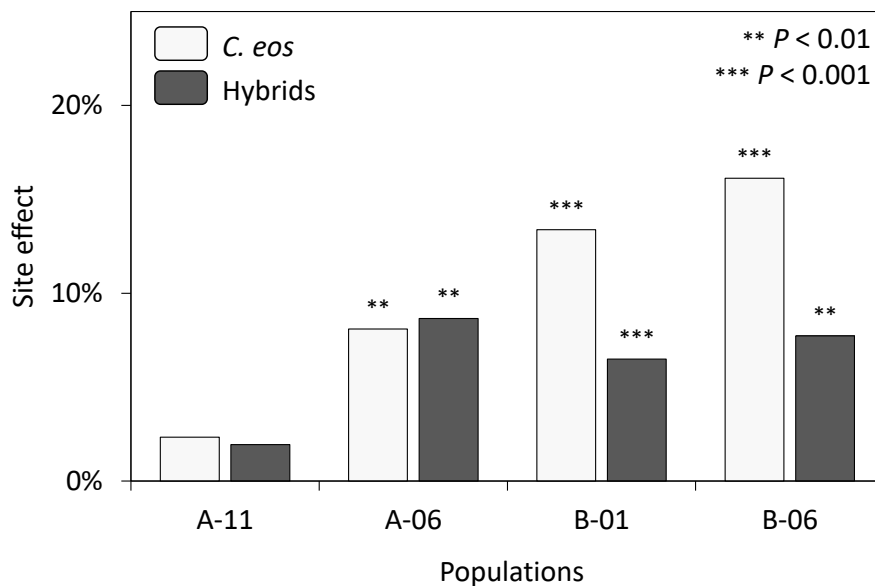


Figure 4.5. Proportion of shape variation explained by sampled sites. Populations of *C. eos* (open boxes) and hybrids *C. eos-neogaeus* (filled boxes) refer to groups of localities sharing the same hybrid lineage.

4.5.5. Intra-site variation

Given the influence of the environment on measured morphological variation, analyses of multivariate homogeneity of group dispersions were performed in order to estimate the extent of niche occupation within a given site. Morphological variation within a given site differed according to sampled site for both sexual ($F_{14,275} = 2.103$, $P = 0.0119$) and clonal ($F_{14,297} = 4.143$, $P < 0.001$) individuals. No difference was detected for sexual *C. eos* individuals according to

environmental types in natural populations (lake *vs* stream: $F_{1,13} = 0.262$, $P = 0.618$), presence or absence of hybrid within the site ($F_{1,13} = 0.025$, $P = 0.877$) or hybrid genotypes in sympatric populations ($F_{4,5} = 1.86$, $P = 0.255$) indicating site-specific effects. On the other hand, while the morphological variation of clonal individuals was not different among hybrid lineages ($F_{4,10} = 0.333$, $P = 0.850$), a higher morphological variation was detected in lake-type compared to stream-type environments ($F_{1,13} = 4.757$, $P = 0.0481$).

Focusing on sites where both biotypes were found in sympatry, the same morphological variation was observed for both sexual *C. eos* and clonal individuals within a given site ($P > 0.369$, Tukey HSD *post-hoc*; Figure 4.6).

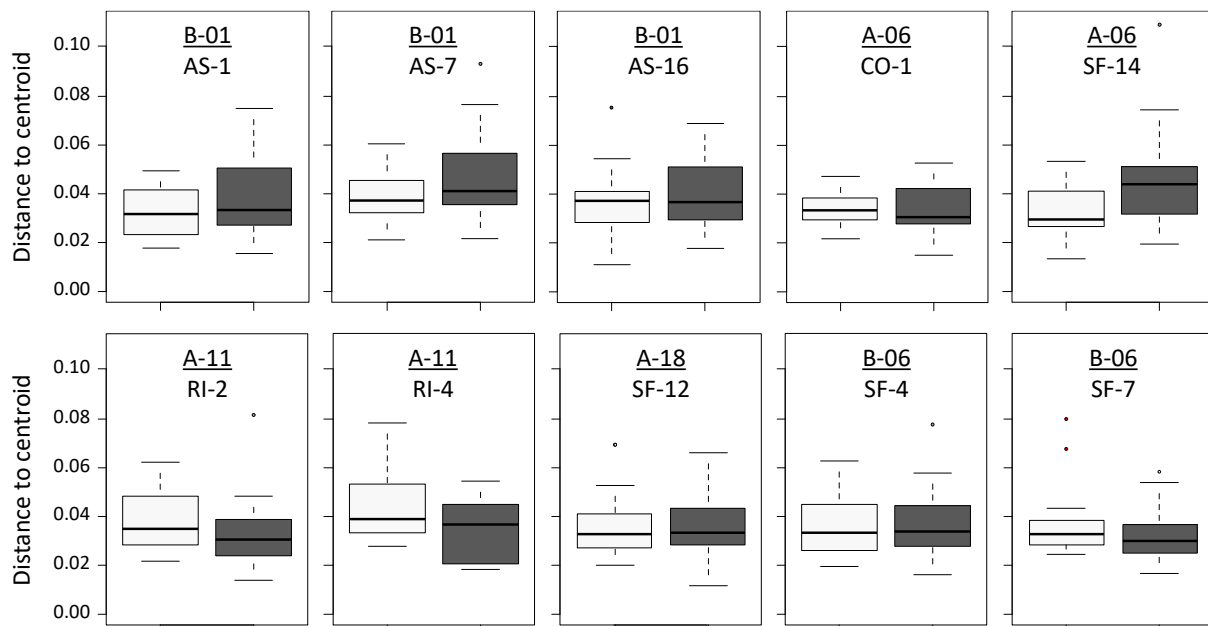


Figure 4.6. Intra-site shape variation in sympatric localities. Boxplot with median, quartiles and range of individuals distance to centroid to assess *C. eos* (open boxes) and hybrid (filled boxes) individuals dispersion within each site. Lineages (underlined) and sites code are according to Table 4.1.

This result contrasts with the measured variation within common garden environment where *C. eos* individuals displayed higher variation than clonal ones (Figure 4.2). Interestingly, the comparison of intra-site morphological variation of individuals reared in controlled conditions with those from their respective sampled site revealed that individuals displayed the

same variation in controlled and natural conditions for sexual *C. eos* ($F_{1,42} = 1.172$, $P = 0.285$) and lineage A-11 ($F_{1,26} = 0.314$, $P = 0.580$) from the same sampled stream. However, a reduction of morphological variation was observed for clonal individuals of lineage B-01 from the lake-type environment when reared in an homogeneous environment ($F_{1,57} = 4.564$, $P = 0.037$; Figure 4.7).

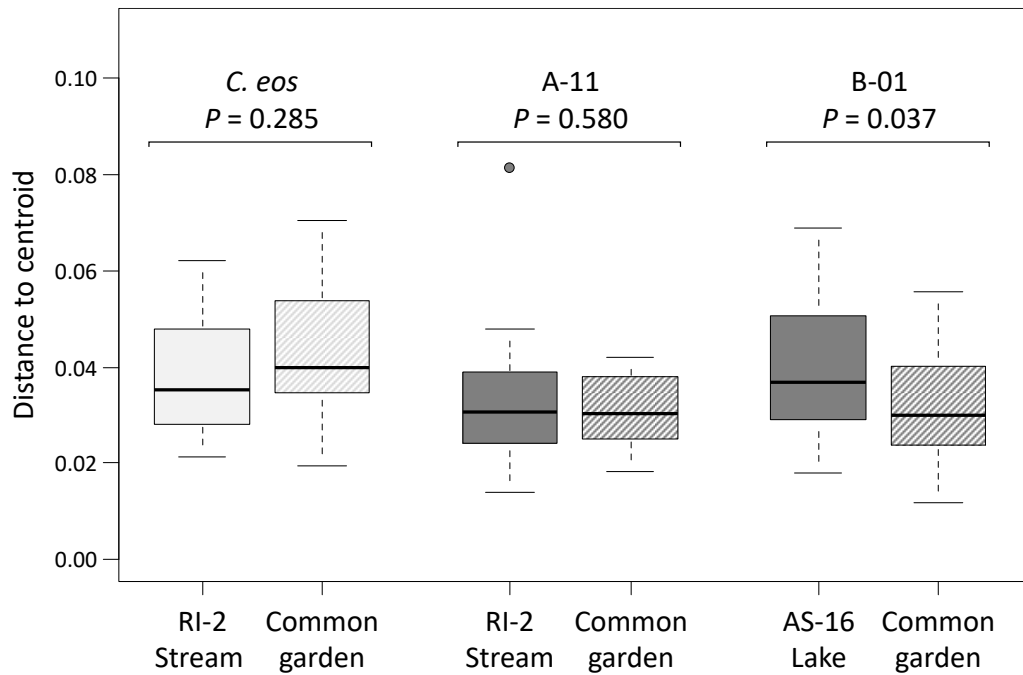


Figure 4.7. Effect of homogeneous environment on intra-site shape variation. Boxplot with median, quartiles and range of individuals distance to centroid to assess *C. eos* (open boxes) and hybrid (filled boxes) individuals dispersion within natural localities (plain) and common garden (dashed). Lineages and sites code are according to Table 4.1.

4.6. Discussion

In this study, we used trait-based ecology to describe the trophic distribution of sexual and clonal individuals in the *Chrosomus eos-neogaeus* gynogenetic complex. Common garden experiments first highlighted the capacity of all individuals to cope with environmental heterogeneity *via* phenotypic plasticity. Thereafter, the partition of morphological variation in natural conditions showed that phenotypic plasticity promotes niche diversification in genetically identical individuals.

4.6.1. Sources of phenotypic variation

The influence of genetic variation on phenotype is confirmed by the higher morphological variation for sexual compared to clonal individuals detected within controlled conditions. The different genomic composition between sexual *C. eos* and hybrids *C. eos-neogaeus* also resulted in shape differences. The influence of stochastic epigenetic changes (Leung *et al.* 2016) was also underlined by shape differences detected among genetically identical individuals within a homogeneous environment.

Despite these genetic and stochastic effects, the same response was observed following the transfer from natural to controlled conditions for both sexual and clonal individuals. The artificial feeding mode has resulted in a similar change at the level of mouth angle for all the biotypes. Moreover, the total absence of water velocity within the aquariums have caused similar changes at the level of the operculum and the pectoral fin for fish from streams, but different changes were observed for individuals sampled from a lake, regardless of biotypes. Although individuals of the sexual *C. eos* are genetically variable, morphological differences detected between individuals reared in common garden and those from their relative natural sites could not be attributed to the result of different adaptations as comparisons were made with individuals that all originated from the same population.

Altogether, these results highlight the predominant role of the environment on the measured morphological variation and confirm therefore that the mouth morphology measured in this study represents a good *proxy* of *Chrosomus spp.* feeding ecology. More importantly, the convergence toward a similar morphology in response to the same environmental change suggests that both sexual *C. eos* and clonal *C. eos-neogaeus* display the same potential for phenotypic plasticity, a key component to promote population divergence and allow persistence of lineages (Pfennig *et al.* 2010).

4.6.2. Distribution of morphological variation in natural populations

An important overlap is observed between sexual and clonal individuals over all natural localities indicating that individuals of different biotypes could be more similar than individuals of a given biotype. However, significant shape differences were still observed when controlled for sites suggesting that, on average, coexisting biotypes exploit different niches within a given

site. This result is consistent with previous studies that have reported different parasite loads (Mee & Rowe 2006) in addition to morphological differences between both biotypes (Schlosser *et al.* 1998, Doeringsfeld *et al.* 2004).

All clonal individuals of the lineage B-01 similarly responded to the homogeneous environment signal of common garden, resulting in a low morphological variation. We can therefore interpret the high intra-site variation of clones in natural conditions as the response to diverse environmental conditions. Hybrids in natural environments are thus expected to occur in a large gradient of environmental heterogeneity. The use of phenotypic plasticity allows clonal individuals to cope with environmental heterogeneity resulting in a higher intra-site variation in natural sites, which is consistent with the predictions of the niche diversification hypothesis.

Surprisingly, no such niche diversification was observed in sexual *C. eos*, as they displayed the same intra-site variation in both natural and controlled conditions indicating that the sexual species rely essentially on genetic variability, and less on phenotypic plasticity, to diversify their niches.

4.6.3. Coexistence of sexual and asexual forms

The different models explaining the coexistence of sexual and asexual forms in gynogenetic complexes involve competitive abilities of sexual forms to prevent their extinction (Agrawal 2001, Schlupp 2005, Heubel *et al.* 2009). However, the absence of superior performance of sexual against asexual forms observed in many studies (Booij & Guldemond 1984, Schlosser *et al.* 1998, da Barbiano *et al.* 2010, Scharnweber *et al.* 2011, Mee *et al.* 2013) suggests that other factors may explain their stable coexistence.

The sexual *C. eos* displayed the same extent of trophic niche use in both lake- and stream-type habitats and also notwithstanding the presence of hybrids in sympatry. However, also reported by Schlosser *et al.* (1998), *C. eos* individuals displayed distinct mouth morphology in sites where they are found in sympatry with hybrid biotypes compared to sites where they are found in allopatry. This shape difference according to the presence or absence of hybrids in sympatry may represent a confounding factor with the effect of environmental conditions. This result suggests therefore the use of different quality of trophic niche by *C. eos* individuals that

hybrid individuals could not reach. Those observations, coupled with the morphological differences between biotypes, suggest that sexual *C. eos* do not share their trophic niche with clonal *C. eos-neogaeus*.

At the opposite, hybrids *C. eos-neogaeus* were detected to be less morphologically variable in streams than in lakes. Given the fact that several hybrid lineages were found in sympatry in streams but not in lakes (Vergilino, Leung & Angers 2016), our results provide indirect evidence supporting the FNV model (Vrijenhoek 1984). Indeed, the narrower niche detected in streams might suggest that the sampled lineage used only a fraction of the total niche to reduce competition among individuals by sharing the different resources with the other lineages. Intra-specific competition between clonal individuals may therefore prevent them from their proliferation due to the two-fold competitive advantage (Pound *et al.* 2002). However, this hypothesis remains to be tested, as only a single lineage per site was analysed in this study due to the low abundance of other sympatric lineages.

Interestingly, the high morphological variation observed in lake-type habitats involved essentially the lineage B-01. This lineage has a very broad distribution (Angers & Schlosser 2007, Vergilino, Leung & Angers 2016) and has the particularity to be plastic by displaying environmentally-induced epigenetic variation (Massicotte & Angers 2012, Leung *et al.* 2016). In West-Quebec region, lineages found in streams are more likely to originate from *in situ* hybridization events, whereas the lineage B-01 occurred during Pleistocene and colonized following glacier retreat (Vergilino, Leung & Angers 2016). The persistence of alternative lineages in lake-type environments may have been prevented because of the competitive exclusion principle (Hardin 1960) in these environments, but not in stream-type environments. Within a given lake, the flexible B-01 genotype may therefore occupy different ecological niches, as proposed by the GPG model (Massicotte & Angers 2012). Our results highlight this surprising capacity of the plastic lineage B-01 to modulate its range of effective ecological niche, which may explain its widespread distribution.

In either the FNV or the GPG model, the niche diversification of clonal individuals may help to avoid niche overlapping and reduce competition with the sexual form. For instance, even in the absence of male preference for sexually-reproducing females, the segregation of sexual and asexual individuals in the field may result in an indirect discrimination toward asexual

females, which may have less chance to be inseminated than the sexual females (Booij & Guldemond 1984). Niche diversification suggests however higher performance of asexual individuals compared to sexual ones. Thus, niche diversification alone cannot explain totally the paradoxical coexistence of sexual vs asexual individuals in a gynogenetic complex and other mechanisms involving a handicap toward asexual individuals are expected to exist.

4.7. Conclusion

This study shows that phenotypic plasticity may promote niche diversification in genetically identical individuals. Such use of phenotypic plasticity is of importance to explain the persistence of organisms in absence of genetic variation. It supports the niche diversification hypothesis to explain (at least partially) the stable coexistence of sexual and asexual individuals in the *C. eos-neogaeus* gynogenetic complex. In contrast to the hypothesis that clonal individuals must display a narrower niche than sexual related species, niche diversification appeared more important in clonal than in sexual individuals within a given sampled site. While niche separation may help to minimize competition with sexual individuals, diversification of niche did not limit the hybrids to small population size.

4.8. Acknowledgments

We are extremely grateful to Antoine Dallaire for laboratory assistance and biologists from Quebec minister of natural resources and wildlife for providing samples from some localities. Sampling and common garden experiments were performed under institutional animal care guidelines (permit #13-084 delivered by the *Université de Montréal*), and conform to the mandatory guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Sampling permits were provided by the Quebec Ministry of Natural Resources and Wildlife (MRNF). This research was supported by *Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies* (FRQNT), J-A Bombardier and Étienne Magnin scholarships to C.L and research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to B.A (#RGPIN/238600-2013) and S.B (#RGPIN/435656-2013).

Chapitre 5 :

COÛT DE LA PLASTICITÉ PHÉNOTYPIQUE

Asymmetry in dentition and shape of pharyngeal arches in the clonal fish *Chrosomus eos-neogaeus*: phenotypic plasticity and developmental instability

Christelle Leung, Kevin Karl Duclos, Thomas Grünbaum, Richard Cloutier et Bernard Angers

Accepté pour publication à *PLoS ONE*

(Format modifié pour les besoins de la présente thèse)

5.1. Résumé et contributions

L'environnement peut avoir différents effets au niveau des processus développementaux. Les signaux extrinsèques peuvent modifier les patrons de développement et résulter en des phénotypes alternatifs (plasticité phénotypique). L'environnement peut également être interprété comme un facteur de stress et accroître l'instabilité du développement (bruit développemental). Les asymétries directionnelle et fluctuante fournissent un contexte conceptuel afin de distinguer ces différents effets. Cette étude vise à déterminer si la variation au niveau des formules dentaires et de la forme des arcs pharyngiens des poissons du complexe *Chrosomus eos-neogaeus* résulte d'une instabilité développementale ou d'une réponse induite par un signal environnemental. La microtomodensitométrie à rayons X a été utilisée pour visualiser les arcs pharyngiens *in situ* à haute résolution. Les formules dentaires sont plus variables chez les hybrides, alors qu'elles sont plus stables chez les deux espèces parentales. La formule de base est symétrique tandis que la formule alternative la plus abondante est asymétrique. Chez le biotype hybride, une grande variation dans la proportion des individus

présentant des formules dentaires basale ou alternative est observée entre les sites malgré l'absence de différence génétique entre les individus. Les variations au niveau des formules dentaires et de la forme des arcs pharyngiens sont significativement expliquées par les sites d'échantillonnage et seuls les individus ayant une formule dentaire asymétrique présentent une asymétrie fluctuante en plus d'une asymétrie directionnelle au niveau de la forme des arcs pharyngiens. Les hybrides semblent ainsi sensibles aux signaux environnementaux et la variation au niveau des dents pharyngiennes n'est pas aléatoire, mais reflète une plasticité phénotypique. Dans l'ensemble, ces résultats confirment le rôle déclencheur de l'environnement vers une voie développementale alternative entraînant une asymétrie gauche-droite au niveau des formules dentaires et de la forme des arcs pharyngiens.

Les idées à la base de cet article ont été conçues par CL, TG et BA. L'échantillonnage et l'identification des différents biotypes par CL et TG, la numérisation des spécimens et la collecte des données en imagerie 3D par KD et TG, et l'analyse statistique de toutes les données par CL et BA. CL, KD, TG, RC et BA ont participé à la rédaction du manuscrit.

5.2. Abstract

The effect of the environment may result in different developmental outcomes. Extrinsic signals can modify developmental pathways and result in alternative phenotypes (phenotypic plasticity). The environment can also be interpreted as a stressor and increase developmental instability (developmental noise). Directional and fluctuating asymmetry provide a conceptual background to discriminate between these results. This study aims at assessing whether variation in dentition and shape of pharyngeal arches of the clonal fish *Chrosomus eos-neogaeus* results from developmental instability or environmentally-induced changes. A total of 262 specimens of the *Chrosomus eos-neogaeus* complex from 12 natural sites were analysed. X-ray microcomputed tomography (X-ray micro-CT) was used to visualize the pharyngeal arches *in situ* with high resolution. Variation in the number of pharyngeal teeth is high in hybrids in contrast to the relative stability observed in both parental species. The basal dental formula is symmetric while the most frequent alternative dental formula is asymmetric. Within one lineage, large variation in the proportion of individuals bearing basal or alternative dental formulae was observed among sites in the absence of genetic difference. Both dentition and arch shape of this

hybrid lineage were explained significantly by environmental differences. Only individuals bearing asymmetric dental formula displayed fluctuating asymmetry as well as directional left-right asymmetry for the arches. The hybrids appeared sensitive to environmental signals and intraspecific variation on pharyngeal teeth was not random but reflects phenotypic plasticity. Altogether, these results support the influence of the environment as a trigger for an alternative developmental pathway resulting in left-right asymmetry in dentition and shape of pharyngeal arches.

5.3. Introduction

The phenotype of an organism is the product of developmental processes and depends on the interactions among genetic, epigenetic and environmental factors. The survival of an individual is intimately dependent on the production of a consistent phenotype according to a specified environmental condition, a capacity defined as developmental stability (Møller & Swaddle 1997, Debat & David 2001). Developmental stability is therefore a fundamental characteristic of the development of a given genotype. However, organisms are not impervious to random perturbations and developmental instability refers to the deviation from the expected phenotype within a given environment (Palmer & Strobeck 1986, Palmer 1994). Measuring developmental instability represents a proximate way to assess the capacity of organisms to deal with different environments.

While developmental instability can be estimated by measuring the deviation between an observed and expected stable phenotype, this may be a challenging exercise when the optimal or expected phenotype is unknown, which is frequently the case in natural populations (Møller & Swaddle 1997). In organisms with bilateral symmetry, the use of bilateral homologous structures across the left-right axis of symmetry offers an accurate way to estimate developmental instability as the development of such structures is expected to be influenced by the same environment and the genotype.

However, the influence of the environment during development may result in different outcomes. The environment can be interpreted as a stressor and increase developmental instability (developmental noise; Waddington 1942, Debat & David 2001), while it may also

modify developmental pathways and result in alternative phenotypes (phenotypic plasticity; West-Eberhard 1989). Left-right asymmetry (L-R asymmetry), the deviation from one side to the other, provides a useful method to discriminate between developmental instability (developmental noise) and environmental influences (phenotypic plasticity) on morphological traits.

Random deviation from L-R symmetry within a given group refers to fluctuating asymmetry (FA) and is often associated to developmental instability (Klingenberg 2003). Indeed, FA is seemingly related to accidents during development due to epimutations or abnormalities in the process of ontogenesis (Leary & Allendorf 1989, Parsons 1990). FA is present, at a low degree, in normal development (Klingenberg & Nijhout 1999, Leamy & Klingenberg 2005, Graham *et al.* 2010) but can be increased when an individual is under genetic and/or environmental stresses (Parsons 1992).

On the other hand, directional asymmetry (DA) is a propensity for the trait on one side to develop differently than the other side. Such systematic differences between sides are under precise genetic control and could therefore not be the result of developmental instability. DA results from the particular embryonic development of a given species (Levin 2005) or a side-specific response to environmental conditions (Klingenberg 2003). Consistent phenotypic changes in response to a given environmental condition are referred to as phenotypic plasticity and this process is mediated by epigenetics-environment interactions (Weaver *et al.* 2004, Blewitt *et al.* 2006, Kucharski *et al.* 2008).

Fish teeth display a remarkable disparity in size, shape, number, as well as types and structures of attachment to tooth bearing arches or structures (Peyer 1968, Huysseune & Sire 1998). Freshwater cypriniform fishes have lost all dentition on the mandibular arch, while the seventh pharyngeal arch (the fifth branchial arch) has been modified into a tooth bearing pharyngeal jaw apparatus (Engeman *et al.* 2009). Dental formulae, referring to the number and arrangement of teeth on the pharyngeal arch, are important taxonomic characters for cyprinid fishes (Smith & Hocutt 1981). This character is generally stable within a given species and alternative dental formulae have been traditionally viewed as a consequence of developmental accidents during ontogeny (Evans & Deubler 1955, Eastman & Underhill 1973).

Fishes typically exhibit bilateral symmetry although internal organs, such as the brain, heart, pancreas and gut, show L-R asymmetry (Essner *et al.* 2005). Several factors are required for proper asymmetric patterning of the vertebrate embryo. In zebrafish, asymmetric development of the brain, heart and gut include monociliated cells within Kupffer's vesicle, and expression of fibroblast growth factors, retinoic acid, and *wnt11* genes (Albertson & Yelick 2005, Qian *et al.* 2013). These factors also appear to be involved in asymmetric craniofacial development and lateralisation of the pharyngeal skeleton in zebrafish (Albertson & Yelick 2005). Shape asymmetry of pharyngeal arches in the zebrafish results most frequently in modifications on the R-side (Albertson & Yelick 2005). This trend is frequently observed in dental formulae. When asymmetry occurs in teeth number, the missing tooth is always on the R-side leading to a higher tooth number on the L-side (Hubbs & Hubbs 1945, Stock 2007).

This study aims at assessing whether variation of the dentition and the shape of pharyngeal arches result from developmental instability or phenotypic plasticity. We determined the variation in dental formula as well as the shape of pharyngeal arch using X-ray microcomputed tomography (micro-CT scan). A growing body of research has shown the relevance of micro-CT scan and 3D imaging technology to ecological and evolutionary researches (Pasco-Viel *et al.* 2010, Pasco-Viel *et al.* 2014, Hung *et al.* 2015). This technology has become a cornerstone of the study of tooth morphology and development (Dong *et al.* 2014) because it allows a greater precision and incurs less physical loss compared to traditional methods (Pasco-Viel *et al.* 2010). Pharyngeal arches measure a few millimeters and teeth are very fragile, specimens were thus micro-CT scanned in order to observe tooth positioning and shape variation *in situ*. We estimate FA and DA based on the geometric shape of pharyngeal arches to discriminate whether variation was linked to developmental instability or rather phenotypic plasticity.

This study focuses on the clonal hybrid fish *Chrosomus eos-neogaeus* (Cyprinidae; Teleostei). The absence of genetic variation among individuals makes this asexual fish an ideal system to discriminate the effect of environmentally-induced from those associated to stochastic processes (Leung *et al.* 2016). Clonal fish *Chrosomus eos-neogaeus* resulted from hybridization between northern redbelly dace, *Chrosomus eos*, and finescale dace, *Chrosomus neogaeus*. Since all-female hybrids reproduce asexually by gynogenesis, a given genotype can be

represented by multiple individuals found in heterogeneous environmental conditions (Angers & Schlosser 2007, Leung *et al.* 2016). Moreover, multiple hybridization events led to multiple clonal lineages in distinct sites marked by contrasting environmental conditions (Vergilino, Leung & Angers 2016).

Previous studies reported that combination of different genomes in hybrids may result in higher developmental instability than observed in parental species (Palmer & Strobeck 1992, Demontis *et al.* 2010). One can therefore expect a higher FA in hybrids than in parental species as well as a similar level of variation in dental formulae among sites. On the other hand, if hybrids are more sensitive to a given environmental signal or respond to a lower threshold than parental species, FA is expected to be similar in hybrids and parental species while both shape and dental formula are expected to vary according to site. In addition, DA will reflect phenotypic plasticity when coupled to given phenotype or environmental conditions.

5.4. Material and Methods

5.4.1. Specimen sampling and identification

This research was performed under institutional animal care guidelines (permit #13-084 delivered by the *Université de Montréal*) and conforms to the mandatory guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Sampling permits were provided by the Quebec Ministry of Natural Resources and Wildlife (MRNF).

A total of 262 specimens of the *Chrosomus eos-neogaeus* complex were analysed from 12 natural sites (Table 5.1). The different biotypes were identified visually according to external morphological characteristics (New 1962) and confirmed using genetic markers according to Binet & Angers (2005). Specimens included 77 individuals of the paternal species *C. eos* from seven geographical localities, 32 individuals of the maternal species *C. neogaeus* from a single locality and 153 individuals of the *C. eos-neogaeus* hybrids from 12 localities. The assignment of hybrid individuals to a given lineage was achieved using the multilocus genotypes of eight hypervariable microsatellites loci as described in Vergilino, Leung & Angers (2016). A total of eight different hybrid lineages have been analysed (Table 5.1).

Table 5.1. Characteristics of the individuals analysed in this study.

Site	Latitude	Longitude	<i>C. eos</i>	<i>C. neogaeus</i>	Hybrids	Lineages	Total
AS-2	45.96619	-74.02876			9	B-01	9
AS-3	45.91480	-74.02802	30 (28)	32 (14)	19 (10)	B-01	81
AS-8	46.08910	-73.95606			9 (9)	B-01	9
AS-13	46.08710	-73.87888	10 (6)		31 (19)	B-01; B-02	41
NO-1	46.13102	-74.44616			9 (9)	B-01	9
NO-5	45.99389	-74.30582			11 (11)	B-01	11
NO-7	45.94379	-74.19381	4		5 (2)	B-01	9
NO-10	45.91693	-74.07292	10 (9)		11 (6)	B-01	21
RI-2	45.04327	-72.36197	6		9	A-11; B-03	15
SF-4	45.23383	-71.90777	8		6	B-06	14
SF-12	45.13015	-71.67275	9		4	A-18	13
SF-13	45.17686	-71.53598			30	A-06; A-07	30
Total			77 (43)	32 (14)	153 (66)		262 (123)

Sites, geographic location, biotypes, number of individuals analysed and hybrid lineages detected at those sites. Site names and codes of lineages referred to Vergilino, Leung & Angers (2016). Number in parentheses refers to the number of individuals analysed for shape. For hybrids, only individuals of lineage B-01 were analysed for shape.

5.4.2. Micro-CT scan

Pharyngeal arches were visualised using micro-CT scan. Ethanol preserved fishes were scanned with a SkyScan 1173 micro-CT scan (Brucker-MicroCT, 2011, Belgium). For all individuals, settings were kept constant: source voltage = 58 kV, source current = 71 μ A, exposure time = 465 ms, 3 averaging frames over 270° with a rotation step of 0.44°. Scanner flatfield was calibrated prior to each scanning session and flatfield correction was activated. Scans were acquired with no filter, medium resolution parameters (1080 x 1080 pixels) and the zoom was set between 17 and 19.9 μ m (a standard zoom of 17 μ m was used but had to be adjusted for larger specimens).

Projection images were reconstructed with constant parameters using NRecon (Version 1.6.6.0, SkyScan, Brucker-microCT, Belgium). Reconstruction parameters were kept constant: no smoothing, no beam hardening correction and ring artifact correction was kept at 10.

Reconstructed volumes were analysed with the CTAn package (Version 1.11.4.2, SkyScan, Brucker-micro CT, 2011, Belgium), in order to extract pharyngeal arches as volumes of interest for each specimen. Extraction of volumes was performed manually. Extracted volumes were then stacked with CTVox (Version 2.7.0, SkyScan, Brucker-microCT, 2011, Belgium) in order to visualise pharyngeal arches in 3D.

Extracted volumes were further analysed to produce 3D Polygon File Format mesh files (.ply files). Extracted volumes were converted from bitmap format to dicom format files (.DCM files) using SkyScan Dicom converter (Version 2.1; SkyScan, Brucker-micro CT, 2011, Belgium). Dicom files were subsequently loaded within the open-source software Slicer (Version 4.5; Fedorov *et al.* 2012).

3D models were rendered from dicom files using the editor module within Slicer and the thresholding algorithm. Generated models were verified individually and in conjunction with CTVox stacked volumes to ensure quality and fidelity. Model generation incurred artifacts such as holes within the pharyngeal arches and, when possible, thresholding was adjusted to reduce artifacts. Artifacts that did not hinder shape analysis or tooth counts were disregarded.

5.4.3. Counting pharyngeal teeth

The cyprinid dentition is commonly described with a dental formula (Jordan & Evermann 1896, Smith & Hocutt 1981) referring to the number of teeth in the different rows of the pharyngeal arch. North American cyprinids have one or two rows of teeth on each pharyngeal hemi-arch (Eastman & Underhill 1973). As an example, a dental formula 1,5-5,1 indicates the presence of one tooth of the minor row and five teeth on the major row of the L-side – then five teeth on the major row and one tooth of the minor row of the R-side. The most frequent and widespread dental formula within a given biotype was considered the basal pattern for that biotype.

Replacement teeth (*i.e.*, teeth not attached to the pharyngeal bone) were easily distinguished from functional teeth (*i.e.*, teeth attached to the pharyngeal bone) by rotating 3D reconstructions. By convention, dental formulae take into account only the functional teeth (Eastman & Underhill 1973). Teeth are constantly lost and replaced during the lifetime of a fish. Replacement teeth are synthesised and mineralised before they attach to the underlying bone (Huysseune & Sire 1998). The presence of teeth was extrapolated based on the presence of a

corresponding cavity associated with the loss of a functional tooth and the presence of a corresponding replacement tooth not yet attached to the bone (Eastman & Underhill 1973).

5.4.4. Shape of pharyngeal arches

Geometric morphometric analyses of 3D models were used to describe and measure shape of the seventh pharyngeal arch (the fifth branchial arch), here after referred to as the pharyngeal arches. A total of 123 individuals were analysed (Table 5.1), including 43 *C. eos*, 14 *C. neogaeus* and 66 hybrids of the same lineage (lineage B-01; Angers & Schlosser 2007, Vergilino, Leung & Angers 2016) from seven geographical localities. The presence of a single lineage among multiple localities represents a unique design to control for genetic differences among individuals and to disentangle the environmental effect on the shape of pharyngeal arches.

Pharyngeal arches (both L and R) of *Chrosomus eos-neogaeus* are rigid crescent-shaped structures displaying an outer curved ridge that is posterior to the arch, and an inner curve dorsal to the arch that delimit the tooth-bearing area. The outer and inner curves represent an important component of the shape of the pharyngeal arch since it covers most of its length. Seven landmarks and 26 sliding semi-landmarks were used to define the shape of both the left and right sides of the pharyngeal arch (Figure 5.1). Because pharyngeal arches lack bone sutures and foramina, we resorted to Type 2 landmarks which are locally defined points of homology (see (Zelditch *et al.* 2012). Landmarks were chosen based on their adequacy to describe the overall shape of the arch. Landmarks 1 (anterior-most tip) and 3 (dorsal-most tip) are the endpoints of the arch and serve as anchor points of the structure within the pharyngeal cavity. Sliding semi-landmarks (Gunz & Mitteroecker 2013) were used to better describe the complex curves of the arch. Thirteen semi-landmarks, delimited by landmarks 4 (change in curvature along the outer ridge) and 18 (anterior limit of the outer ridge), describe the shape of the outer curve of the pharyngeal arch. Thirteen semi-landmarks, delimited by landmarks 19 (change in curvature along the inner curve) and 33 (anterior limit of the inner curve), describe the inner curve of the pharyngeal arch (Figure 5.1).

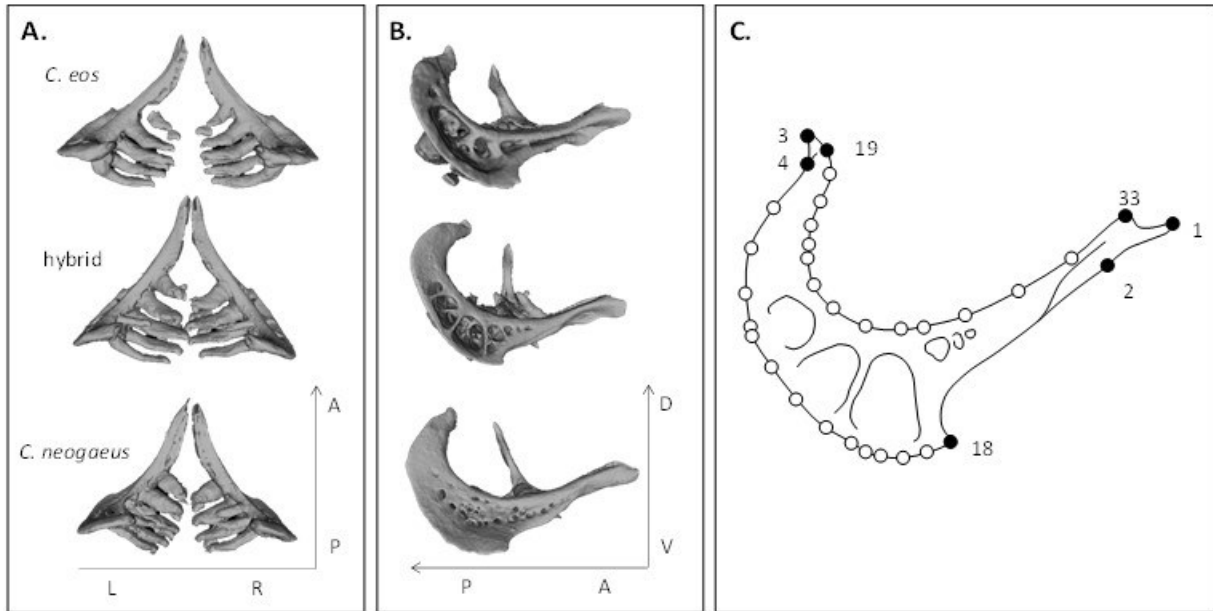


Figure 5.1. Pharyngeal arches of parental species and hybrids. (A) Dorsal and (B) lateral views of the pharyngeal arches. (C) Landmark scheme for the pharyngeal arches. Filled circles represent landmarks and open circles represent semi-landmarks. Landmarks were positioned on left and right sides of the arch. L: left, R: right, A: anterior, P: posterior, D: dorsal, V: ventral.

5.4.5. Statistical analyses

The configurations of landmarks were subjected to a Generalised Procrustes Analysis (GPA; Rohlf & Slice 1990) to standardize and rotate landmark coordinates. Sliding was performed using the minimum bending energy criterion in order to minimise the deformation between the target shape and the mean shape (Bookstein 1997, Mitteroecker & Gunz 2009) and to remove the arbitrary variation in the semi-landmark distribution and spacing. Following landmark superimposition, the R-side was reflected (by multiplying the x coordinates of each landmark and semi-landmark by ‘-1’) to allow landmark correspondence with the L-side. A second superimposition was thereafter performed to align left and right sides and shape variables were extracted from the resulting aligned Procrustes coordinates projected to the shape-tangent space (Dryden & Mardia 1993, Rohlf 1999).

Landmarks and semi-landmarks were digitised twice for each individual to estimate measurement error due to landmark positioning. The relative amount of shape variation

attributable to landmark positioning was assessed using a Procrustes ANOVA analysis (Klingenberg & McIntyre 1998) and significance was tested with permutation tests using 999 randomisations.

Phenotypic trajectory analyses (Collyer & Adams 2007, Adams & Collyer 2009, Collyer & Adams 2013) were used to compare the magnitude and direction of shape differences among *C. eos*, *C. neogaeus* and *C. eos-neogaeus* biotypes for the left and right sides separately.

Individuals were identified according to their biotype (*C. eos*, *C. neogaeus* or *C. eos-neogaeus*), sampled sites and dental formula. Partial redundancy analyses (Borcard *et al.* 1992) were used to assess the influence of sampled sites and dental formulae on the shape variation of *C. eos* and *C. eos-neogaeus*. The percentages of the total shape variation that can be attributed to different factors were based on the adjusted R^2 (R^2_a) (Peres-Neto *et al.* 2006) and significance of each fraction was tested by permutation tests using 999 randomisations.

Matching symmetry method (Klingenberg *et al.* 2002) was used to quantify L-R differences for all biotypes. Procrustes ANOVA was used to decompose shape variation into variation among individuals, between sides and individual \times side interaction (Klingenberg & McIntyre 1998). Directional asymmetry was measured using variation between sides and tested using individual \times side interaction as an error term. Fluctuating asymmetry was measured using individual \times side interaction and tested against measurement error due to landmark positioning.

Statistical analyses were computed with the statistical programming environment R version 3.2.4. We used the *vegan* package v. 2.3-2 (Oksanen *et al.* 2015) for multivariate analyses and *geomorph* package v. 3.0.2 (Adams & Otárola-Castillo 2013) for geometric morphometric analyses.

5.5. Results

5.5.1. Variation in dental formulae

A total of seven distinct dental formulae were detected amongst the 262 individuals (Figure 5.2). Two patterns are present in *C. eos* ($n = 77$). The basal dental formula is symmetric (0,5-5,0) and a single alternative formula (0,5-4,0) was observed in 10 out of 77 individuals. The asymmetric

0,5-4,0 pattern reflects the absence of the first tooth of the major row on the R-side. Two patterns are also observed in *C. neogaeus* (n = 32). The basal formula for this biotype is asymmetric (2,5-4,2) and a single alternative formula (2,4-4,2) was observed in 6 out of 32 individuals. The variable position of the alternative formula is the first tooth of the major row on the L-side. Parental species display dental formulae that differ in terms of the number of teeth on the minor arches: zero for *C. eos* and two for *C. neogaeus*. These results are consistent with previous studies (Eastman 1970, Stasiak 1977, Goddard *et al.* 1989).

A higher disparity of dental formulae is observed in hybrids than in parental species (Figure 5.2). The symmetric formula 1,5-5,1 is expected to represent the basal pattern; it is present in all lineages and 58% of the individuals display this formula (Figure 5.2, Table 5.2). The 1,5-5,1 formula also requires the fewest changes to adopt alternative configurations, differing from other formulae from only one asymmetric or symmetric change. When compared to parental species, the hybrid basal dental formula displays an intermediate number of teeth on the minor arch (1,5-5,1) as reported by Goddard *et al.* (1989) and Binet & Angers (2005).

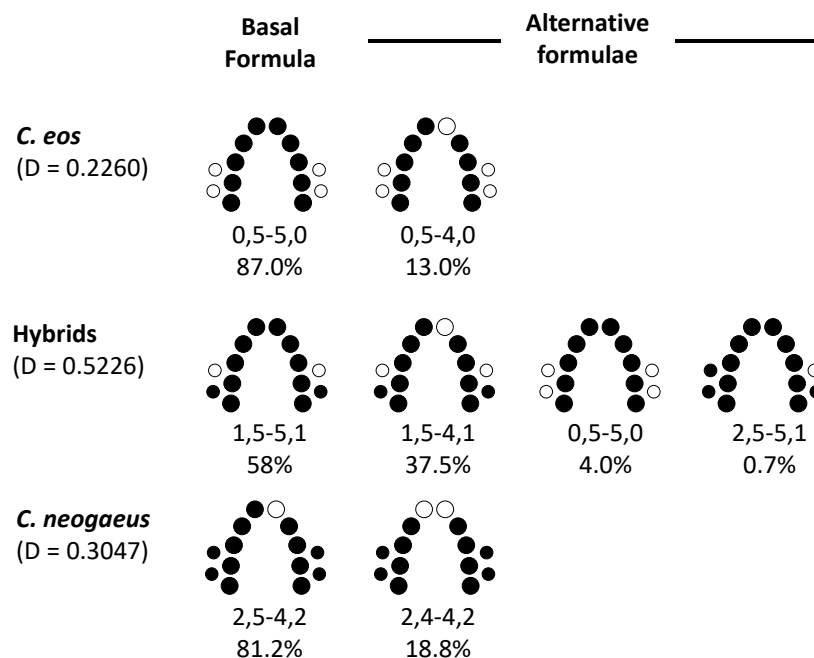


Figure 5.2. Basal and alternative dental formulae in *Chrosomus eos*, *C. neogaeus* and hybrids. Absent teeth in a given formula are indicated by open circle. For each formula, the proportion of individuals from a given biotype is given. The Simpson's diversity index D (Simpson 1949) is provided for each biotype.

Table 5.2. Dental formulae of the different hybrid lineages. For each lineage, the number of individuals per dental formula is given. Diversity refers to the Simpson's diversity index.

Site	Lineage	1,5-5,1	1,5-4,1	0,5-5,0	2,5-5,1	Total	Diversity
AS; NO*	B-01	45	48			93	0.4995
AS-13	B-02	6	4			10	0.4800
RI-2	A-11	2	4			6	0.4444
RI-2	B-03	3				3	0
SF-4	B-06	6				6	0
SF-12	A-18	3	1			4	0.3750
SF-13	A-06	18			1	19	0.0997
SF-13	A-07	5		6		11	0.4959

* AS-2, 3, 8, and 13; NO-1, 5, 7, and 10

The number of dental formulae, as well as the relative abundance of each formula are higher in hybrids than in parental species; this is reflected in the higher Simpson's diversity index in hybrids ($D = 0.5226$) than in *C. eos* ($D = 0.2260$) and *C. neogaeus* ($D = 0.3047$). Two lineages, B-03 and B-06, displayed only the basal formula but we cannot rule out the possibility of alternative formulae for these lineages due to the low sample size (3 and 6 individuals, respectively; Table 5.1). Each of the other lineages presents two distinct dental patterns and display diversity ranging between 0.375 and 0.4995 (except A-06 $D = 0.0997$). Two alternative formulae involving variation of the minor row were found: six out of 11 individuals of lineage A-07 display the 0,5-5,0 formula observed in paternal species *C. eos* and a rarer formula, 2,5-5,1, found in a single individual out of 19 in lineage A-06.

The most frequent alternative dental formula is asymmetric (1,5-4,1) lacking one tooth on the R-side of the arch as observed on the major row of *C. eos*. This pattern is present in four distinct lineages (B-01, B-02, A-11 and A-18) and is represented by 37.5% of the individuals. However, when considering exclusively lineages where this pattern is present, 50.44% of the individuals shared this phenotype indicating the high prevalence of this alternative dental formula.

Between 75 to 100% of the *C. eos* individuals share the 0,5-5,0 dental formula (Figure 5.3); it is not correlated to site ($R^2_a = 0.0205$; $P = 0.276$). The number of *C. eos* individuals with

an alternative formula is not significantly different from the one reported by Eastman and Underhill (1973) (11 out of 137 individuals; $\chi^2=1.3691$; 1 df; $P = 0.242$). These results indicate a similar proportion of alternative pattern in *C. eos* from different locations.

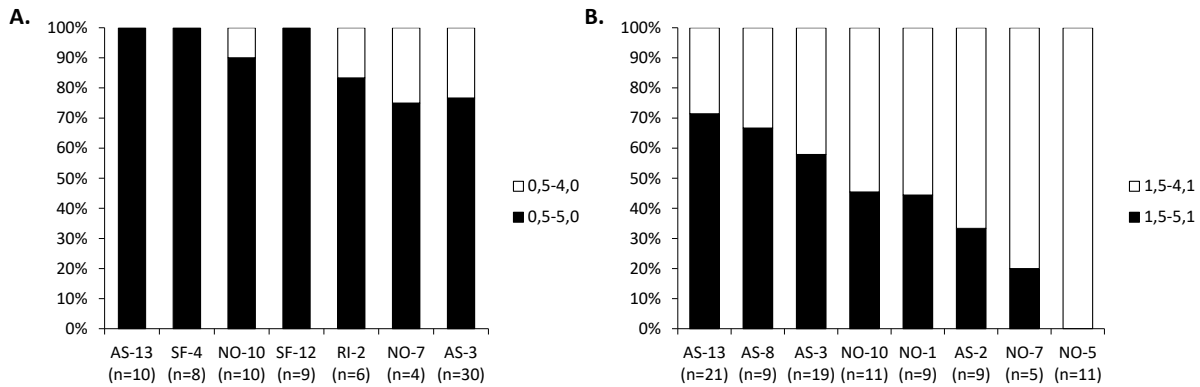


Figure 5.3. Variation in dental formulae in *C. eos* and hybrid lineage B-01 among sites. The relative abundance of basal and alternative dental formulae detected in A. *C. eos* and B. hybrids from each site. Numbers in parentheses indicate sample sizes.

On the other hand, the abundance of individuals harboring the 1,5-5,1 basal dental formula among clones of the lineage B-01 ranges from zero (N-05) to 70% (AS-13) (Figure 5.3). Contrasting with the parental species *C. eos*, the abundance of the different dental formulae is correlated to sampled sites in B-01 hybrids ($R^2_a = 0.1395$; $P = 0.004$). This result indicates a non-random variation in abundance of individuals harboring the 1,5-5,1 formula among lakes.

5.5.2. Variation in shape of the pharyngeal arches

Procrustes ANOVA analyses confirmed that inter-individual variation was higher than within-individual variation associated to landmark positioning (L-side: $R^2 = 0.8697$, $P = 0.001$; R-side: $R^2 = 0.8560$, $P = 0.001$). Shape variation is not significantly different between landmark digitising replicates (L-side: $P = 0.600$; R-side: $P = 0.633$). Differences among biotypes and individuals as well as between L-R sides are therefore expected to be higher than the proportion of variation due to error in landmark positioning.

Redundancy analysis revealed that the shape of pharyngeal arch is significantly different among the two parental species and hybrids for the left and right sides (Figure 5.4). However,

hybrids are more similar to *C. eos* than to *C. neogaeus* (Table 5.3). Trajectory analyses confirmed that the magnitude of phenotypic differences between hybrids and *C. eos* is significantly lower than those between hybrids and *C. neogaeus* ($P < 0.001$ for both sides).

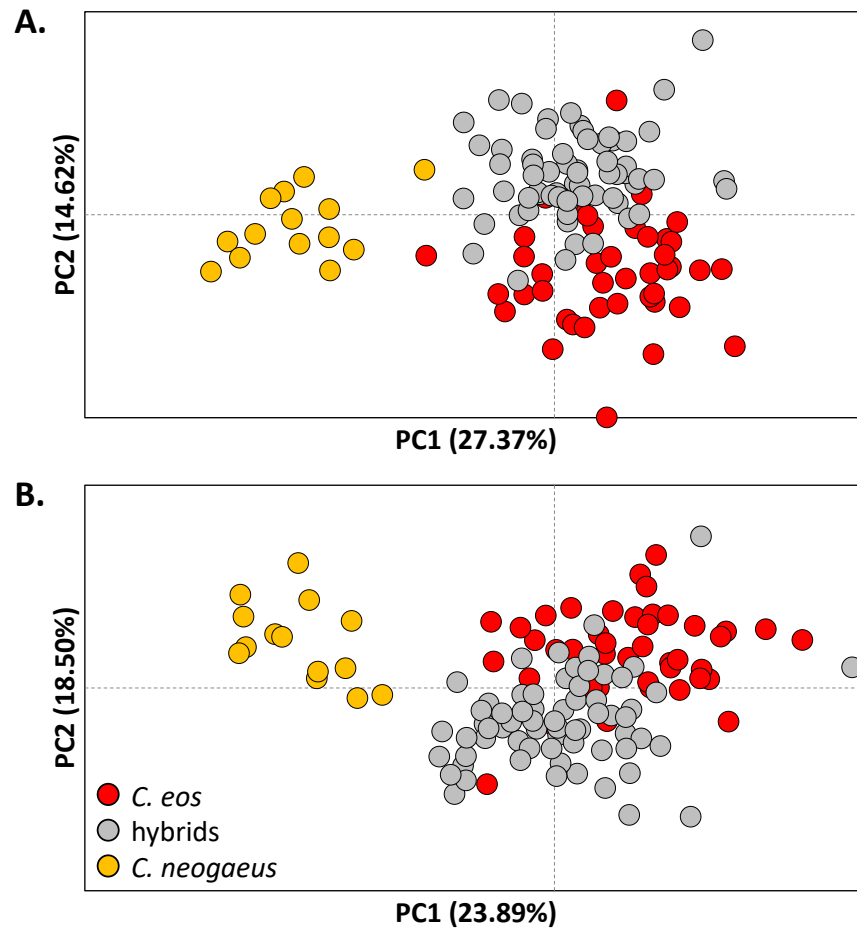


Figure 5.4. Disparity on shape of pharyngeal arches among the parental species and hybrids. Principal component analysis scatter plot for (A) the left side and (B) the right side for *C. eos* (red), hybrids (grey) and *C. neogaeus* (orange).

Table 5.3. Statistical assessment of shape differences among biotypes for the left and right sides of pharyngeal arch.

	Pairwise comparison	R²_a	P_{Shape}	P_{Size}	P_θ
Left	<i>C. eos</i> vs hybrids	0.1291	< 0.001	a	a
	<i>C. eos</i> vs <i>C. neogaeus</i>	0.3095	< 0.001	b	b
	<i>C. neogaeus</i> vs hybrids	0.2631	< 0.001	b	b
Right	<i>C. eos</i> vs hybrids	0.1062	< 0.001	a	a
	<i>C. eos</i> vs <i>C. neogaeus</i>	0.3453	< 0.001	b	b
	<i>C. neogaeus</i> vs hybrids	0.2559	< 0.001	b	b

Observed significance levels for shape differences (P_{shape}) and pairwise comparison of trajectory size (P_{size}) and angles (P_{θ}) were generated from 999 random permutations. Pairwise comparisons sharing the same letter are not significantly different ($P > 0.151$).

In contrast to the relative abundance of *C. eos* dental formulae that were randomly distributed among sites, the shape of *C. eos* pharyngeal arch was significantly different among sites for the L-side ($R^2_a = 0.1274$; $P = 0.001$) and R-side ($R^2_a = 0.1398$; $P = 0.001$). However, shape variation is not correlated to dental formulae for both L-side ($R^2_a = -0.0031$; $P = 0.591$) and R-side ($R^2_a = 0.0053$; $P = 0.261$).

For the pharyngeal arches of hybrids, partition of shape variation revealed significant effect of site for both the L-side ($R^2_a = 0.0951$; $P = 0.001$) and R-side ($R^2_a = 0.1132$; $P = 0.001$). Because relative abundance of dental formulae was detected to be not randomly distributed among sites, a confounding effect may exist between both factors. Partition of shape variation was therefore performed by controlling one or the other factor to take into account confounding effects. Pure site effect remained significant (L-side: $R^2_a = 0.0993$; $P = 0.001$; R-side: $R^2_a = 0.1039$; $P = 0.001$) indicating that shape of pharyngeal arches was still significantly different among sites, despite shape differences induced by dental formulae. Shape variation was also correlated to individual dental formulae for the R-side ($R^2_a = 0.0142$; $P = 0.029$) but not for the L-side ($R^2_a = 0.0086$; $P = 0.092$). When controlling for the sites, no pure dental formulae effect was detected for the shape of the R-side ($R^2_a = 0.0049$; $P = 0.191$). The absence of pure dental formulae effect confirms the confounding effect with site and suggests therefore a co-variation of shape and dental formulae according to environmental conditions.

The difference in dental formulae effect upon shape variation of each side of the arch suggests a possible L-R asymmetry in hybrids. Because hybrids displayed distinct dental formulae among sites, DA and FA were assessed for hybrids by sorting individuals according to their dental formulae (1,5-5,1 vs 1,5-4,1) in order to test whether dental formulae may result from an environmental signal that is not site-specific. Because both parental species presented more stable dental formulae compared to hybrids (Figure 5.2), matching symmetry analyses were also performed on parental species as a control to assess whether asymmetry in shape of pharyngeal arches is caused by the absence of a tooth in the major row. DA and FA analyses were thus performed for parental individuals displaying symmetric (35 *C. eos* with 0,5-5,0 formula) and asymmetric (14 *C. neogaeus* with 2,5-4,2 formula) dental formulae (Table 5.4).

No FA was detected for *C. eos* ($P = 0.604$) and *C. neogaeus* ($P = 0.099$). No effect of side was detected in *C. neogaeus* ($P = 0.654$) in spite of asymmetric dental formulae. An effect of the side (L or R) was detected in *C. eos* ($P = 0.009$) but this effect did not remain significant when controlling for sites ($P = 0.136$). In hybrids, FA ($P = 0.368$) and DA ($P = 0.241$) are not significant for individuals with the symmetric 1,5-5,1 dental formula. Lack of L-R asymmetry for the shape of individuals harboring the basal formula suggests a high developmental stability in these hybrids.

On the other hand, FA ($P = 0.010$) is significant for individuals with the asymmetric 1,5-4,1 dental formula, indicating they exhibit a higher developmental instability than hybrids with the symmetric dental formula. Interestingly, in contrast to the shape differences observed among sites, individual side deviation is not significantly different among localities ($R^2_a = 0.0036$; $P = 0.441$) and confirms that FA is not associated with environmental conditions of sites. In addition, this lack of correlation indicates that site-specific shape differences observed in pharyngeal arches is not involved in L-R asymmetry. In addition to FA, DA is also highly significant ($P = 0.001$) and remains significant when controlling for sites ($R^2_a = 0.0332$, $P = 0.003$). This indicates that hybrids with asymmetric dental formulae also display a marked L-R difference in pharyngeal arch shape regardless of their site of origin.

Table 5.4. Analysis of shape asymmetry. Results of Procrustes ANOVA for parental species and hybrids displaying symmetric or asymmetric dental formula.

	Source	df	SS	MS	F	Pr (>F)
<i>C. eos</i> 0,5-5,0	Individual	34	0.4094	0.0120	1.3974	0.001
	Side	1	0.0082	0.0082	2.5882	0.009
	Individual × Side	34	0.0922	0.0027	0.9621	0.604
	Measurement error	70	0.1029	0.0014		
<i>C. neogaeus</i> 2,5-4,2	Individual	13	0.1024	0.0079	3.3928	0.184
	Side	1	0.0019	0.0019	0.8012	0.654
	Individual × Side	13	0.0302	0.0023	2.8006	0.099
	Measurement error	28	0.0232	0.0008		
Hybrids 1,5-5,1	Individual	30	0.2102	0.0070	1.0242	0.355
	Side	1	0.0040	0.0040	1.1195	0.241
	Individual × Side	30	0.0962	0.0032	1.0221	0.368
	Measurement error	62	0.0972	0.0016		
Hybrids 1,5-4,1	Individual	34	0.2789	0.0082	0.9046	0.842
	Side	1	0.0144	0.0144	3.0820	0.001
	Individual × Side	34	0.1337	0.0039	1.1968	0.010
	Measurement error	70	0.0946	0.0014		

df, degrees of freedom; SS, sums-of-squares; MS, mean square; F, F-statistic

L-R difference was assessed for each landmark (including both landmarks and semi-landmarks) individually by controlling for putative site effect. Only three landmarks (positioned on the anterior margin of the arch) displayed significant asymmetry ($P < 0.043$) with R^2_a that varied between 0.0312 and 0.0638 for the individuals bearing the 1,5-5,1 formula. On the other hand, analyses performed on individuals with the 1,5-4,1 formula revealed 18 landmarks with a significant L-R asymmetry ($P < 0.043$) with R^2_a that varied between 0.0228 and 0.0856 (Figure 5.5). Eleven of these landmarks coincide with the inner margin of the arch where the teeth are attached and where the tooth is lacking on the R-side. The seven remaining landmarks are located on the posterior margin of the arches and indicate a bias toward a thinner structure on the R-side.

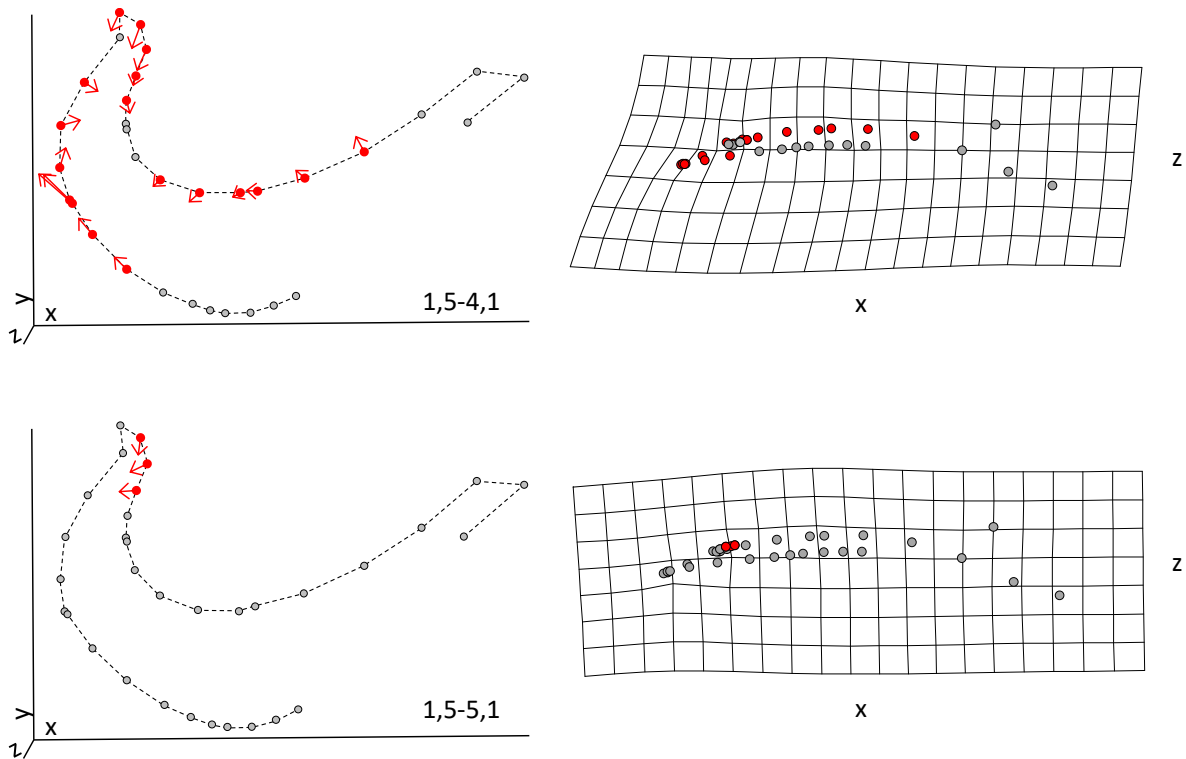


Figure 5.5. Left-right asymmetry in shape for hybrids. Left panel: landmarks with significant deviation are represented by red circles and a vector (magnified 5X). Right panel: deformation grid of the X and Z axes.

5.6. Discussion

Analysis of eight clonal lineages of the hybrid fish *Chrosomus eos-neogaeus* revealed a higher number of dental formulae as well as a higher abundance of each formula in hybrids than in their sexual parental species, *C. eos* and *C. neogaeus*. The same basal symmetric dental formula (1,5-5,1) was detected regardless of the hybrid lineage. The most frequent alternative dental formulae was asymmetric (1,5-4,1) being present in several distinct lineages (B-01, B-02, A-11 and A-18). These dental formulae have been previously reported by Goddard *et al.* (1989) and Binet & Angers (2005). While few studies have been undertaken to examine the intraspecific variation that may occur in dental formula (*e.g.* Eastman & Underhill 1973) such variation appears unusual, especially in the absence of genetic difference among individuals.

5.6.1. Plasticity of the pharyngeal jaw apparatus

The correlation between the different dental formulae of hybrids from the lineage B-01 and sampled sites indicates a non-random variation in the abundance of individuals displaying the symmetric and asymmetric dental formula among lakes. This contrasts with the similar proportion of alternative patterns in the parental species *C. eos* among sites indicative of random changes. This non-random variation ruled out that the asymmetric dental formula of clonal hybrids is only the result of ontogenetic accidents as proposed in other species (*e.g.* Eastman & Underhill 1973).

A given clonal lineage is not devoid of genetic variation as mutations occur constantly. However, individuals of a given site often harbored the very same multilocus genotype, differing from the one of individuals from other sites (Angers & Schlosser 2007, Vergilino, Leung & Angers 2016). Because all nucleotides are linked one to each other in absence of recombination, ancestral polymorphism shared by these sites is now erased (complete lineage sorting). In addition, the same phenotypic variants have been observed in lineages resulting of distinct hybridization events. It is thus extremely unlikely that genetic polymorphism be responsible for the morphological variation observed among populations. Therefore, this relationship between the relative abundance of each dental formulae and the environment is indicative of a norm of reaction triggered by environmental influence (*e.g.* site dependence).

The shape analysis of the arches also revealed that environmental conditions of each lake influence the shape of both hybrids with symmetric or asymmetric dental formula as well as *C. eos*. This suggests that parental species and hybrids display similar level of developmental stability (canalisation) during their respective development.

5.6.2. Asymmetry in the shape of pharyngeal arches

Dental formulae and arch shape are strongly correlated since DA was restricted to hybrids with asymmetric dental formula. Both asymmetry in shape and dental formulae occurred on the R-side. These results are consistent with previous study on zebrafish (Albertson & Yelick 2005) for which a R-sided bias of asymmetric and aberrant pharyngeal arch development is observed in *ace/fgf8* mutants. We can however exclude mechanical deformations of the R-side as a consequence of the absence of one tooth because no such DA was detected in *C. neogaeus* for

which the basal formula is asymmetric (2,5-4,2). Systematic differences between L-R sides do not appear to be the result of developmental instability but a side-specific response to environmental conditions (Klingenberg 2003). The L-R asymmetry detected on all individuals with the asymmetric formula 1,5-4,1 suggests an altered developmental pathway affecting both shape and dental formulae in these hybrids, regardless of the site of origin. Consistent discrete phenotypic changes in response to a given environmental signal are referred as phenotypic plasticity, more specifically polyphenism (Nijhout 2003). Such process is triggered by environmental signal and incorporated in the developmental pathway *via* epigenetic processes (Weaver *et al.* 2004, Blewitt *et al.* 2006, Kucharski *et al.* 2008, Angers *et al.* 2010).

A portion of L-R asymmetry results from stochastic errors (FA) during development indicating a higher developmental instability in hybrids with an asymmetric dental formula. FA is a good indicator of developmental instability (Parsons 1992, Klingenberg 2003). However, it cannot be associated to a genomic stress alone as all hybrids analysed for shape belong to the same lineage. In addition, FA is not significant in both parental species and hybrids with symmetric dental formula, indicating that the hybrid genome itself did not result in a higher instability during the development of pharyngeal arches. The hypothesis of genomic incompatibilities could then be ruled out at least for the dental formula and pharyngeal arch shape in clonal *C. eos-neogaeus* hybrids. FA is not different among sites. This indicated that developmental instability due to site-specific environmental conditions does not explain the variation observed in the different relative proportions of dental formulae among lakes. Therefore, FA detected in hybrids with an asymmetric dental formula likely results from a stressful development associated with the alternative pathway. This system provides an empirical support demonstrating the correlation between phenotypic plasticity and developmental instability. Developmental instability is often recognised as a consequence or more specifically a cost of phenotypic plasticity (DeWitt *et al.* 1998, Murren *et al.* 2015). However, the lack of studies on the functional performance of asymmetric shape and dental formulae do not allow assessment of fitness variation, if any.

5.6.3. A threshold character

The results of this study suggest a strong influence of the *C. eos* genome on the development of the whole pharyngeal arch in hybrids. With respect to the major tooth row, hybrids and *C. eos* display similar basal formula (n,5-5,n) as well as alternative formula (n,5-4,n). In addition, one lineage displays an alternative dental formula identical to that of *C. eos* (0,5-5,0). Tooth shape is more similar between *C. eos* and hybrids. Teeth are elongated and digitiform in both *C. eos* and hybrids, whereas they are more conical with much larger bases and a shorter length relative to the arch in *C. neogaeus* (Figure 5.1.A).

The overall shape of pharyngeal arches also supports this trend. For instance, the lateral surface of the pharyngeal bones of *C. neogaeus* displayed a punctured texture characterised by small lacunae distributed irregularly, whereas *C. eos* and hybrids display large reticulated cavities (Figure 5.1.B). However, reticulations are thinner and more abundant in hybrids than in *C. eos*. Finally, the analyses on arch shape revealed that hybrids are more similar to *C. eos* than to *C. neogaeus*. Trajectory analyses confirm that the magnitude of phenotypic differences between hybrids and *C. eos* is significantly lower than those between hybrids and *C. neogaeus*.

The lack of environmental influence on dental formulae variation in *C. eos* suggests a random process. In addition, the proportion of *C. eos* individuals with an alternative formula did not differ from the one reported by Eastman & Underhill (1973) from a distinct geographical region. However, the same alternative dental formulae found on the major row in *C. eos* and hybrids suggests a shared alternative developmental pathway. Interestingly, *C. eos* individuals with an asymmetric dental formulae displayed a significant FA ($P = 0.032$) in spite of a low sample size ($n = 7$) indicating a higher instability during the development of the arch for the individuals displaying an asymmetric dental formulae. However, we do not detect DA ($P = 0.209$) in these individuals,

Altogether, these results suggest that discrete characters observed in pharyngeal arches could be a threshold character (Figure 5.6) for which genetic and environmental conditions determine a threshold value above which an alternative developmental pathway will be initiated (Roff 1996). Genetic changes in thresholds are known to influence reaction norms (Whitman & Agrawal 2009). The high variation in dental formulae observed in hybrids and contrasting with

the relative stability across species suggests this threshold value could have been influenced by hybridization. Hybrids would be therefore more sensitive to environmental signals than parental species. This alternative developmental pathway results in consistent asymmetric dental formula and arch shape as well as a higher developmental instability.

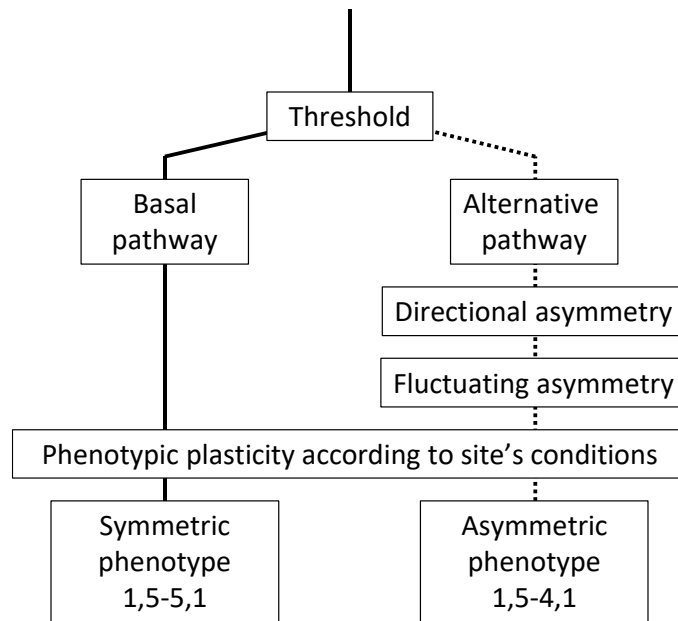


Figure 5.6. Schematic representation of the hypothetical processes occurring during the development of the pharyngeal arches in clonal hybrids. The alternative pathway is induced when individuals reach a given threshold, resulting in consistent L-R asymmetry in shape and dental formula as well as developmental instability.

5.7. Conclusion

The results of the present study suggest that variation in dental formulae of the clonal fish *Chrosomus eos-neogaeus* is a consequence of an alternative pathway induced by environmental signal(s) during the development of pharyngeal arches. Variation in dental formulae as well as pharyngeal arch shape of these hybrids would therefore represent a polyphenism, a particular case of phenotypic plasticity, rather than the result of developmental instability. The relative stability of dental formulae reported in multiple species including *C. eos* (Eastman & Underhill 1973) suggests a higher sensitivity for the environmental signal triggering this alternative development pathway in the hybrids. The FA associated to this pathway highlights the correlation between phenotypic plasticity and development instability.

Chapitre 6 :

HANDICAP DÉMOGRAPHIQUE

The ecological success of sperm-dependent parthenogenesis: a demographic handicap hypothesis

Christelle Leung et Bernard Angers

(Ce chapitre sera soumis sous le format *Brief communications*)

6.1. Résumé et contributions

Il est attendu que les organismes sexués présentent une croissance démographique plus lente que les organismes asexués en raison du coût induit par la production des individus mâles. Nous proposons une hypothèse stipulant que les gynogènes doivent également se prévaloir d'un handicap démographique afin de limiter leur prolifération, et ainsi éviter de surpasser démographiquement la population sexuée hôte et causer leur propre extinction. La stérilité des individus associés à la fusion du pronucléus mâle au cours de la fécondation peut représenter un mécanisme expliquant ce handicap démographique.

Les idées à la base de cet article ont été conçues par CL et BA. Les simulations et l'analyse des données ont été effectuées par CL. CL a rédigé le manuscrit sous la supervision de BA.

6.2. Abstract

Sexual organisms are expected to display a lower population growth than their asexual counterpart due to the cost of producing males. Here, we propose the demographic handicap hypothesis that sperm-dependent parthenogenetic organisms may be afflicted by the same

demographic limitations to circumvent overcrowding and coexist with their sexual host without risking their own extinction. The sterility of individuals associated with the fusion of male pronucleus during the fertilization may represent an explanatory mechanism of such demographic handicap.

Key words: Asexual population, demographic cost, gynogenesis, paternal leakage, polyploidy, sperm dependence.

6.3. Introduction

Gynogenesis, also known as pseudogamy or sperm-dependent parthenogenesis, is an asexual mode of reproduction where the sperm of a related species is required to trigger the development of an unreduced egg (Hubbs & Hubbs 1932, Beukeboom & Vrijenhoek 1998). The stable persistence of gynogenetic systems is however a puzzling phenomenon given the twofold cost of males (Williams 1975, Maynard Smith 1978). Indeed, for the same fecundity rate, asexual individuals have a demographic advantage over sexual ones that must invest half of their progeny in males. This may result in a rapid extinction of their sexual host and ultimately, to their own extinction in absence of available sperm-donors.

This paradoxical coexistence is still an intriguing phenomenon for biologists, as evidenced by the large number of proposed hypotheses. For instance, several models were based on discrimination against asexual females to ensure the reproductive success of sexual females. However, sexual males behaviour could not fully prevent extinction as mating with heterospecific females may increase their attractiveness and, thus, their reproductive success (Heubel *et al.* 2009). Hypotheses involving disadvantages of asexual forms to prevent their proliferation also display a weakness as gynogens are expected to be more performant than their sexual parents because of their hybrid origin and perpetual F1 heterosis (Vrijenhoek 1998). Coexistence can be expected if gynogens and their sexual host use different ecological niches (Schlupp 2005). However, because of the dependence on sperm, both sexual and asexual females will always compete for the same limited resource, the males. Finally, theoretical works have shown that if coexistence is not possible at a local scale, but it can occur in a

metapopulation structure (Kokko *et al.* 2008) although no empirical evidence for this hypothesis has been reported yet.

In order to maintain the stable coexistence with the related sexual host, we propose that gynogens have to cope with the same demographic handicap than their sexual counterparts. Previous studies showed that gynogens often produce as many eggs as their related sexual species (*e.g.* Schlupp *et al.* 2010). Therefore, we postulate that half of gynogens' offspring should not contribute to the next generation, as for sexual species. To test this hypothesis, we used a simulation-based study to compare the persistence of a gynogenetic system under three scenarios: (i) no handicap present in asexual females, (ii) a fecundity handicap present in asexual females that display a reduced fecundity rate (twice less) compare to sexual females, and (iii) and a sterility handicap where asexual females display the same fecundity rate than sexual females, but half of asexual's offspring are sterile. Finally, mechanisms involving imperfect gynogenesis are discussed to provide an explanation of how such situation can occur.

6.4. Results and Discussion

As predicted by the theory, a total absence of demographic handicap on asexual reproductive form resulted in their exponential growth and their invasion to the detriment of sexual form. As a consequence, such a gynogenetic system is not a sustainable biological scenario because of the eventual elimination of males (Figure 6.1.A). Asexual females displaying a fecundity rate twice lower than that of sexual females resulted in a higher proportion of sexual populations survival, but much lower proportion of the asexual system persisted (100% vs 34%, respectively; Figure 6.1.B). Therefore, a lower fecundity alone is not sufficient to explain a stable coexistence of gynogenetic systems as producing an equal number of females by both forms is only beneficial for sexual organisms. Moreover, changing the proportion of sterile asexual individuals below or above 50% resulted in asexual populations decay because of extinction of sexual populations or their proliferation, respectively (Supplementary Figure 6.S1).

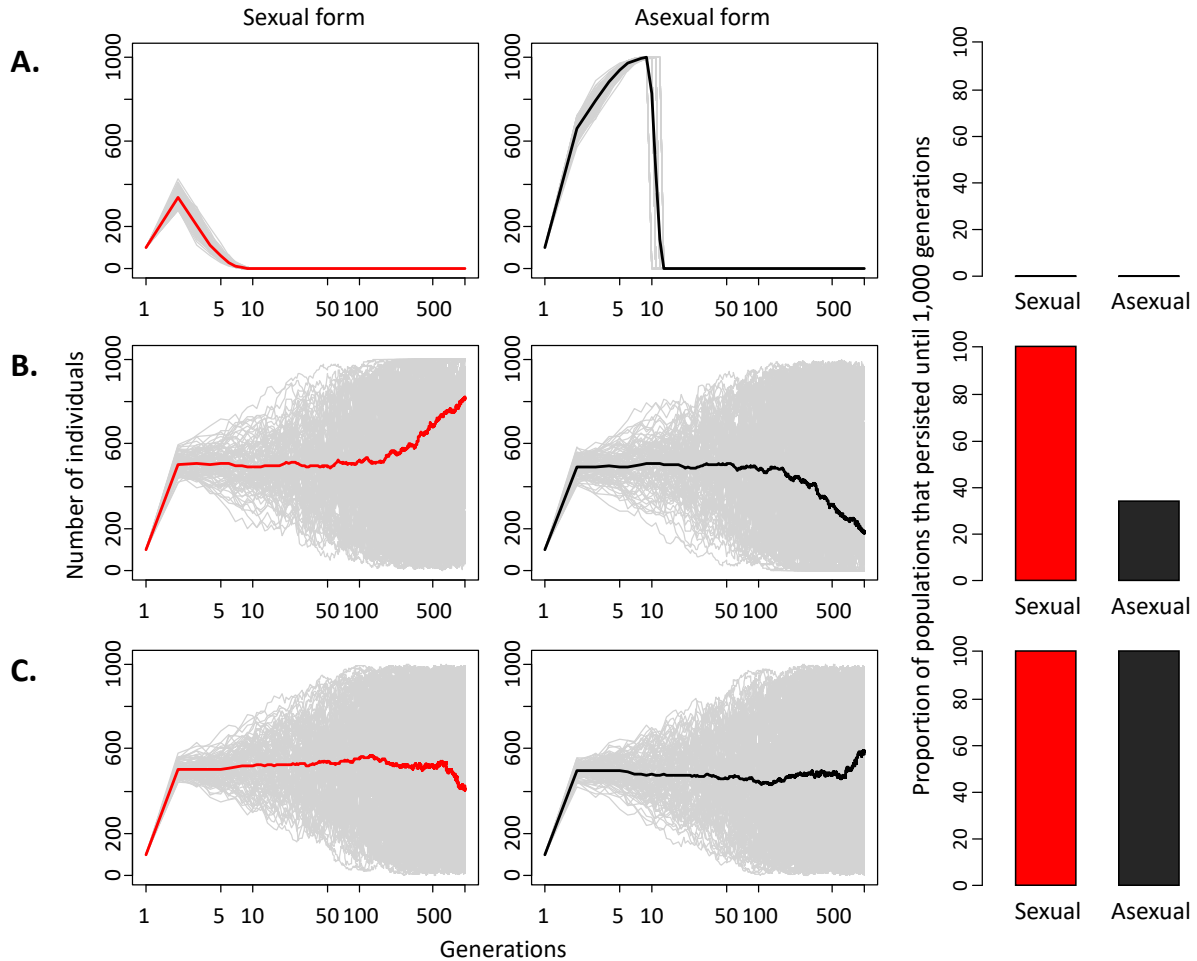


Figure 6.1. Simulations of population's growth in coexisting sexual and asexual organisms under three different scenarios. Only the reproductive conditions of asexual females varied among scenarios: (A) No handicap: both sexual and asexual females displayed the same fecundity rate; (B) Fecundity handicap: asexual females displayed a fecundity rate twice lower than sexual females; (C) Sterility handicap: both sexual and asexual females displayed the same fecundity rate, but half of asexual offspring were sterile. Grey lines represent the dynamism of each simulated population; red and black lines represent the mean of sexual and asexual individuals respectively at each generation.

Interestingly, when asexual females displayed the same fecundity rate than sexual females, but half of asexual offspring were sterile, a high proportion of asexual systems persisted (100%; Figure 6.1.C). The proportion of asexual individuals at the beginning of the simulations did not influence the viability of the system, and the initial proportion of sexual vs asexual

individuals was maintained through generations (Supplementary Figure 6.S2). Although sterile individuals did not participate to the production of offspring at the next generation, their presence was essential to control for the proliferation of sexual individuals within the population. Indeed, the finite size of the population caused a random variation in frequencies of both sexual and asexual forms from one generation to the next, and especially since the population size is small (Charlesworth 2009). Therefore, the presence of sterile asexual individuals helped to limit the number of sexual individuals within the population whereas their absence would favour the sexual form because of their higher proportion during reproduction (Figure 6.1.B). A stable coexistence of both reproductive forms was therefore possible and only stochasticity would explain the disappearance of a gynogenetic system.

We postulate that the sterility of individuals may be caused by imperfect gynogenetic mechanisms leading to paternal leakage. Indeed, the fusion of male and unreduced female pronuclei sometimes occur at the fertilization and results in triploid individuals (Itono *et al.* 2007) frequently associated to sterility in fishes (Benfey 1999). Sterility resulting from paternal leakage has already been reported in gynogenetic systems. For example, paternal leakage was observed in laboratory experiments involving the Amazon molly *Poecilia formosa* and triploid individuals turned out to be sterile (Nanda *et al.* 1995). Artificial hybrids between *P. mexicana limantouri* and *P. latipinna*, the putative species that led to the formation of the gynogenetic *P. formosa*, produced unreduced diploid oocytes, but all those eggs led to viable and sterile triploid offspring after fertilization (Lampert *et al.* 2007). Choleva *et al.* (2012) performed similar experiments on the spined loach hybrid *Cobitis elongatoides-taenia*. As observed in *P. formosa*, most of the diploid hybrid F1 females produced unreduced clonal eggs and paternal leakage were observed in 100% of the cases. However, one F1 hybrid female produced a mixed clutch of di- and triploid offspring at a rate of 50%. In *Chrosomus eos-neogaeus* gynogens, paternal leakage occurs with a rate of 50% (Goddard & Dawley 1990), triploid females do not reproduce clonally while male are known to be sterile (Goddard & Schultz 1993). In addition, hybrid *C. eos-neogaeus* in natural populations do not differ from a 1:1 ratio of di- and triploid individuals, as observed in two independent sampling: (i) 120 diploids out of 366 hybrids from 41 lineages and 56 sites ($\chi^2= 3.085$; 1 df; $P = 0.079$; Vergilino, Leung & Angers 2016) or (ii) 52 diploids

out of 119 hybrids from a single lineage in the Laurentians region ($\chi^2 = 1.891$; 1 df; $P = 0.169$; Massicotte *et al.* 2011).

Gynogenetic systems such as *Chrosomus eos-neogaeus* fit the demographic handicap hypothesis perfectly. Half of the gynogens' progeny are triploid individuals that do not directly contribute to the reproductive success of the lineage. However, these extras are essential to the persistence of the lineage by preventing sexual individuals from occupying their niche. In other systems, the situation in natural populations is often more complex and numerous additional biotypes can coexist. For instance, gynogenetic triploid lineages exist in *Poecilia formosa* (Schories *et al.* 2007) and *Cobitis elongatoides-taenia* (Janko *et al.* 2007, Choleva *et al.* 2012) in addition to diploid gynogenetic lineages. However all attempts to synthesize fertile triploid clones as those found in some natural populations seem to have failed in laboratory (Lampert *et al.* 2007, Choleva *et al.* 2012). Altogether, these studies suggest that the majority of females resulting from hybridization events produced eggs that are inclined to paternal leakage, but at different probabilities. The current gynogenetic systems might be the result of selection that only favoured lineages for which paternal leakage occurs at 50%.

In conclusion, the handicap induced by 50% of sterile individuals in gynogens has two consequences that, jointly, mediate the stable coexistence of asexual females with their sexual counterparts. Producing asexual individuals that do not leave offspring, as do sexual males, reduce the twofold demographic advantage of gynogens. Moreover, the presence of individuals, even sterile, prevents the proliferation of sexual individuals. In spite of scarce data concerning the rate of paternal leakage as well as the fate of these individuals, the few examples are consistent with our predictions with half of the progeny that are steriles or cannot reproduce the unreduced genome of their mother, while the exact mechanisms responsible for sterility remain to be elucidated in most gynogenetic complex.

6.5. Methods

A theoretical approach was used to test the demographic handicap hypothesis. Simulations of population growth were performed to assess the persistence through time of both sexual and asexual sperm-dependant populations.

For all simulations, there was no sexual preference and sperm availability was unlimited as long as at least a sexual male was present. To reflect natural conditions, variance was allowed and number of individuals was rounded down to integers. At the beginning of each simulation ($t = 0$), populations started with equal number of sexual and asexual individuals ($N = 100$). There were discrete generations. At each generation, the number of offspring produced by each female followed a Gaussian distribution with mean $\mu = 20$ and variance $\sigma^2 = 2$. For sexual populations, the proportion of females was set at 50% with variance $\sigma^2 = 0.01$, while three scenarios were simulated for asexual populations: (i) no handicap: both sexual and asexual females displayed the same fecundity rate, (ii) a fecundity handicap: asexual females displayed a fecundity rate twice lower than sexual females (iii) a sterility handicap: both sexual and asexual females displayed the same fecundity rate, but half of asexual offspring were sterile with variance $\sigma^2 = 0.01$. Carrying capacity was set at 1,000 individuals and individuals survived proportionally to the number of offspring produced. This proportion was however subject to random fluctuation: the number of sexual or asexual individuals in the next generation was given by the binomial distribution $B(N_t, P)$ where the number of trial was the carrying capacity (N_t) and the probability of success the proportion of sexual or asexual individuals (P). Random sampling continue until either sexual or asexual form was lost ($P = 0$). Simulations ran for 1,000 generations and 100 replicates were performed. For each scenario, the number of populations that persisted until 1,000 generations was counted.

We also carried out these different scenarios by changing the proportion of sterile asexual individuals for 40% and 60% (Supplementary Figure 6.S1) and with different proportion of sexual and asexual individuals at the beginning of each simulation (Supplementary Figure 6.S2).

6.6. Supplementary Figures

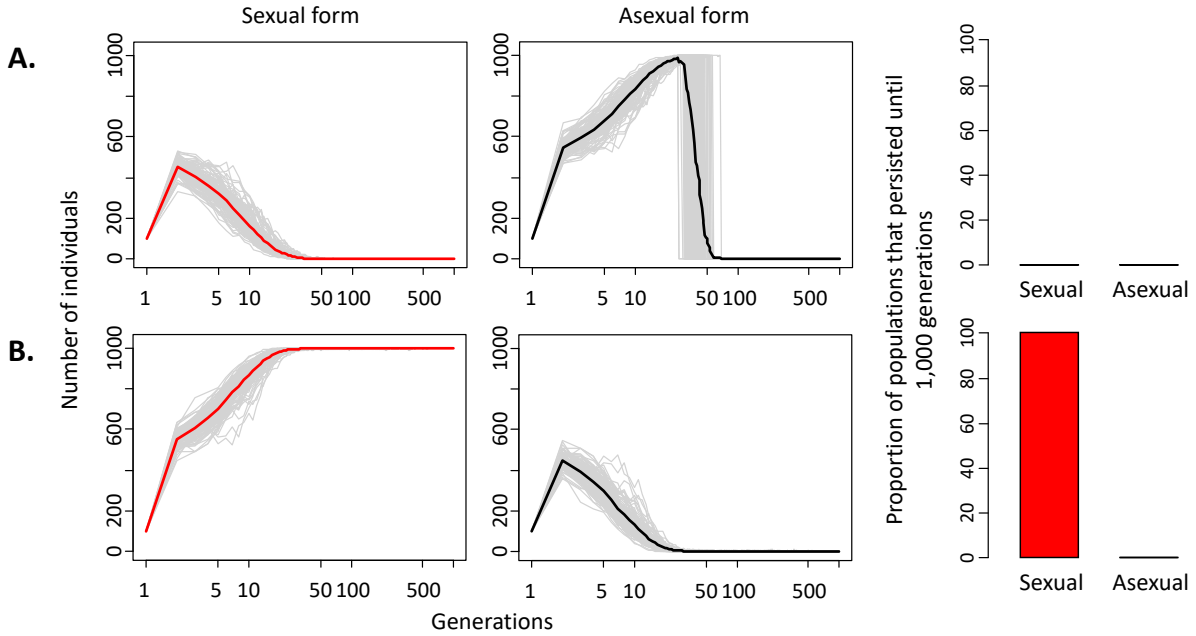


Figure 6.S1. Effect of different proportion of sterile asexual individuals on the evolution and persistence of a gynogenetic system. Scenarios where asexual individuals produced (A.) 40% or (B.) 60% of sterile individuals. Sexual form produced 50% of males and simulations began with 100 sexual and 100 asexual individuals. Grey lines represent the dynamism of each simulated population; red and black lines are the mean of sexual and asexual individuals respectively at each generation.

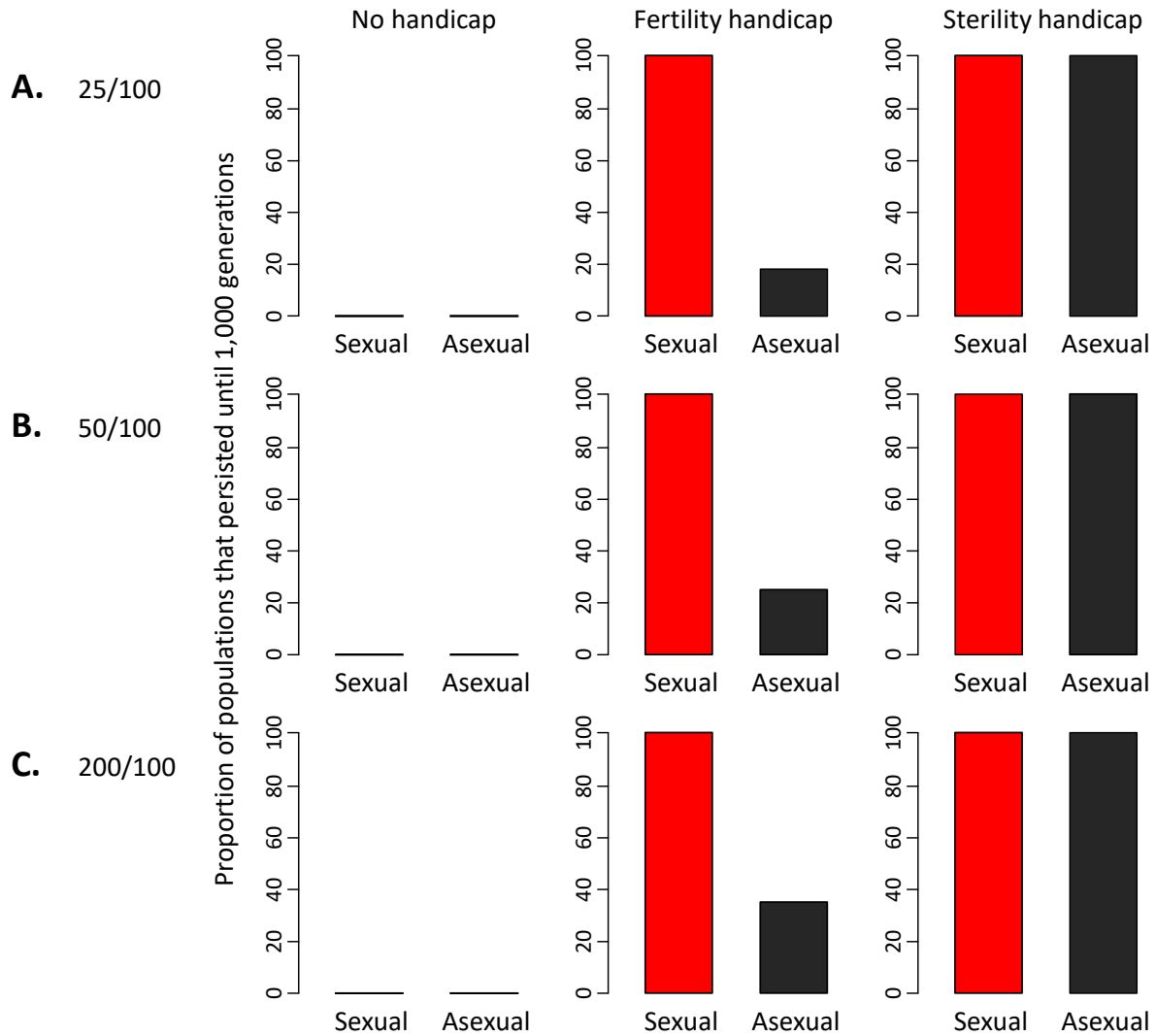


Figure 6.S2. Effect of different initial proportion of asexual individuals on the persistence of sexual (red) and asexual (black) populations. For all scenarios (no handicap, fertility handicap and sterility handicap), initial proportions of asexual/sexual individuals were set as (A) 25/100, (B) 50/100, and (C) 200/100.

Chapitre 7 :

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif général de cette thèse était d'investiguer certains des processus pouvant être responsables du succès écologique des organismes asexués. Les différentes études réalisées ont permis de mettre en évidence les relations entre la variation épigénétique, la variation phénotypique et les stratégies écologiques afin d'expliquer la persistance des hybrides clonaux du complexe *Chrosomus eos-neogaeus*. Spécifiquement, les différentes parties de cette thèse peuvent être subdivisées en deux volets. Dans un premier temps, les modèles de stratégies généraliste et spécialiste ont été testés de manière empirique en (i) décrivant les processus historiques qui expliquent la diversité et la répartition actuelle des lignées clonales (Chapitre 2), (ii) déterminant le dynamisme des processus épigénétiques selon les fluctuations environnementales (Chapitre 3) et (iii) soulignant le rôle de la plasticité phénotypique dans la diversification de niches écologiques (Chapitre 4). Les processus ayant pour conséquence une variabilité phénotypique, telle la variation épigénétique, confèrent aux organismes le potentiel de faire face à l'hétérogénéité spatiale et temporelle de l'environnement et sont par conséquent, déterminants pour leur établissement et leur persistance. D'autre part, la seconde partie des travaux a permis de mettre en évidence les limites concernant la plasticité phénotypique et l'existence d'un handicap démographique nécessaire afin d'expliquer la situation contre-intuitive concernant la coexistence des organismes sexués et asexués gynogènes (Chapitres 5 et 6, respectivement).

7.1. Intérêts écologiques et évolutifs des processus épigénétiques

7.1.1. Sources de variation épigénétique

Les processus épigénétiques, en permettant la modification du patron d'expression des gènes, occupent un rôle central dans la production d'un phénotype (Figure 7.1 et section 1.3.1). Leur intérêt majeur est donc de conférer à un génotype donné le potentiel de générer de la variation

phénotypique. Déterminer les facteurs pouvant influencer la variation épigénétique, et par conséquent la variabilité phénotypique, représente ainsi une étape primordiale dans la compréhension des facteurs responsables du succès écologique des organismes asexués.

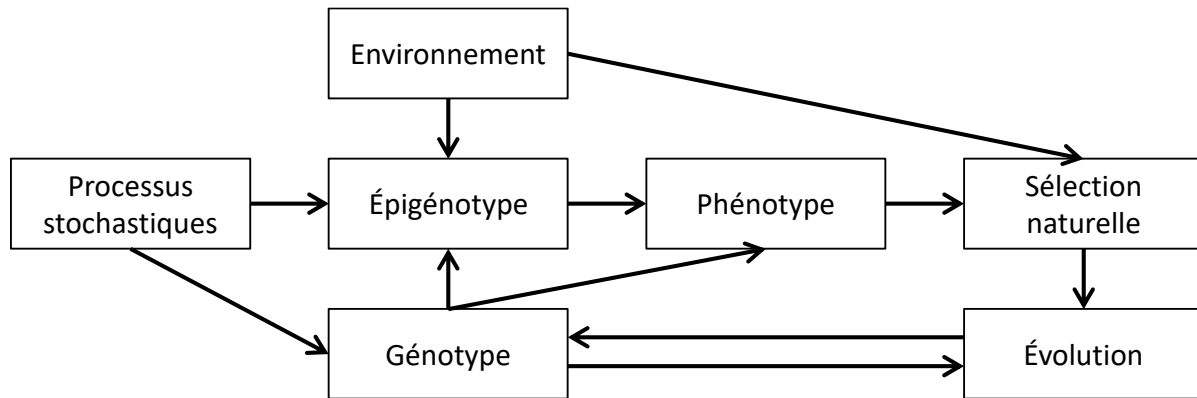


Figure 7.1. Schématisation des facteurs influençant la production d'un phénotype. Les processus épigénétiques occupent un rôle central dans la production d'un phénotype et sont influencés par le génotype, l'environnement et des processus stochastiques (épimutations). Le génotype varie selon les pressions de sélection et les mutations. L'environnement joue un double rôle en influençant à la fois la variation épigénétique et la valeur adaptative des individus. Schéma adapté de Scheiner (1993).

L'utilisation des hybrides clonaux *C. eos-neogaeus* a permis d'estimer l'influence de l'environnement, des processus stochastiques et du génotype sur la variation épigénétique. En somme, la comparaison du profil de méthylation d'individus appartenant à la même lignée, mais dans des conditions environnementales différentes (e.g. milieu naturel vs contrôlé ou différentes localités en milieu naturel) ou dans les mêmes conditions a permis de souligner l'influence de l'environnement et des processus stochastiques, respectivement.

D'autre part, la réponse épigénétique à un environnement donné est fortement influencée par le génotype, comme en témoigne la comparaison de la variation du profil de méthylation de différentes lignées d'hybrides au sein d'un même environnement, c'est-à-dire retrouvées en sympatrie ou élevées en milieux contrôlés. La composition génomique est connue pour influencer l'état épigénétique d'un gène donné (Morgan *et al.* 1999, Lippman & Zamir 2007, Furrow & Feldman 2014) : il peut être strictement déterminé par le génotype (variation

épigénétique obligatoire) ou résulter d'une plus forte probabilité d'apparaître dans un contexte génomique spécifique (variation épigénétique facilitée ; Richards 2006). Finalement, les conditions environnementales, en influençant à la fois la variation épigénétique et la valeur adaptative des individus par les pressions de sélection, jouent un double rôle au niveau du phénotype des individus (Figure 7.1). Ainsi, résultant de la sélection, la réponse épigénétique des génotypes présents dans une localité donnée peut aussi être en fonction des conditions environnementales locales.

7.1.2. Rôle de la variation épigénétique dans les stratégies écologiques

La variation épigénétique observée en milieu naturel révèle que la contribution des différentes sources de variation épigénétique est clairement différente selon la prédictibilité des fluctuations environnementales. En effet, l'analyse des profils de méthylation des différentes lignées a permis de montrer qu'une plus grande proportion de variation épigénétique expliquée par l'environnement est détectée chez une lignée faisant face à des environnements prévisibles. Au contraire, une plus grande stochasticité dans l'implantation des marques épigénétiques est observée chez les lignées faisant face à des environnements imprévisibles. Ces résultats, en accord avec nos prédictions, sont consistants avec les études théoriques stipulant une moins grande plasticité phénotypique chez les organismes vivants dans des environnements imprévisibles (Scheiner & Holt 2012, Scheiner 2013). Ces différentes sources de variation épigénétique peuvent ainsi être associées au potentiel des différents génotypes à être plastiques ou *bet-hedger*, respectivement.

Mis en parallèle avec les modèles de GPG et FNV, ces résultats permettent également d'expliquer la répartition géographique des différentes lignées. Il est attendu d'un génotype généraliste (GPG) de pouvoir faire face à une grande gamme de conditions environnementales grâce à la plasticité phénotypique : c'est le cas de la lignée retrouvée dans la région des Laurentides qui présente une large répartition géographique (Angers & Schlosser 2007, Vergilino, Leung & Angers 2016). La proportion élevée de variation épigénétique expliquée par l'environnement chez cette lignée suggère une réponse consistante de tous les individus face au même signal environnemental et souligne ainsi son potentiel de plasticité phénotypique (Massicotte & Angers 2012, Leung *et al.* 2016).

D'autre part, les lignées retrouvées dans le sud-est du Québec, dans les ruisseaux intermittents, présentent une plus faible variation épigénétique pouvant être expliquée par une influence de l'environnement, ce qui caractérise une moins grande plasticité phénotypique. Cette capacité moindre à pouvoir fournir une réponse consistante face à un signal environnemental donné pourrait expliquer leur répartition géographique plus restreinte et rejoint le modèle FNV. Suite aux événements d'hybridations *in situ*, différents géotypes ont été formés, chacun présentant son propre potentiel à répondre adéquatement à un environnement. Les géotypes présentant une plus grande stochasticité au niveau de l'implantation des marques épigénétiques auraient été sélectionnés dans les ruisseaux intermittents. Ces différentes lignées confinées à une plus petite niche écologique seraient ainsi des géotypes spécialisés dans les environnements imprévisibles.

Le lien direct entre un état épigénétique d'un gène et les conséquences phénotypiques qui en découlent n'a pas été effectué au cours des travaux de cette thèse. La variation phénotypique découlant des différents profils de méthylation mesurés sur les hybrides *C. eos-neogaeus* est ainsi inconnue et il est difficile de conclure quant aux conséquences de ces différents patrons épigénétiques sur la valeur adaptative des individus. Toutefois, connaissant le rôle des processus épigénétiques sur la variation phénotypique, ces différents résultats permettent néanmoins de conclure sur le potentiel des différents géotypes à faire face à un environnement changeant.

7.1.3. Deux stratégies non mutuellement exclusives

La plasticité phénotypique et le *bet-hedging* sont décrits comme des stratégies permettant de faire à face à des conditions environnementales opposées en termes de prévisibilité des changements. Toutefois, en associant ces deux stratégies aux différentes sources de variation épigénétique, nos résultats révèlent qu'elles ne sont pas mutuellement exclusives. Certaines lignées, retrouvées dans des environnements imprévisibles, ont également démontré une certaine influence de l'environnement au niveau de leur profil de méthylation, mais à des degrés différents. Une corrélation négative entre l'efficacité de la plasticité phénotypique et la production stochastique du phénotype a été proposée dans des études théoriques (Muller *et al.* 2013, Scheiner 2014b, a). Compte tenu des différentes sources associées à la variation

épigénétique, les processus épigénétiques représentent un mécanisme pouvant expliquer cette corrélation négative. En effet, ils permettent d’entrevoir la réponse des individus à un changement environnemental donné d’un point de vue quantitatif, avec un gradient au niveau de la concordance entre le changement de leur épigénotype et le signal environnemental perçu. Les relations entre la variation épigénétique, la variation phénotypique et les stratégies écologiques peuvent ainsi être résumées selon la Figure 7.2.

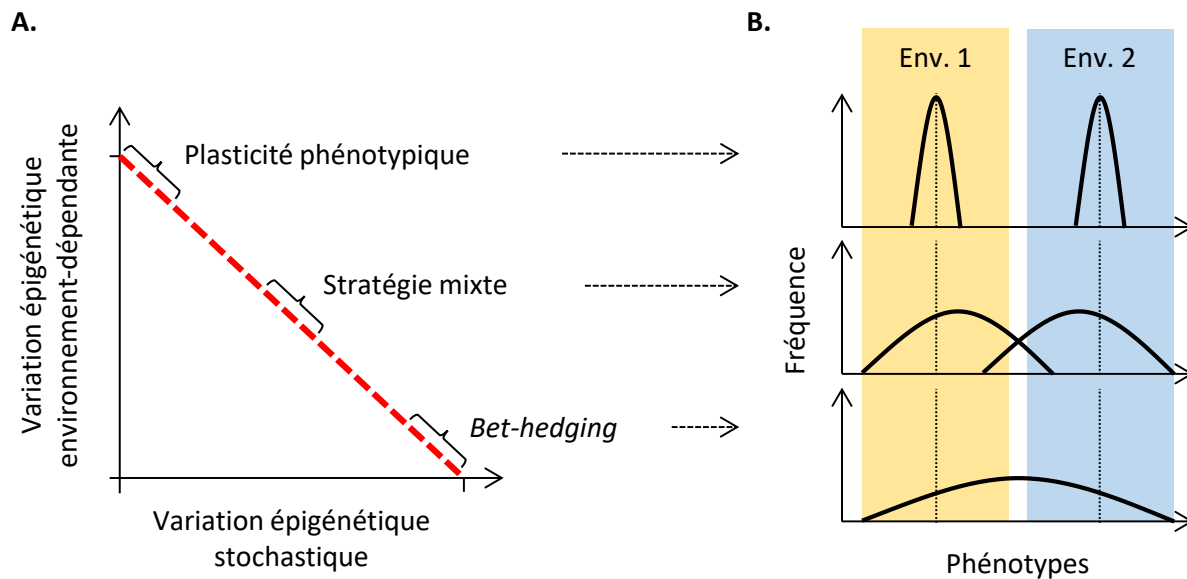


Figure 7.2. Relation entre la variation épigénétique, la variation phénotypique et les stratégies écologiques. (A) Stratégies écologiques selon la proportion relative des deux sources de variation épigénétique. (B) Conséquence phénotypique potentielle d’une population en réponse à un signal environnemental (Env.1 ou Env. 2). Les traits verticaux en pointillé représentent le phénotype optimal dans un environnement donné.

Pour un génotype plastique, tous les individus d’une population asexuée afficheront une réponse homogène à un signal environnemental donné tant au niveau de leur profil épigénétique que de leur phénotype. Dans le cas où la plasticité phénotypique est adaptative, on s’attendra à ce que le phénotype moyen de la population se rapproche du phénotype optimal correspondant à l’environnement et la variation phénotypique au sein de la population soit faible (Plasticité phénotypique – Figure 7.2). À l’opposé, si la majeure proportion de la variation épigénétique totale est issue de processus stochastiques, la réponse phénotypique sera toujours la même,

quelles que soient les conditions environnementales. Ainsi, une grande variation phénotypique sera observée, mais la persistance de la population dépendra de la survie des quelques individus qui afficheront, par hasard, le phénotype le plus proche de l'optimum lors de la sélection (*Bet-hedging* – Figure 7.2).

Finalement, l'environnement et les processus stochastiques peuvent contribuer en même temps, mais selon des proportions variables, à la variation épigénétique totale. Cette stratégie mixte permettrait à la population de présenter un phénotype moyen se rapprochant du phénotype optimal dans un environnement donné, mais avec une certaine variation stochastique autour de cet optimal (Stratégie mixte – Figure 7.2). Une telle stratégie mixte peut représenter un compromis entre les deux stratégies dites « pures » et serait pertinente lorsque la prévisibilité des conditions environnementales peut, elle aussi, être variable. Ainsi, la valeur adaptative de la population pourrait être plus élevée que dans un cas de *bet-hedging* pur lorsque les changements environnementaux sont normalement imprévisibles, mais temporairement prévisibles, ou encore que dans un cas de plasticité phénotypique pure lorsque les changements environnementaux sont normalement prévisibles, mais temporairement imprévisibles (Leung *et al.* 2016).

Une stratégie similaire, dénommée *bet-hedging* conditionnel, a également été décrite afin d'expliquer l'importance des processus épigénétiques pour faire face à l'imprévisibilité des conditions environnementales (Jablonka *et al.* 1995). La stratégie mixte repose sur la modification stochastique des marques épigénétiques et donc une variation phénotypique aléatoire, alors que le *bet-hedging* conditionnel résultera en des individus présentant des phénotypes identiques à la génération précédente grâce à l'héritabilité transgénérationnelle des marques épigénétiques d'une génération à l'autre. Outre des mécanismes différents, les deux stratégies reposent toutefois sur le même principe, c'est-à-dire que la persistance de la population repose sur le fait qu'une partie de la population modifie son phénotype en fonction d'un signal environnemental donné, mais qu'une autre partie affiche d'autres phénotypes sans lien avec les conditions environnementales lors du développement.

7.2. Importances écologiques et évolutives de la plasticité phénotypique

7.2.1. Diversification des niches écologiques

La majeure contribution qu'apporte la plasticité phénotypique est l'acclimatation dans un environnement, c'est-à-dire la possibilité d'un individu à ajuster son phénotype en fonction des conditions environnementales afin d'augmenter sa valeur adaptative. Les résultats des chapitres 2 et 4 soulignent cette utilité majeure chez un gynogène. Se reproduisant de manière asexuée, mais dépendant du sperme d'une espèce sexuée, les gynogènes doivent faire face à la même hétérogénéité environnementale que leur espèce hôte malgré l'absence de différences génétiques entre les individus, alors que les différences génétiques entre les individus sexués permettent leur adaptation locale. La plasticité phénotypique contribue ainsi au succès écologique de ces organismes asexués en permettant à un génotype de persister dans une vaste gamme d'environnements. Une grande répartition géographique du même génotype est alors possible (Angers & Schlosser 2007, Massicotte & Angers 2012, Vergilino, Leung & Angers 2016), ainsi qu'une diversification des niches au sein d'une même localité (Chapitre 4).

L'utilisation d'un modèle biologique asexué a permis de contrôler la variation génétique pouvant influencer la variation phénotypique et cerner ainsi le rôle de la variation épigénétique. Toutefois, les processus épigénétiques et leurs conséquences, telle la plasticité phénotypique, peuvent également se retrouver chez les organismes sexués où chaque individu, représentant chacun un génotype, présenterait une influence de l'environnement sur sa variation phénotypique qui lui est spécifique, et ainsi son propre potentiel à présenter une plasticité phénotypique. Cette capacité à pouvoir ajuster les phénotypes en fonction des conditions environnementales est donc également présente chez les organismes sexués. Ainsi, en plus des différences génétiques qui permettent à chaque individu sexué d'occuper une niche écologique légèrement différente selon la *Tangled Bank Hypothesis* (Ghiselin 1974, Bell 1982), la plasticité phénotypique leur permettrait d'utiliser une plus large gamme de ressources disponibles afin de réduire la compétition entre les individus ou, au contraire, de s'ajuster à des conditions similaires dans un environnement homogène.

7.2.2. Limites de la plasticité phénotypique

Lorsqu'adaptative, la plasticité phénotypique permet l'ajustement du phénotype en fonction d'un signal environnemental donné afin d'augmenter la valeur adaptative des individus. Ce changement de phénotype peut cependant induire des effets indésirables. Un des coûts associés à la plasticité phénotypique est, par exemple, l'instabilité développementale due à une plus grande susceptibilité d'imprécisions dans la production d'un phénotype alternatif chez les organismes plastiques (DeWitt *et al.* 1998). Chez les hybrides *C. eos-neogaeus*, la corrélation entre la plasticité phénotypique et l'instabilité développementale a été mise en évidence par une asymétrie fluctuante associée à une voie développementale alternative en réponse à un signal environnemental chez une lignée généraliste (Chapitre 5). Chez les gynogènes, ce coût pourrait être considéré comme un frein à la prolifération des organismes asexués, et ainsi contribuer à expliquer le paradoxe évolutif de la coexistence des organismes asexués et sexués. En effet, les environnements permettant l'adaptation locale d'une population sexuée sont caractérisés par des conditions stables. La plasticité phénotypique n'y est donc pas nécessaire pour les organismes sexués adaptés. Toutefois, les organismes asexués en sympatrie devront présenter de la plasticité phénotypique si le génotype asexué n'est pas adapté à l'environnement donné. Dû au coût associé à la plasticité phénotypique, la valeur adaptative des asexués pourrait ainsi être moindre que celle de la population sexuée.

Les chapitres 3 et 4 ont permis d'analyser respectivement la variation épigénétique et le degré de plasticité phénotypique de différentes lignées. Pour la lignée généraliste (le génotype B-01 retrouvé dans une multitude de localités dans la région des Laurentides), une adéquation entre le niveau de plasticité de la morphologie trophique et la grande proportion de variation épigénétique expliquée par l'environnement permet de conclure à un génotype plastique. À l'opposé, pour une des lignées spécialistes (le génotype A-11 présentant une répartition géographique restreinte dans la région des Canton de l'Est), une plasticité phénotypique est détectée au niveau de la morphologie trophique alors qu'une plus grande proportion de stochasticité explique le patron de méthylation mesuré au niveau de la nageoire caudale. Cette observation n'est toutefois pas contre-intuitive dans la mesure où un génotype plastique ne signifie pas que tous les traits associés à ce génotype répondront de la même manière à un signal environnemental donné. En effet, la plasticité phénotypique d'un trait peut être complètement

indépendante de celle d'un autre trait pour le même génotype (Bradshaw 1965, Sultan 1995). Par conséquent, le signal environnemental reçu par le mode d'alimentation ou celui responsable de la nage des poissons pourrait induire des réponses différentes en terme de plasticité phénotypique au niveau la forme de la bouche ou du profil de méthylation de la nageoire caudale, respectivement. Outre les coûts associés à la plasticité phénotypique, cette indépendance au niveau des traits peut ainsi induire une réponse à un changement incluant plusieurs facteurs environnementaux qui sera extrêmement variable d'un génotype à l'autre. Si l'expérimentation en milieu contrôlé a permis de déterminer l'effet du mode d'alimentation sur la morphologie trophique des poissons, l'utilisation d'un nombre plus élevé de facteurs environnementaux (*e.g.* température, abondance de nourriture, gradient de vitesse du courant, etc.) permettrait de mieux évaluer le potentiel de plasticité phénotypique des différentes lignées. La variation morphologique mesurée en milieux naturels pourrait ainsi être le résultat d'une multitude de paramètres environnementaux.

7.2.3. Prélude à l'adaptation

La plasticité phénotypique permet la survie des individus capables de percevoir un signal environnemental fiable et d'y répondre de manière adéquate, notamment grâce aux processus épigénétiques. De ce fait, sachant que la plasticité phénotypique est déterminée par des bases génétiques, une augmentation de la fréquence des génotypes épigénétiquement flexibles sera observée à la génération suivante (Gavrilets & Scheiner 1993, Scheiner 1993, de Jong 1995). Dans la mesure où la sélection favorise les génotypes plastiques, un environnement fluctuant devrait ainsi résulter en un niveau élevé de plasticité au sein de la population : c'est l'effet Baldwin (Simpson 1953, Crispo 2007, Angers *et al.* 2010). La plasticité phénotypique représente une source de variation phénotypique majeure permettant la persistance d'un génotype dans un environnement donné, malgré le fait qu'il ne possède pas l'allèle responsable de la production directe du phénotype optimal. Différentes conséquences peuvent en découler.

D'une part, si l'environnement demeure stable sur plusieurs générations, la fixation génétique d'un phénotype serait avantagée dans la mesure où la plasticité phénotypique implique différents coûts (Bradshaw 1965, DeWitt *et al.* 1998, Murren *et al.* 2015). En somme, la plasticité phénotypique peut permettre la persistance du génotype dans l'environnement stable

jusqu'à ce qu'une mutation favorable apparaisse sur le gène responsable du phénotype : c'est l'assimilation génétique, résultant à l'expression spontanée d'un phénotype en absence d'un signal environnemental autrefois nécessaire à son induction (Waddington 1953b, Lande 2009, Angers *et al.* 2010). D'autre part, la plasticité phénotypique, en augmentant la survie dans un nouvel environnement, peut résulter en une relâche de la sélection sur certains allèles des traits phénotypiques (de Jong 2005). Face à une perturbation environnementale, la plasticité phénotypique peut alors permettre l'augmentation démographique rapide d'une population en révélant de la variation génétique cryptique et permettant ainsi une adaptation rapide : c'est le sauvetage évolutif (*Evolutionary Rescue*) (Chevin & Lande 2010, Ashander *et al.* 2016).

En plus d'être une propriété d'un génotype et pouvant ainsi être considéré comme un trait quantitatif soumis à la sélection et évoluer, la plasticité phénotypique peut également être appréciée comme un processus développemental facilitant l'évolution des populations. En permettant l'acclimatation à un environnement donné, la plasticité phénotypique rapproche les individus d'un pic adaptatif dans un paysage évolutif. Ainsi, elle facilite l'adaptation des organismes selon les conditions environnementales, en relâchant la sélection sur certaines mutations.

7.3. Succès écologique des organismes asexués

Chez les organismes asexués, les processus épigénétiques représentent une stratégie alternative permettant la production de différents phénotypes en absence de différence génétique entre les individus. Ces processus sont d'autant plus importants dans la mesure où ils peuvent sous-tendre à des stratégies écologiques (la plasticité phénotypique ou le *bet-hedging*) permettant aux organismes asexués de faire face à différents types de fluctuations environnementales (prévisibilité et imprévisibilité des changements, respectivement), mais également en présentant un intérêt évolutif majeur qui est de permettre l'acclimatation et faciliter l'adaptation des organismes dans certaines conditions environnementales. Toutefois, les processus épigénétiques à eux seuls ne suffisent pas à expliquer le succès écologique des organismes asexués.

7.3.1. Importance de la diversité génétique

Malgré l'absence de différence génétique entre les individus, un point essentiel pour assurer le succès des organismes se reproduisant de manière asexuée est la diversité génétique. Un processus permettant une telle diversité chez certains organismes asexués est l'hybridation (section 1.5.3). Elle entraîne la formation d'un génome réunissant au sein d'un même individu des caractéristiques génétiques des deux parents provenant de populations différentes et donc d'une diversité génétique issue d'adaptations distinctes. L'état hétérozygote des gènes confère, en outre, aux hybrides la possibilité d'exprimer l'un et/ou l'autre des deux allèles pour s'acclimater à différentes conditions. Cela leur permet ainsi d'avoir un potentiel de variation au niveau phénotypique, ainsi que le potentiel de performer dans les mêmes niches écologiques que les espèces parentales ou de coloniser de nouvelles niches (Schultz 1971, Lynch 1984, Arnold *et al.* 1999). Chez les hybrides *C. eos-noegaeus*, ces conséquences reliées à leur état hétérozygote peuvent être entrevues au niveau de la variation phénotypique. Par exemple, la comparaison de la forme des arcs pharyngiens montre que les hybrides sont plus semblables à l'espèce paternelle *C. eos* (Figure 5.4, Chapitre 5). D'autre part, une étude comparant la taille des individus a révélé que dans certains lacs, les hybrides peuvent être plus semblables à l'espèce maternelle *C. neogaeus* (Mee 2014). Finalement, des caractères nouveaux peuvent également découler de l'hybridation, tels qu'observés au niveau des différentes formules dentaires (Figure 5.2, Chapitre 5) ou de la plasticité phénotypique, résultant en une plus grande sensibilité aux signaux environnementaux comparés aux espèces parentales (Chapitre 5).

La fréquence des hybridations peut également contribuer au succès de ces organismes asexués. À l'instar de la reproduction sexuée, les événements d'hybridation permettent de produire des génotypes différents. Chaque génotype hybride présente ainsi des caractères qui lui sont propres et lui permettent d'exploiter des niches écologiques différentes, tel que stipulé dans le modèle FNV (Vrijenhoek 1984). Chez les hybrides *C. eos-neogaeus*, la diversité de génotypes que l'on retrouve a permis à ce biotype de présenter une grande répartition géographique (Vergilino, Leung & Angers 2016) selon leur capacité à coloniser et persister dans des habitats différents, en étant plastique ou en étant *bet-hedger* (Leung *et al.* 2016).

Chez les gynogènes, d'autres mécanismes de diversification du matériel génétique, et par conséquent du potentiel de variation phénotypique, ont été proposés. Par exemple, chez les

salamandres unisexuées (*Ambystoma laterale-jeffersonianum*), l'introduction de nouveaux allèles est possible *via* la kleptogénèse, soit le remplacement d'un haplome du génotype hybride par celui du spermatozoïde induisant le développement de l'œuf (Bogart *et al.* 2007, Bi *et al.* 2008, Bi *et al.* 2009). La gynogénèse « imparfaite » se traduisant par la fécondation de l'œuf non-réduit des gynogènes par le spermatozoïde de l'espèce paternelle (*Paternal leakage*) a également été proposée comme mécanisme d'augmentation de la variation génétique chez les gynogènes afin d'éviter les conséquences du cliquet de Müller. Beukeboom & Vrijenhoek (1998) ont, par ailleurs, proposé l'élévation de ploïdie suite à l'incorporation du matériel génétique du spermatozoïde comme permettant un « mimétisme sexuel » chez les gynogènes. Dans le cas où l'expression des gènes est additive, le fait de posséder deux haplômes semblables à l'espèce sexuée permettrait aux individus triploïdes de ressembler davantage aux femelles sexuées que les clones diploïdes. Si les mâles affichent une préférence pour les femelles conspécifiques, les individus triploïdes présenteraient ainsi un avantage par rapport aux gynogènes diploïdes lors de la reproduction (Beukeboom & Vrijenhoek 1998).

Ces hypothèses sont notamment issues de l'observation d'individus triploïdes ou présentant une portion du génome du spermatozoïde dans les cellules somatiques des gynogènes (les microchromosomes) (Nanda *et al.* 1995, Schlupp *et al.* 1998, Lamatsch *et al.* 2000, Lamatsch *et al.* 2004). Dans le cas des microchromosomes, la transmission inter-génération de cette portion de matériel génétique par les lignées gynogènes a été observée chez le molly amazone (*Poecilia formosa*), ainsi que l'expression des gènes s'y retrouvant. Les microchromosomes pourraient ainsi résulter en une augmentation de la variation génétique chez les individus gynogènes ; toutefois leur fonction et intérêt évolutif demeurent encore mal connus (Nanda *et al.* 1995, Nanda *et al.* 2007).

D'autre part, afin que l'incorporation de nouveau matériel génétique compense l'accumulation de mutations délétères chez les gynogènes, les triploïdes devraient être en mesure de se reproduire par hybridogénèse. Ainsi chaque triploïde devrait produire des œufs diploïdes en éliminant à chaque génération le génome paternel complet afin de perpétuer le génome hybride. La fécondation avec un nouveau spermatozoïde permet ainsi l'incorporation de nouveau matériel génétique à chaque génération. Or, cela ne semble pas être le cas chez

certaines gynogènes (Goddard & Schultz 1993, Lamatsch & Stöck 2009) et reste donc encore à être démontré.

Finalement, cette inclusion du matériel génétique du spermatozoïde n'augmente pas nécessairement la valeur adaptative des gynogènes. Par exemple, chez les hybrides de salamandres unisexuées, le taux d'inclusion du spermatozoïde dans les œufs gynogénétiques est inconnu. Toutefois, la proportion de tétraploïdes diminue en fonction du stade de développement et une augmentation de ploïdie ($2N \rightarrow 3N$ ou $3N \rightarrow 4N$) est souvent associée à des performances moins bonnes chez ces hybrides gynogénétiques (Bogart *et al.* 1989, Teltser & Greenwald 2015).

7.3.2. Handicaps des gynogènes

Chez les gynogènes, la coexistence obligatoire entre des organismes sexués et asexués suppose la présence d'handicaps restreignant la prolifération des clones femelles afin d'éviter de dépasser leur espèce hôte. Outre la diversification des niches au sein d'une localité donnée, l'hypothèse d'un handicap démographique a été testée de manière théorique (Chapitre 6). Deux conclusions en ressortent : un handicap est nécessaire afin d'annuler l'avantage démographique des asexuées, mais la présence des individus, même stériles, est requise afin d'empêcher la prolifération des sexués. Suivant le modèle démographique de Wright-Fisher, la taille finie d'une population, imposée par une capacité de support maximale, provoque une variation aléatoire des fréquences des formes sexuées et asexuées d'une génération à l'autre et ceci d'autant plus que la taille de la population est petite (Charlesworth 2009). Le rôle écologique de ces individus stériles serait donc de restreindre la prolifération des individus sexués, par exemple en augmentant la compétition au niveau des niches alimentaires ou reproductives.

Chez les hybrides *C. eos-neogaeus*, la gynogenèse « imparfaite » impliquant l'incorporation du génome paternel pourrait être le mécanisme permettant ce handicap démographique dans la mesure où l'augmentation de ploïdie chez les poissons est souvent associée à la stérilité des individus (Benfey 1999). Dans ce complexe, il a été confirmé que le taux d'incorporation du matériel génétique paternel est de 50% (Goddard & Dawley 1990) et le ratio d'individus diploïdes vs triploïdes est de 1:1 en milieux naturels (Chapitre 6). De plus, les

femelles résultant de l'incorporation du matériel génétique du spermatozoïde ne se reproduisent pas de façon clonale et les mâles triploïdes sont stériles (Goddard & Schultz 1993).

Cette hypothèse peut également s'appliquer à d'autres systèmes gynogénétiques. Mais de manière générale, elle demeure encore à être testée notamment en confirmant que la fécondation des œufs gynogénétiques se fait à un taux de 50% et en identifiant le mécanisme cellulaire responsable de cette fécondation et de la stérilité des individus. De plus, il sera également nécessaire de vérifier si ces individus triploïdes présentent des traits écologiquement similaires à ceux des gynogènes « purs » afin de ne pas les surpasser, leur rôle étant de limiter le nombre d'individus sexués dans une population à taille finie (Chapitre 6). Il serait, par exemple, intéressant de comparer leur niveau de plasticité phénotypique en partitionnant la variation épigénétique totale en fonction des conditions environnementales.

Toutefois, si cette hypothèse est validée, elle permettrait de démontrer que, malgré l'absence de différence génétique entre les individus, mais avec un potentiel démographique comparable, les hybrides gynogènes sont capables de faire face aux mêmes variations des conditions environnementales qu'une espèce sexuée et souligne ainsi l'importance et l'efficacité des processus autre que génétiques dans la réponse des organismes face à des environnements changeants.

7.4. Perspectives

7.4.1. Épigenétique et conservation

En biologie de la conservation, l'élaboration des plans d'aménagement repose sur le concept d'unité de gestion (*Management Unit*). Les unités de gestion représentent des unités fonctionnellement indépendantes les unes des autres, présentant des potentiels distincts tels le taux de recrutement, de croissance et de survie des individus (Moritz 1994, Schwartz *et al.* 2007). La variabilité génétique d'une population est souvent prise en compte dans l'établissement des unités de gestion dans la mesure où elle lui confère le potentiel de générer une grande variabilité phénotypique. Elle est ainsi reconnue comme étant le principal facteur

permettant aux organismes de faire face aux environnements changeants (Barton & Charlesworth 1998, Reed & Frankham 2003).

Les processus épigénétiques occupent aussi un rôle central dans le processus de production d'un phénotype (Figure 7.1) et rejoignent la variation génétique dans les causes permettant aux organismes vivants de faire face aux fluctuations et à l'hétérogénéité des conditions environnementales. Ainsi, dans un but de conservation, se focaliser uniquement sur la variation génétique consisterait en une sous-estimation de cette capacité à persister dans un environnement changeant. L'intégration de la variation épigénétique permettrait de raffiner les stratégies de conservation en reconnaissant l'importance de la capacité d'une espèce à répondre rapidement aux changements environnementaux.

Si le niveau de variation génétique peut représenter un bon *proxy* quant au potentiel d'une population à générer une vaste gamme de phénotypes, le niveau de variation épigénétique à elle seule n'est pas complet en lui-même. Deux facteurs distincts peuvent modifier la variation épigénétique : les processus stochastiques et l'influence environnementale. De plus, l'influence relative de ces deux facteurs est propre à chaque génotype. Il est ainsi essentiel de partitionner la variation épigénétique expliquée par l'environnement de celle générée par les processus stochastiques afin d'estimer le potentiel des organismes à détecter et répondre conséquemment à un signal environnemental donné afin d'augmenter sa valeur adaptative. Ainsi, les stratégies de conservation devraient avoir pour objectif de conserver le potentiel d'évoluer des organismes et, par exemple, combiner la prévisibilité des changements environnementaux avec la capacité des organismes à répondre de manière adéquate à ces changements. Comme un génotype donné peut présenter des niveaux de plasticité différente selon le phénotype à l'étude, il serait ainsi important d'identifier les conditions environnementales influençant la valeur adaptative des individus et diversifier les phénotypes et les facteurs environnementaux à prendre en considération afin de raffiner ces stratégies de conservation.

7.4.2. Évolution de la plasticité phénotypique

La capacité à répondre aux changements environnementaux est cruciale pour la persistance des populations. Chez les organismes non clonaux, la reproduction sexuée permet de disposer d'une diversité de combinaisons génétiques permettant de s'adapter rapidement à de nouveaux

environnements. D'autre part, la plasticité phénotypique permet à un génotype de produire des phénotypes différents en fonction des stimuli environnementaux. La plasticité phénotypique est déterminée par des bases génétiques. Elle peut ainsi être considérée comme un trait quantitatif pouvant être soumis à la sélection et évoluer (Gavrilets & Scheiner 1993, Scheiner 1993, de Jong 1995, Nussey *et al.* 2005). Quelle serait l'influence de la reproduction sexuée sur l'évolution de la plasticité phénotypique ?

Dans certains cas, la plasticité phénotypique et la reproduction sexuée sont considérées comme des stratégies alternatives pour faire face aux changements environnementaux. Par exemple, il a été proposé que les organismes asexués seraient plus susceptibles de présenter des génotypes généralistes (GPG) afin de permettre de coloniser différents habitats et perdurer malgré les fluctuations environnementales (Lynch 1984). Comme le modèle GPG est généralement associé à une grande plasticité phénotypique, on pourrait s'attendre à ce que les organismes asexués soient plus plastiques que les sexués. Par extension, on pourrait prévoir une corrélation négative entre la plasticité phénotypique et la variation génétique : la plasticité phénotypique compenserait pour un manque de variation génétique afin de permettre la production d'une variabilité phénotypique et ainsi la persistance de la population malgré un environnement fluctuant.

D'autre part, la diversité génétique non liée au phénotype responsable de la survie des individus dans un environnement donné peut être à l'abri des pressions de sélection. La plasticité phénotypique serait ainsi responsable de maintenir une variation génétique élevée au sein d'une population (Gillespie & Turelli 1989). De plus, si l'adaptation est favorisée au détriment de la plasticité dans un environnement stable, une plus grande plasticité phénotypique et une variation génétique plus élevée seraient observées dans un environnement où les conditions sont variables (Scheiner & Goodnight 1984).

Pouvoir identifier l'influence de la reproduction sexuée sur l'évolution de la plasticité phénotypique et démêler l'influence relative de la variation génétique et de la plasticité phénotypique dans la réponse aux environnements changeants contribuerait ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes responsables du potentiel évolutif des populations naturelles. Par exemple, un goulot d'étranglement (disparition d'une proportion substantielle de la population suite à une perturbation environnementale) ou un effet fondateur (isolement d'une

sous-partie de la population) ont pour conséquence une réduction de la variation génétique de la population et pourraient ainsi influencer l'évolution de la plasticité phénotypique. Une application pratique à ces connaissances consisterait à prédire l'évolution des populations suite à une baisse drastique des effectifs et, par exemple, avoir à une meilleure évaluation du potentiel invasif de certaines espèces ou encore aider à la conception des stratégies de conservation.

7.5. Conclusion

Pour conclure, les résultats obtenus au cours de cette thèse ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la capacité des organismes à faire face à leur environnement. L'utilisation d'un modèle asexué a permis de mieux cerner le rôle important des processus épigénétiques dans la production des phénotypes. Le partitionnement des différentes sources de variation épigénétique a permis d'inférer la capacité d'un génotype à pouvoir rapidement répondre à un changement environnemental et donc à survivre dans un environnement changeant trop rapidement. Cette thèse a ainsi permis de souligner l'importance des processus épigénétiques comme mécanismes d'acclimatation à l'hétérogénéité environnementale, notamment à travers son rôle dans les stratégies écologiques telles la plasticité phénotypique et le *bet-hedging*.

De plus, malgré les différents coûts associés à la plasticité phénotypique, les organismes asexués semblent être capables d'endosser d'autres coûts associés à la reproduction sexuée, notamment le coût démographique induit par la nécessité de produire des mâles chez les sexués. Ces différents facteurs participent conjointement au succès écologique d'un vertébré asexué et soulignent ainsi l'efficacité des stratégies alternatives à la reproduction sexuée, soit les mécanismes impliquant les processus épigénétiques.

La compréhension de ces différents mécanismes sous-jacents au succès écologique des organismes face aux variations environnementales permet ainsi une meilleure évaluation de leur potentiel évolutif et fournit des outils supplémentaires dans leur protection face à un environnement changeant.

Bibliographie

- Acar M, Mettetal JT, van Oudenaarden A (2008) Stochastic switching as a survival strategy in fluctuating environments. *Nature Genetics* 40, 471-475.
- Adams DC, Collyer ML (2009) A general framework for the analysis of phenotypic trajectories in evolutionary studies. *Evolution* 63, 1143-1154.
- Adams DC, Otárola-Castillo E (2013) geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods in Ecology and Evolution* 4, 393-399.
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* 71, 5-16.
- Agrawal AF (2001) Sexual selection and the maintenance of sexual reproduction. *Nature* 411, 692-695.
- Albertson RC, Yelick PC (2005) Roles for *fgf8* signaling in left-right patterning of the visceral organs and craniofacial skeleton. *Developmental Biology* 283, 310-321.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 613-622.
- Altukhov YP (1981) The stock concept from the viewpoint of population genetics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 1523-1538.
- Anderson MJ (2006) Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics* 62, 245-253.
- Angers B, Castonguay E, Massicotte R (2010) Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology* 19, 1283-1295.
- Angers B, Schlosser IJ (2007) The origin of *Phoxinus eos-neogaeus* unisexual hybrids. *Molecular Ecology* 16, 4562-4571.
- April J, Hanner RH, Dion-Côté A-M, Bernatchez L (2013) Glacial cycles as an allopatric speciation pump in north-eastern American freshwater fishes. *Molecular Ecology* 22, 409-422.
- Arbogast BS, Kenagy G (2001) Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28, 819-825.
- Arnold ML, Bulger MR, Burke JM, Hempel AL, Williams JH (1999) Natural hybridization: how low can you go and still be important? *Ecology* 80, 371-381.

- Ashander J, Chevin L-M, Baskett ML (2016) Predicting evolutionary rescue via evolving plasticity in stochastic environments. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283, 20161690.
- Aubry KB, Statham MJ, Sacks BN, Perrine JD, Wisely SM (2009) Phylogeography of the North American red fox: vicariance in Pleistocene forest refugia. *Molecular Ecology* 18, 2668-2686.
- Baker H (1965) Characteristics and modes of origin of weeds. In: *The Genetics of Colonizing Species* (eds. HG Baker, GL Stebbins), pp. 147-169. Academic Press: New York.
- Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622-1625.
- Balsano JS, Randle EJ, Rasch EM, Monaco PJ (1985) Reproductive behavior and the maintenance of all-female *Poecilia*. *Environmental Biology of Fishes* 12, 251-263.
- Barrett RD, Schluter D (2008) Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 38-44.
- Barron JN, Lawson TJ, Jensen PA (2016) Analysis of potential factors allowing coexistence in a sexual/asexual minnow complex. *Oecologia* 180, 707-715.
- Barton N (2001) The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10, 551-568.
- Barton NH, Charlesworth B (1998) Why sex and recombination? *Science* 281, 1986-1990.
- Barton NH, Hewitt G (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16, 113-148.
- Bateson P, Gluckman P, Hanson M (2014) The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *The Journal of Physiology* 592, 2357-2368.
- Becker C, Hagemann J, Müller J, *et al.* (2011) Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature* 480, 245-249.
- Beldade P, Mateus ARA, Keller RA (2011) Evolution and molecular mechanisms of adaptive developmental plasticity. *Molecular Ecology* 20, 1347-1363.
- Bell G (1982) *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality* University of California Press, Berkeley.
- Benbouza H, Jacquemin J-M, Baudoin J-P, Mergeai G (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 10, 77-81.
- Benfey TJ (1999) The physiology and behavior of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* 7, 39-67.

- Bengtsson BO (2009) Asex and evolution: a very large-scale overview. In: *Lost Sex* (eds. Isa Schön, Koen Martens, Peter van Dijk), pp. 1-19. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Bennett-Baker PE, Wilkowski J, Burke DT (2003) Age-associated activation of epigenetically repressed genes in the mouse. *Genetics* 165, 2055-2062.
- Bernatchez L, Glémet H, Wilson CC, Danzmann RG (1995) Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 179-185.
- Bernatchez L, Wilson CC (1998) Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology* 7, 431-452.
- Berner D, Adams D, Grandchamp AC, Hendry A (2008) Natural selection drives patterns of lake-stream divergence in stickleback foraging morphology. *Journal of evolutionary biology* 21, 1653-1665.
- Beukeboom L, Vrijenhoek R (1998) Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis. *Journal of Evolutionary Biology* 11, 755-782.
- Bi K, Bogart J, Fu J (2009) An examination of intergenomic exchanges in *A. laterale*-dependent unisexual salamanders in the genus *Ambystoma*. *Cytogenetic and Genome Research* 124, 44-50.
- Bi K, Bogart JP, Fu J (2008) The prevalence of genome replacement in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* (Amphibia, Caudata) revealed by nuclear gene genealogy. *BMC Evolutionary Biology* 8, 1.
- Binet MC, Angers B (2005) Genetic identification of members of the *Phoxinus eos-neogaeus* hybrid complex. *Journal of Fish Biology* 67, 1169-1177.
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16, 6-21.
- Blewitt ME, Vickaryous NK, Paldi A, Koseki H, Whitelaw E (2006) Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice. *PLoS Genetics* 2, e49.
- Bogart JP, Bi K, Fu J, Noble DW, Niedzwiecki J (2007) Unisexual salamanders (genus *Ambystoma*) present a new reproductive mode for eukaryotes. *Genome* 50, 119-136.
- Bogart JP, Elinson p, Licht e (1989) Temperature and sperm incorporation in polyploid salamanders. *Science* 246, 1032-1034.
- Boizard J, Magnan P, Angers B (2009) Effects of dynamic landscape elements on fish dispersal: the example of creek chub (*Semotilus atromaculatus*). *Molecular Ecology* 18, 430-441.

- Bollati V, Baccarelli A (2010) Environmental epigenetics. *Heredity* 105, 105-112.
- Booij C, Guldemond J (1984) Distributional and ecological differentiation between asexual gynogenetic planthoppers and related sexual species of the genus *Muellerianella* (Homoptera, Delphacidae). *Evolution* 8, 163-175.
- Bookstein FL (1997) Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical Image Analysis* 1, 225-243.
- Borcard D, Legendre P, Drapeau P (1992) Partialling out the spatial component of ecological variation. *Ecology* 73, 1045-1055.
- Bossdorf O, Richards CL, Pigliucci M (2008) Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters* 11, 106-115.
- Botero CA, Weissing FJ, Wright J, Rubenstein DR (2015) Evolutionary tipping points in the capacity to adapt to environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 184-189.
- Bradshaw AD (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* 13, 115-155.
- Brock HW, Fisher CL (2005) Maintenance of gene expression patterns. *Developmental Dynamics* 232, 633-655.
- Bruce A (1910) The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. *Science* 32, 627.
- Burger R, Lynch M (1995) Evolution and extinction in a changing environment: a quantitative-genetic analysis. *Evolution* 49, 151-163.
- Burke JM, Arnold ML (2001) Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics* 35, 31-52.
- Bushell C, Spielman M, Scott RJ (2003) The basis of natural and artificial postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis* species. *The Plant Cell Online* 15, 1430-1442.
- Camus PA, Lima M (2002) Populations, metapopulations, and the open-closed dilemma: the conflict between operational and natural population concepts. *Oikos* 97, 433-438.
- Carlson RL, Wainwright PC (2010) The ecological morphology of darter fishes (Percidae: Etheostomatinae). *Biological Journal of the Linnean Society* 100, 30-45.
- Casadesús J, Low DA (2013) Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 288, 13929-13935.
- Castonguay E, Angers B (2012) The key role of epigenetics in the persistence of asexual lineages. *Genetics Research International* 2012, 1-9.

- Cavalli-Sforza LL, Edwards AW (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American journal of human genetics* 19, 233.
- Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen TJ (2006) Abundance-based similarity indices and their estimation when there are unseen species in samples. *Biometrics* 62, 361-371.
- Charlesworth B (2009) Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics* 10, 195-205.
- Chevin L-M, Lande R, Mace GM (2010) Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS Biology* 8, e1000357.
- Chevin LM, Lande R (2010) When do adaptive plasticity and genetic evolution prevent extinction of a density-regulated population? *Evolution* 64, 1143-1150.
- Chinnusamy V, Zhu J-K (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 133-139.
- Choleva L, Janko K, De Gelas K, *et al.* (2012) Synthesis of clonality and polyploidy in vertebrate animals by hybridization between two sexual species. *Evolution* 66, 2191-2203.
- Collin H, Fumagalli L (2011) Evidence for morphological and adaptive genetic divergence between lake and stream habitats in European minnows (*Phoxinus phoxinus*, Cyprinidae). *Molecular Ecology* 20, 4490-4502.
- Collyer M, Sekora D, Adams D (2015) A method for analysis of phenotypic change for phenotypes described by high-dimensional data. *Heredity* 115, 357-365.
- Collyer ML, Adams DC (2007) Analysis of two-state multivariate phenotypic change in ecological studies. *Ecology* 88, 683-692.
- Collyer ML, Adams DC (2013) Phenotypic trajectory analysis: comparison of shape change patterns in evolution and ecology. *Hystrix* 24, 75-83.
- Colot V, Rossignol JL (1999) Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 21, 402-411.
- Conover D, Kynard B (1981) Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* 213, 577-579.
- Cornuet J-M, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153, 1989-2000.

- Coulon A, Guillot G, Cosson JF, *et al.* (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology* 15, 1669-1679.
- Crispo E (2007) The Baldwin effect and genetic assimilation: revisiting two mechanisms of evolutionary change mediated by phenotypic plasticity. *Evolution* 61, 2469-2479.
- Crow JF (1948) Alternative hypotheses of hybrid vigor. *Genetics* 33, 477-487.
- Crow JF (1994) Advantages of sexual reproduction. *Developmental Genetics* 15, 205-213.
- Cubas P, Vincent C, Coen E (1999) An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401, 157-161.
- Cunha C, Coelho M, Carmona J, Doadrio I (2004) Phylogeographical insights into the origins of the *Squalius alburnoides* complex via multiple hybridization events. *Molecular Ecology* 13, 2807-2817.
- Cyr F, Angers B (2011) Historical process lead to false genetic signal of current connectivity among populations. *Genetica* 139, 1417-1428.
- Cyr F, Peres-Neto P, Angers B, Tonn WM (2012) Allopatric distribution of generalist parasites: interplay between postglacial dispersal and host species. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 69, 1491-1498.
- da Barbiano LA, Waller J, Gabor CR (2010) Differences in competitive efficiency between a sexual parasite and its host provide insight into the maintenance of a sperm-dependent vertebrate species. *Journal of Freshwater Ecology* 25, 523-530.
- Dawley RM, Goddard KA (1988) Diploid-triploid mosaics among unisexual hybrids of the minnows *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaeus*. *Evolution* 42, 649-659.
- Dawley RM, Schultz RJ, Goddard KA (1987) Clonal reproduction and polyploidy in unisexual hybrids of *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaeus* (Pisces; Cyprinidae). *Copeia* 1987, 275-283.
- de Jong G (1995) Phenotypic plasticity as a product of selection in a variable environment. *American Naturalist* 145, 493-512.
- de Jong G (2005) Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytologist* 166, 101-118.
- de Jong IG, Haccou P, Kuipers OP (2011) Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *Bioessays* 33, 215-223.
- Debat V, David P (2001) Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 555-561.

- Delmotte F, Sabater-Muñoz B, Prunier-Leterme N, *et al.* (2003) Phylogenetic evidence for hybrid origins of asexual lineages in an aphid species. *Evolution* 57, 1291-1303.
- Demontis D, Pertoldi C, Passamonti M, Scali V (2010) Increased fluctuating asymmetry in a naturally occurring hybrid zone between the stick insects *Bacillus rossius rossius* and *Bacillus rossius redtenbacheri*. *Journal of Insect Science* 10, 147.
- DeWitt TJ, Sih A, Wilson DS (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 13, 77-81.
- Dionne M, Caron F, Dodson JJ, Bernatchez L (2008) Landscape genetics and hierarchical genetic structure in Atlantic salmon: the interaction of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology* 17, 2382-2396.
- Dobzhansky T (1936) Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. *Genetics* 21, 113-135.
- Doeringsfeld MR, Schlosser IJ, Elder JF, Evenson DP (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.
- Dong G, Dong Q, Liu Y, *et al.* (2014) High-resolution micro-CT scanning as an innovative tool for evaluating dental hard tissue development. *Journal of Applied Clinical Medical Physics* 15, 335-344.
- Dowling TE, Secor CL (1997) The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 593-619.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF (1998) Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148, 1667-1686.
- Dryden I, Mardia K (1993) Multivariate shape analysis. *Sankhyā: The Indian Journal of Statistics, Series A* 55, 460-480.
- Dryden IL, Mardia KV (1998) *Statistical shape analysis* Wiley Chichester.
- Duhl DM, Vrieling H, Miller KA, Wolff GL, Barsh GS (1994) Neomorphic *agouti* mutations in obese yellow mice. *Nature Genetics* 8, 59-65.
- Dybdahl MF, Kane SL (2005) Adaptation vs. phenotypic plasticity in the success of a clonal invader. *Ecology* 86, 1592-1601.
- Eastman JT (1970) *The pharyngeal bones and teeth of Minnesota cyprinid and catostomid fishes: functional morphology, variation and taxonomic significance*. Ph.D. Thesis, University of Minnesota.

- Eastman JT, Underhill JC (1973) Intraspecific variation in the pharyngeal tooth formulae of some cyprinid fishes. *Copeia* 1973, 45-53.
- Edmunds S, Timmerman CC (2003) Modeling factors affecting the severity of outbreeding depression. *Conservation Biology* 17, 883-892.
- Edwards A (1971) Distances between populations on the basis of gene frequencies. *Biometrics*, 873-881.
- Elder JF, Schlosser IJ (1995) Extreme clonal uniformity of *Phoxinus eos/neogaeus* gynogens (Pisces: Cyprinidae) among variable habitats in northern Minnesota beaver ponds. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92, 5001-5005.
- Engeman JM, Aspinwall N, Mabee PM (2009) Development of the pharyngeal arch skeleton in *Catostomus commersonii* (Teleostei: Cypriniformes). *Journal of Morphology* 270, 291-305.
- Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB, Yost HJ (2005) Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* 132, 1247-1260.
- Evans HE, Deubler EE (1955) Pharyngeal tooth replacement in *Semotilus atromaculatus* and *Clinostomus elongatus*, two species of cyprinid fishes. *Copeia* 1955, 31-41.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online* 1, 47.
- Fedorov A, Beichel R, Kalpathy-Cramer J, et al. (2012) 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magnetic Resonance Imaging* 30, 1323-1341.
- Fisher RA (1925) *Statistical methods for research workers* Genesis Publishing Pvt. Oliver and Boyd Ltd, Edinburgh.
- Fishman L, Willis JH (2001) Evidence for Dobzhansky-Muller Incompatibilities Contributing to the Sterility of Hybrids Between *Mimulus guttatus* and *M. nasutus*. *Evolution* 55, 1932-1942.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10604-10609.
- Frank SA (1991) Divergence of meiotic drive-suppression systems as an explanation for sex-biased hybrid sterility and inviability. *Evolution* 4, 262-267.
- Fraser D, Kærn M (2009) A chance at survival: gene expression noise and phenotypic diversification strategies. *Molecular Microbiology* 71, 1333-1340.

- Furrow RE, Feldman MW (2014) Genetic variation and the evolution of epigenetic regulation. *Evolution* 68, 673-683.
- Gagnon M-C, Angers B (2006) The determinant role of temporary proglacial drainages on the genetic structure of fishes. *Molecular Ecology* 15, 1051-1065.
- Gärtner K (1990) A third component causing random variability beside environment and genotype. A reason for the limited success of a 30 year long effort to standardize laboratory animals? *Laboratory Animals* 24, 71-77.
- Gärtner K, Baunack E (1981) Is the similarity of monozygotic twins due to genetic factors alone? *Nature* 292 646 - 647.
- Gavrilets S, Scheiner SM (1993) The genetics of phenotypic plasticity. V. Evolution of reaction norm shape. *Journal of Evolutionary Biology* 6, 31-48.
- Gerry S, Vogelzang M, Ascher J, Ellerby D (2013) Variation in the diet and feeding morphology of polyphenic *Lepomis macrochirus*. *Journal of Fish Biology* 82, 338-346.
- Ghiselin MT (1974) *The Economy of Nature and the Evolution of Sex*. University of California Press, Berkeley.
- Giller PS, Malmqvist B (1998) *The biology of streams and rivers* Oxford University Press, New York.
- Gillespie JH, Turelli M (1989) Genotype-environment interactions and the maintenance of polygenic variation. *Genetics* 121, 129-138.
- Goddard K, Megwinoff O, Wessner L, Giaimo F (1998) Confirmation of gynogenesis in *Phoxinus eos-neogaeus* (Pisces: Cyprinidae). *Journal of Heredity* 89, 151-157.
- Goddard K, Schultz R (1993) Aclonal reproduction by polyploid members of the clonal hybrid species *Phoxinus eos-neogaeus* (Cyprinidae). *Copeia* 3, 650-660.
- Goddard KA, Dawley RM (1990) Clonal inheritance of a diploid nuclear genome by a hybrid freshwater minnow (*Phoxinus eos-neogaeus*, Pisces: Cyprinidae). *Evolution* 44, 1052-1065.
- Goddard KA, Dawley RM, Dowling TE (1989) Origin and genetic relationships of diploid, triploid, and diploid-triploid mosaic biotypes in the *Phoxinus eos-neogaeus* unisexual complex. In: *Evolution and ecology of unisexual vertebrates* (eds. RM Dawley, JP Bogart), pp. Bull. 466, pp. 268-280, New York State Museum, New York.
- Gompert Z, Fordyce JA, Forister ML, Shapiro AM, Nice CC (2006) Homoploid hybrid speciation in an extreme habitat. *Science* 314, 1923-1925.

- Gotelli NJ, Colwell RK (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4, 379-391.
- Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86, 485-486.
- Gower JC (1975) Generalized Procrustes analysis. *Psychometrika* 40, 33-51.
- Graham JH, Raz S, Hel-Or H, Nevo E (2010) Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications. *Symmetry* 2, 466-540.
- Grant PR, Grant BR (1997) Hybridization, sexual imprinting, and mate choice. *The American Naturalist* 149, 1-28.
- Gray MM, Weeks SC (2001) Niche breadth in clonal and sexual fish (*Poeciliopsis*): a test of the frozen niche variation model. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 1313-1318.
- Gunz P, Mitteroecker P (2013) Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix* 24, 103-109.
- Haldane JB (1922) Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of genetics* 12, 101-109.
- Hansson B, Westerberg L (2002) On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology* 11, 2467-2474.
- Hardin G (1960) The competitive exclusion principle. *Science* 131, 1292-1297.
- Hardy OJ, Charbonnel N, Fréville H, Heuertz M (2003) Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163, 1467-1482.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2, 618-620.
- Heard E, Martienssen RA (2014) Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. *Cell* 157, 95-109.
- Hedrick PW (2011) *Genetics of populations*, 4th edn. Jones & Bartlett Learning, Sudbury, Massachusetts.
- Hedrick PW, Ginevan ME, Ewing EP (1976) Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Annual Review of Ecology and Systematics* 7, 1-32.
- Hellriegel B, Reyer HU (2000) Factors influencing the composition of mixed populations of a hemiclinal hybrid and its sexual host. *Journal of Evolutionary Biology* 13, 906-918.

- Herman JJ, Spencer HG, Donohue K, Sultan SE (2014) How stable 'should' epigenetic modifications be? Insights from adaptive plasticity and bet hedging. *Evolution* 68, 632-643.
- Heubel KU, Hornhardt K, Ollmann T, *et al.* (2008) Geographic variation in female mate-copying in the species complex of a unisexual fish, *Poecilia formosa*. *Behaviour* 145, 1041-1064.
- Heubel KU, Rankin DJ, Kokko H (2009) How to go extinct by mating too much: population consequences of male mate choice and efficiency in a sexual-aseexual species complex. *Oikos* 118, 513-520.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society* 58, 247-276.
- Hilbish T, Carson E, Plante J, Weaver L, Gilg M (2002) Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England. *Marine Biology* 140, 137-142.
- Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of statistics* 6, 65-70.
- Hopper KR, Rosenheim JA, Prout T, Oppenheim SJ (2003) Within-generation bet hedging: a seductive explanation? *Oikos* 101, 219-222.
- Hubbell SP (2001) *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography* Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Hubbs C (1964) Interactions between a bisexual fish species and its gynogenetic sexual parasite. *Bulletin of the Texas Memorial Museum* 8, 1-72.
- Hubbs CL (1955) Hybridization between fish species in nature. *Systematic Zoology* 4, 1-20.
- Hubbs CL, Hubbs LC (1932) Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. *Science* 76, 628-630.
- Hubbs CL, Hubbs LC (1945) Bilateral asymmetry and bilateral variation in fishes. *Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters* 30, 229-310.
- Hung NM, Ryan TM, Stauffer JR, Madsen H (2015) Does hardness of food affect the development of pharyngeal teeth of the black carp, *Mylopharyngodon piceus* (Pisces: Cyprinidae)? *Biological Control* 80, 156-159.
- Huysseune A, Sire JY (1998) Evolution of patterns and processes in teeth and tooth-related tissues in non-mammalian vertebrates. *European Journal of Oral Sciences* 106, 437-481.

- Itono M, Okabayashi N, Morishima K, *et al.* (2007) Cytological mechanisms of gynogenesis and sperm incorporation in unreduced diploid eggs of the clonal loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 307, 35-50.
- Jablonka E, Oborny B, Molnar I, *et al.* (1995) The adaptive advantage of phenotypic memory in changing environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 350, 133-141.
- Jablonka E, Raz G (2009) Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Quarterly Review of Biology* 84, 131-176.
- Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33, 245-254.
- Janko K, Bohlen J, Lamatsch D, *et al.* (2007) The gynogenetic reproduction of diploid and triploid hybrid spined loaches (Cobitis: Teleostei), and their ability to establish successful clonal lineages—on the evolution of polyploidy in asexual vertebrates. *Genetica* 131, 185-194.
- Janko K, Culling M, Rab P, Kotlik P (2005) Ice age cloning - comparison of the Quaternary evolutionary histories of sexual and clonal forms of spiny loaches (Cobitis; Teleostei) using the analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 14, 2991-3004.
- Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24, 1403-1405.
- Jombart T, Ahmed I (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27, 3070-3071.
- Jordan DS, Evermann B (1896) The Fishes of North and Middle America. *Bulletin of the United States National Museum* Pt. 1:, 1-124.
- Josefsson C, Dilkes B, Comai L (2006) Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization. *Current Biology* 16, 1322-1328.
- Judson OP, Normark BB (1996) Ancient asexual scandals. *Trends in Ecology & Evolution* 11, 41-46.
- Karpouzi V, Stergiou K (2003) The relationships between mouth size and shape and body length for 18 species of marine fishes and their trophic implications. *Journal of Fish Biology* 62, 1353-1365.
- Kearney M (2005) Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 495-502.

- Kearney MR (2003) Why is sex so unpopular in the Australian desert? *Trends in Ecology & Evolution* 18, 605-607.
- Keast A, Webb D (1966) Mouth and body form relative to feeding ecology in the fish fauna of a small lake, Lake Opinicon, Ontario. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 23, 1845-1874.
- Kettlewell HBD (1955) Selection experiments on industrial melanism in the *Lepidoptera*. *Heredity* 9, 323-342.
- Klingenberg CP (2003) A developmental perspective on developmental instability: theory, models and mechanisms. In: *Developmental instability: causes and consequences* (ed. M Polak), pp. 14-34. Oxford University Press.
- Klingenberg CP (2010) Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews Genetics* 11, 623-635.
- Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A (2002) Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56, 1909-1920.
- Klingenberg CP, McIntyre GS (1998) Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52, 1363-1375.
- Klingenberg CP, Nijhout HF (1999) Genetics of fluctuating asymmetry: a developmental model of developmental instability. *Evolution* 53, 358-375.
- Kokko H, Heubel KU, Rankin DJ (2008) How populations persist when asexuality requires sex: the spatial dynamics of coping with sperm parasites. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 275, 817-825.
- Kondrashov AS (1988) Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336, 435-440.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319, 1827-1830.
- Kussell E, Leibler S (2005) Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* 309, 2075-2078.
- Lachmann M, Jablonka E (1996) The inheritance of phenotypes: an adaptation to fluctuating environments. *Journal of Theoretical Biology* 181, 1-9.
- Lamatsch D, Nanda I, Epplen J, Schmid M, Scharl M (2000) Unusual triploid males in a microchromosome-carrying clone of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Cytogenetic and Genome Research* 91, 148-156.

- Lamatsch D, Nanda I, Schlupp I, *et al.* (2004) Distribution and stability of supernumerary microchromosomes in natural populations of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Cytogenetic and Genome Research* 106, 189-194.
- Lamatsch DK, Stöck M (2009) Sperm-dependent parthenogenesis and hybridogenesis in teleost fishes. In: *Lost sex* (eds. Isa Schön, Koen Martens, Peter van Dijk), pp. 399-432. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Lampert KP, Lamatsch DK, Fischer P, *et al.* (2007) Automictic reproduction in interspecific hybrids of Poeciliid fish. *Current Biology* 17, 1948-1953.
- Lande R (2009) Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *Journal of Evolutionary Biology* 22, 1435-1446.
- Lande R, Shannon S (1996) The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution* 50, 434-437.
- Langerhans RB, Layman CA, Langerhans AK, DeWitt TJ (2003) Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. *Biological Journal of the Linnean Society* 80, 689-698.
- Laporte M, Claude J, Berrebi P, Perret P, Magnan P (2016) Shape plasticity in response to water velocity in the freshwater blenny *Salaria fluviatilis*. *Journal of fish biology* 88, 1191-1203.
- Laurin-Lemay S, Angers B, Benrey B, Brodeur J (2013) Inconsistent genetic structure among members of a multitrophic system: did bruchid parasitoids (*Horismenus spp.*) escape the effects of bean domestication? *Bulletin of Entomological Research* 103, 182-192.
- Le Roux JJ, Wieczorek AM, Wright MG, Tran CT (2007) Super-genotype: global monoclonality defies the odds of nature. *PloS One* 2, e590.
- Leamy LJ, Klingenberg CP (2005) The genetics and evolution of fluctuating asymmetry. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36, 1-21.
- Leary RF, Allendorf FW (1989) Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: implications for conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 4, 214-217.
- Legendre P, Anderson MJ (1999) Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* 69, 1-24.
- Legendre P, Borcard D, Peres-Neto PR (2005) Analyzing beta diversity: partitioning the spatial variation of community composition data. *Ecological Monographs* 75, 435-450.
- Legendre P, Cáceres M (2013) Beta diversity as the variance of community data: dissimilarity coefficients and partitioning. *Ecology Letters* 16, 951-963.

- Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical ecology*, 2nd English edition edn. Elsevier Science, Amsterdam.
- Leung C, Breton S, Angers B (2016) Facing environmental predictability with different sources of epigenetic variation. *Ecology and Evolution* 6, 5234-5245.
- Levin M (2005) Left–right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mechanisms of Development* 122, 3-25.
- Levins R (1963) Theory of fitness in a heterogeneous environment. II. Developmental flexibility and niche selection. *The American Naturalist* 97, 75-90.
- Lewontin RC, Birch LC (1966) Hybridization as a source of variation for adaptation to new environments. *Evolution* 20, 315-336.
- Linder CR, Rieseberg LH (2004) Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. *American Journal of Botany* 91, 1700-1708.
- Lippman ZB, Zamir D (2007) Heterosis: revisiting the magic. *Trends in Genetics* 23, 60-66.
- Luo D, Carpenter R, Vincent C, Copsey L, Coen E (1996) Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature* 383, 794-799.
- Lynch M (1984) Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *Quarterly Review of Biology* 59, 257-290.
- Lynch M (1991) The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution* 45, 622-629.
- Mable B (2004) ‘Why polyploidy is rarer in animals than in plants’: myths and mechanisms. *Biological Journal of the Linnean Society* 82, 453-466.
- Macgregor H, Uzzell TM (1964) Gynogenesis in salamanders related to *Ambystoma jeffersonianum*. *Science* 143, 1043-1045.
- Magnan P, Proulx R, Berrebi P, *et al.* (2014) Morphological variation in the freshwater blenny *Salaria fluviatilis* from Corsican rivers: adaptive divergence, phenotypic plasticity or both? *Journal of fish biology* 84, 31-44.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 189-197.
- Manning K, Tör M, Poole M, *et al.* (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* 38, 948-952.

- Marcus L, Hingst-Zaher E, Zaher H (2000) Application of landmark morphometrics to skulls representing the orders of living mammals. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 11.
- Martin GM (2005) Epigenetic drift in aging identical twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102, 10413-10414.
- Massicotte R, Angers B (2011) General-purpose genotype or how epigenetics extend the flexibility of a genotype. *Genetics Research International* 2012, 7 pages.
- Massicotte R, Angers B (2012) General-purpose genotype or how epigenetics extend the flexibility of a genotype. *Genetics Research International*, 317175.
- Massicotte R, Magnan P, Angers B (2008) Intralacustrine site fidelity and nonrandom mating in the littoral-spawning northern redbelly dace (*Phoxinus eos*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65, 2016-2025.
- Massicotte R, Whitelaw E, Angers B (2011) DNA methylation: A source of random variation in natural populations. *Epigenetics* 6, 421-427.
- Matsumoto Y, Buemio A, Chu R, Vafae M, Crews D (2013) Epigenetic Control of Gonadal Aromatase (cyp19a1) in Temperature-Dependent Sex Determination of Red-Eared Slider Turtles. *PloS One* 8, e63599.
- Mavárez J, Linares M (2008) Homoploid hybrid speciation in animals. *Molecular Ecology* 17, 4181-4185.
- Maynard Smith J (1978) *The evolution of sex* Cambridge Univ Press, Cambridge.
- Mayr E (1970) *Populations, species and evolution: an abridgement of animal species and evolution* Harvard University Press.
- McGuigan K, Franklin CE, Moritz C, Blows MW (2003) Adaptation of rainbow fish to lake and stream habitats. *Evolution* 57, 104-118.
- McKay FE (1971) Behavioral aspects of population dynamics in unisexual-bisexual *Poeciliopsis* (Pisces: Poeciliidae). *Ecology* 52, 778-790.
- Mee J, Chan C, Taylor E (2013) Coexistence of sperm-dependent asexuals and their sexual hosts: the role of differences in fitness-related traits. *Environmental Biology of Fishes* 96, 1111-1121.
- Mee J, Rowe L (2006) A comparison of parasite loads on asexual and sexual *Phoxinus* (Pisces: Cyprinidae). *Canadian Journal of Zoology* 84, 808-816.
- Mee JA (2014) Host-size-matching in a sperm-dependent asexual fish. *Evolutionary Biology* 41, 459-472.

- Mee JA, Otto SP (2010) Variation in the strength of male mate choice allows long-term coexistence of sperm-dependent asexuals and their sexual hosts. *Evolution* 64, 2808-2819.
- Meirmans PG, Van Tienderen PH (2004) genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* 4, 792-794.
- Michalakis Y, Excoffier L (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142, 1061-1064.
- Mitteroecker P, Gunz P (2009) Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology* 36, 235-247.
- Miura K, Agetsuma M, Kitano H, *et al.* (2009) A metastable DWARF1 epigenetic mutant affecting plant stature in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 11218-11223.
- Møller AP, Swaddle JP (1997) *Asymmetry, developmental stability and evolution* Oxford University Press, UK.
- Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E (1999) Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature genetics* 23, 314-318.
- Moritz C (1994) Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 373-374.
- Müller H (1942) Isolating mechanisms, evolution and temperature. *Biological Symposium* 6, 71-125.
- Müller HJ (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1, 2-9.
- Muller J, Hense B, Fuchs T, Utz M, Pötzsche C (2013) Bet-hedging in stochastically switching environments. *Journal of Theoretical Biology* 336, 144-157.
- Murren CJ, Auld JR, Callahan H, *et al.* (2015) Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity* 115, 293-301.
- Nanda I, Scharl M, Feichtinger W, *et al.* (1995) Chromosomal evidence for laboratory synthesis of a triploid hybrid between the gynogenetic teleost *Poecilia formosa* and its host species. *Journal of Fish Biology* 47, 619-623.
- Nanda I, Schlupp I, Lamatsch DK, *et al.* (2007) Stable inheritance of host species-derived microchromosomes in the gynogenetic fish *Poecilia formosa*. *Genetics* 177, 917-926.

- Neaves WB, Baumann P (2011) Unisexual reproduction among vertebrates. *Trends in Genetics* 27, 81-88.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Neiman M, Meirmans S, Meirmans PG (2009) What can asexual lineage age tell us about the maintenance of sex? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1168, 185-200.
- Neville HM, Dunham JB, Peacock MM (2006) Landscape attributes and life history variability shape genetic structure of trout populations in a stream network. *Landscape Ecology* 21, 901-916.
- New JG (1962) Hybridization between two cyprinids, *Chrosomus eos* and *Chrosomus neogaeus*. *Copeia*, 147-152.
- Nijhout HF (2003) Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evolution and Development* 5, 9-18.
- Niklasson M, Tomiuk J, Parker E (2004) Maintenance of clonal diversity in *Dipsa bifurcata* (Fallén, 1810) (Diptera: Lonchopteridae). I. Fluctuating seasonal selection moulds long-term coexistence. *Heredity* 93, 62-71.
- Nussey DH, Postma E, Gienapp P, Visser ME (2005) Selection on heritable phenotypic plasticity in a wild bird population. *Science* 310, 304-306.
- O'Neill RJW, O'Neill MJ, Graves JAM (1998) Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature* 393, 68-72.
- Oden NL, Sokal RR (1986) Directional autocorrelation: an extension of spatial correlograms to two dimensions. *Systematic Biology* 35, 608-617.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, *et al.* (2015) vegan: Community Ecology Package. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>. (Consulté le 21 février 2016)
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874-879.
- Orr HA, Madden LD, Coyne JA, Goodwin R, Hawley RS (1997) The developmental genetics of hybrid inviability: a mitotic defect in *Drosophila* hybrids. *Genetics* 145, 1031-1040.
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34, 401-437.

- Padilla DK, Adolph SC (1996) Plastic inducible morphologies are not always adaptive: the importance of time delays in a stochastic environment. *Evolutionary Ecology* 10, 105-117.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4, 347-354.
- Palmer AR (1994) Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: *Developmental instability: its origins and evolutionary implications* (ed. Therese Ann Markow), pp. 335-364. Springer Netherlands.
- Palmer AR, Strobeck C (1986) Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual review of Ecology and Systematics* 17, 391-421.
- Palmer AR, Strobeck C (1992) Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zoologica Fennica* 191, 57-72.
- Parrott BB, Kohno S, Cloy-McCoy JA, Guillette LJ (2013) Differential incubation temperatures result in dimorphic DNA methylation patterning of the SOX9 and aromatase promoters in gonads of alligator (*Alligator mississippiensis*) embryos. *Biology of Reproduction* 90, 1-11.
- Parsons P (1990) Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress. *Biological Reviews* 65, 131-145.
- Parsons P (1992) Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity* 68, 361-364.
- Pasco-Viel E, Charles C, Chevret P, *et al.* (2010) Evolutionary trends of the pharyngeal dentition in Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi). *PLoS One* 5, e11293.
- Pasco-Viel E, Yang L, Veran M, *et al.* (2014) Stability versus diversity of the dentition during evolutionary radiation in cyprinine fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 20132688.
- Peres-Neto PR, Legendre P, Dray S, Borcard D (2006) Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* 87, 2614-2625.
- Peyer B (1968) *Comparative odontology* University of Chicago Press, Chicago.
- Pfennig DW, Wund MA, Snell-Rood EC, *et al.* (2010) Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 459-467.
- Philippi T, Seger J (1989) Hedging one's evolutionary bets, revisited. *Trends in Ecology & Evolution* 4, 41-44.

- Pieau C (1996) Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays* 18, 19-26.
- Piersma T, Drent J (2003) Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 228-233.
- Piggot P (2010) Epigenetic switching: bacteria hedge bets about staying or moving. *Current Biology* 20, R480-R482.
- Pigliucci M (1996) How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends in Ecology & Evolution* 11, 168-173.
- Pigliucci M (2001) *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture* Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Pigliucci M (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution* 20, 481-486.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, *et al.* (2004) GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95, 536-539.
- Poissant J, Knight TW, Ferguson MM (2005) Nonequilibrium conditions following landscape rearrangement: the relative contribution of past and current hydrological landscapes on the genetic structure of a stream-dwelling fish. *Molecular Ecology* 14, 1321-1331.
- Poulin R, Krasnov BR, Mouillot D (2011) Host specificity in phylogenetic and geographic space. *Trends in Parasitology* 27, 355-361.
- Pound GE, Doncaster CP, Cox SJ (2002) A Lotka–Volterra model of coexistence between a sexual population and multiple asexual clones. *Journal of Theoretical Biology* 217, 535-545.
- Proulx R, Magnan P (2004) Contribution of phenotypic plasticity and heredity to the trophic polymorphism of lacustrine brook charr (*Salvelinus fontinalis* M.). *Evolutionary Ecology Research* 6, 503-522.
- Prugnolle F, Théron A, Pointier JP, *et al.* (2005) Dispersal in a parasitic worm and its two hosts: consequence for local adaptation. *Evolution* 59, 296-303.
- Pujadas E, Feinberg AP (2012) Regulated noise in the epigenetic landscape of development and disease. *Cell* 148, 1123-1131.
- Qian M, Yao S, Jing L, *et al.* (2013) ENC1-like integrates the retinoic acid/FGF signaling pathways to modulate ciliogenesis of Kupffer's vesicle during zebrafish embryonic development. *Developmental Biology* 374, 85-95.
- Quattro J, Avise J, Vrijenhoek R (1991) Molecular evidence for multiple origins of hybridogenetic fish clones (Poeciliidae: Poeciliopsis). *Genetics* 127, 391-398.

- Quattro JM, Avise JC, Vrijenhoek RC (1992) An ancient clonal lineage in the fish genus *Poeciliopsis* (Atheriniformes: Poeciliidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 348-352.
- Quilodr n CS, Montoya-Burgos JI, Currat M (2015) Modeling interspecific hybridization with genome exclusion to identify conservation actions: the case of native and invasive *Pelophylax* waterfrogs. *Evolutionary Applications* 8, 199–210.
- Rajon E, Desouhant E, Chevalier M, D bias F, Menu F (2014) The evolution of bet hedging in response to local ecological conditions. *American Naturalist* 184, E1-E15.
- Rakyan VK, Blewitt ME, Druker R, Preis JI, Whitelaw E (2002) Metastable epialleles in mammals. *Trends in Genetics* 18, 348-351.
- Rando OJ, Verstrepen KJ (2007) Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell* 128, 655-668.
- Rapp RA, Wendel JF (2005) Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist* 168, 81-91.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17, 230-237.
- Reed TE, Waples RS, Schindler DE, Hard JJ, Kinnison MT (2010) Phenotypic plasticity and population viability: the importance of environmental predictability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277, 3391-3400.
- Rhode JM, Cruzan MB (2005) Contributions of heterosis and epistasis to hybrid fitness. *The American Naturalist* 166, 124-139.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27, 83-109.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225.
- Richards EJ (2006) Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance. *Nature Reviews: Genetics* 7, 395-401.
- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, *et al.* (2003) Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301, 1211-1216.
- Riggs AD, Xiong Z, Wang L, LeBon JM (1998) Methylation dynamics, epigenetic fidelity and X chromosome structure. In: *Epigenetics* (ed. John Wiley & Sons), pp. 214-227. Novartis Foundation Symposium, Chistester.

- Roff DA (1996) The evolution of threshold traits in animals. *Quarterly Review of Biology* 71, 3-35.
- Rohlf F (2010) tpsDig v2.16. *Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York.*
- Rohlf FJ (1999) Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification* 16, 197-223.
- Rohlf FJ, Slice D (1990) Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology* 39, 40-59.
- Rousset F (1996) Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics* 142, 1357-1362.
- Rousset F (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103-106.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Savolainen O, Lascoux M, Merilä J (2013) Ecological genomics of local adaptation. *Nature Reviews Genetics* 14, 807-820.
- Scharnweber K, Plath M, Tobler M (2011) Feeding efficiency and food competition in coexisting sexual and asexual livebearing fishes of the genus *Poecilia*. *Environmental Biology of Fishes* 90, 197-205.
- Scheiner SM (1993) Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24, 35-68.
- Scheiner SM (2013) The genetics of phenotypic plasticity. XII. Temporal and spatial heterogeneity. *Ecology and Evolution* 3, 4596-4609.
- Scheiner SM (2014a) Bet-hedging as a complex interaction among developmental instability, environmental heterogeneity, dispersal, and life-history strategy. *Ecology and Evolution* 4, 505-515.
- Scheiner SM (2014b) The genetics of phenotypic plasticity. XIII. Interactions with developmental instability. *Ecology and Evolution* 4, 1347-1360.
- Scheiner SM, Berrigan D (1998) The genetics of phenotypic plasticity. VIII. The cost of plasticity in *Daphnia pulex*. *Evolution* 52, 368-378.
- Scheiner SM, Goodnight CJ (1984) The comparison of phenotypic plasticity and genetic variation in populations of the grass *Danthonia spicata*. *Evolution* 38, 845-855.

- Scheiner SM, Holt RD (2012) The genetics of phenotypic plasticity. X. Variation versus uncertainty. *Ecology and Evolution* 2, 751-767.
- Schley D, Doncaster CP, Sluckin T (2004) Population models of sperm-dependent parthenogenesis. *Journal of Theoretical Biology* 229, 559-572.
- Schlosser IJ, Doeringsfeld MR, Elder JF, Arzayus LF (1998) Niche relationships of clonal and sexual fish in a heterogeneous landscape. *Ecology* 79, 953-968.
- Schlupp I (2005) The evolutionary ecology of gynogenesis. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36, 399-417.
- Schlupp I, Marler C, Ryan MJ (1994) Benefit to male sailfin mollies of mating with heterospecific females. *Science* 263, 373-374.
- Schlupp I, Nanda I, Döbler M, *et al.* (1998) Dispensable and indispensable genes in an ameiotic fish, the Amazon molly *Poecilia formosa*. *Cytogenetic and Genome Research* 80, 193-198.
- Schlupp I, Parzefall J, Scharl M (1991) Male mate choice in mixed bisexual/unisexual breeding complexes of *Poecilia* (Teleostei: Poeciliidae). *Ethology* 88, 215-222.
- Schlupp I, Parzefall J, Scharl M (2002) Biogeography of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Journal of Biogeography* 29, 1-6.
- Schlupp I, Taebel-Hellwig A, Tobler M (2010) Equal fecundity in asexual and sexual mollies (*Poecilia*). *Environmental Biology of Fishes* 88, 201-206.
- Schmitz RJ, Schultz MD, Lewsey MG, *et al.* (2011) Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants. *Science* 334, 369-373.
- Schories S, Lampert KP, Lamatsch DK, De León FJG, Scharl M (2007) Analysis of a possible independent origin of triploid *P. formosa* outside of the Río Purificación river system. *Frontiers in Zoology* 4, 1.
- Schultz R (1977) Evolution and ecology of unisexual fishes. *Evolutionary Biology* 10, 277-331.
- Schultz RJ (1971) Special adaptive problems associated with unisexual fishes. *American Zoologist* 11, 351-360.
- Schwartz MK, Luikart G, Waples RS (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 25-33.
- Schwenk K, Brede N, Streit B (2008) Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 2805-2811.

- Scott WB, Crossman EJ (1973) Freshwater fishes of Canada. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada* 184, 966p.
- Seehausen O (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 198-207.
- Seehausen O (2006) Conservation: losing biodiversity by reverse speciation. *Current Biology* 16, R334-R337.
- Seger J, Brockmann HJ (1987) What is bet-hedging? *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 4, 182-211.
- Semel Y, Nissenbaum J, Menda N, *et al.* (2006) Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 12981-12986.
- Senay C, Boisclair D, Peres-Neto PR (2015) Habitat-based polymorphism is common in stream fishes. *Journal of Animal Ecology* 84, 219-227.
- Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, *et al.* (2002) Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes to Cells* 7, 961-969.
- Shull GH (1948) What is "Heterosis"? *Genetics* 33, 439-446.
- Simon J-C, Delmotte F, Rispe C, Crease TJ (2003) Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society* 79, 151-163.
- Simons AM (2011) Modes of response to environmental change and the elusive empirical evidence for bet hedging. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278, 1601-1609.
- Simpson EH (1949) Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.
- Simpson GG (1953) The Baldwin effect. *Evolution* 7, 110-117.
- Skalski GT, Grose MJ (2006) Characterization of microsatellite loci in the creek chub (*Semotilus atromaculatus*). *Molecular Ecology Notes* 6, 1240-1242.
- Slatkin M (1974) Hedging one's evolutionary bets. *Nature* 250, 704-705.
- Smith AC, Surridge AK, Prescott MJ, *et al.* (2012) Effect of colour vision status on insect prey capture efficiency of captive and wild tamarins (*Saguinus* spp.). *Animal Behaviour* 83, 479-486.
- Smith JM, Maynard-Smith J (1978) *The evolution of sex* Cambridge Univ Press.

- Smith RE, Hocutt CH (1981) Formulae variations of pharyngeal tooth counts in the cyprinid genus *Notropis*. *Copeia* 1981, 222-224.
- Spreitzer ML, Mautner S, Makasa L, Sturmbauer C (2012) Genetic and morphological population differentiation in the rock-dwelling and specialized shrimp-feeding cichlid fish species *Altolamprologus compressiceps* from Lake Tanganyika, East Africa. *Hydrobiologia* 682, 143-154.
- Stalker HD (1956) On the evolution of parthenogenesis in Lonchoptera (Diptera). *Evolution* 10, 345-359.
- Starrfelt J, Kokko H (2012) Bet-hedging—a triple trade-off between means, variances and correlations. *Biological Reviews* 87, 742-755.
- Stasiak RH (1977) Morphology and variation in the finescale dace, *Chrosomus neogaeus*. *Copeia* 1977, 771-774.
- Stearns SC (1989) The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience* 39, 436-445.
- Stebbins GL (1959) The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society* 103, 231-251.
- Stebbins GL (1985) Polyploidy, Hybridization, and the Invasion of New Habitats. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72, 824-832.
- Stelkens R, Seehausen O (2009) Genetic distance between species predicts novel trait expression in their hybrids. *Evolution* 63, 884-897.
- Stier AC, Geange SW, Hanson KM, Bolker BM (2013) Predator density and timing of arrival affect reef fish community assembly. *Ecology* 94, 1057-1068.
- Stock DW (2007) Zebrafish dentition in comparative context. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 308, 523-549.
- Sultan S (1995) Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta Botanica Neerlandica* 44, 363-383.
- Suzuki MM, Bird A (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics* 9, 465-476.
- Teltser C, Greenwald KR (2015) Survivorship of Ploidy-variable Unisexual Ambystoma Salamanders Across Developmental Stages. *Herpetologica* 71, 81-87.
- Tomiuk J, Köhler W (2007) Population genetics: Evolutionary features of asexual species. In: *Progress in Botany*, pp. 130-150. Springer.

- Tomlinson J (1966) The advantages of hermaphroditism and parthenogenesis. *Journal of Theoretical Biology* 11, 54-58.
- Touchon JC, Warkentin KM (2008) Reproductive mode plasticity: aquatic and terrestrial oviposition in a treefrog. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 7495-7499.
- Uzzell T (1970) Meiotic mechanisms of naturally occurring unisexual vertebrates. *American Naturalist* 104, 433-445.
- Van Doninck K, Schön I, De Bruyn L, Martens K (2002) A general purpose genotype in an ancient asexual. *Oecologia* 132, 205-212.
- Van Doninck K, Schön I, Maes F, De Bruyn L, Martens K (2003) Ecological strategies in the ancient asexual animal group Darwinulidae (Crustacea, Ostracoda). *Freshwater Biology* 48, 1285-1294.
- Van Valen L (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1, 1-30.
- Van Valen L (1977) The red queen. *The American Naturalist* 111, 809-810.
- Vasil'ev VP, Vasil'eva KD, Osinov AG (1989) Evolution of a diploid-triploid-tetraploid complex in fishes of the genus *Cobitis* (Pisces, Cobitidae). In: *Evolution and ecology of unisexual vertebrates* (eds. RM Dawley, JP Bogart), pp. Bull. 466, pp. 153-169, New York State Museum, New York.
- Veening J-W, Smits WK, Kuipers OP (2008) Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 62, 193-210.
- Vergilino R, Leung C, Angers B (2016) Inconsistent phylogeographic pattern between a sperm dependent fish and its host: *in situ* hybridization vs dispersal. *BMC Evolutionary Biology* 16, 1-12.
- Vergilino R, Markova S, Ventura M, Manca M, Dufresne F (2011) Reticulate evolution of the *Daphnia pulex* complex as revealed by nuclear markers. *Molecular Ecology* 20, 1191-1207.
- Verhoeven KJ, Preite V (2014) Epigenetic variation in asexually reproducing organisms. *Evolution* 68, 644-655.
- Vogt G (2015) Stochastic developmental variation, an epigenetic source of phenotypic diversity with far-reaching biological consequences. *Journal of Biosciences* 40, 159-204.
- Vollmer SV, Palumbi SR (2002) Hybridization and the evolution of reef coral diversity. *Science* 296, 2023-2025.

- Vorburger C, Lancaster M, Sunnucks P (2003) Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two ‘superclones’ in Victoria, Australia. *Molecular Ecology* 12, 3493-3504.
- Vrana PB, Fossella JA, Matteson P, *et al.* (2000) Genetic and epigenetic incompatibilities underlie hybrid dysgenesis in *Peromyscus*. *Nature Genetics* 25, 120-124.
- Vrijenhoek R (1984) Ecological differentiation among clones: the frozen niche variation model. In: *Population Biology and Evolution* (eds. Klaus Wöhrmann, Volker Loeschcke), pp. 217-231. Springer Berlin Heidelberg.
- Vrijenhoek R, Dawley R, Cole C, Bogart J (1989) A list of the known unisexual vertebrates. In: *Evolution and ecology of unisexual vertebrates* (eds. Robert M. Dawley, James P. Bogart), pp. 19-23. New York State Museum, Bulletin 466. Albany, New York, USA.
- Vrijenhoek RC (1979) Factors affecting clonal diversity and coexistence. *American Zoologist* 19, 787-797.
- Vrijenhoek RC (1989) Genetic and ecological constraints on the origins and establishment of unisexual vertebrates. In: *Evolution and ecology of unisexual vertebrates* (eds. Robert M. Dawley, James P. Bogart), pp. 24-31. New York State Museum, Bulletin 466. Albany, New York, USA.
- Vrijenhoek RC (1994) Unisexual fish: model systems for studying ecology and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25, 71-96.
- Vrijenhoek RC (1998) Animal clones and diversity. *Bioscience* 48, 617-628.
- Vrijenhoek RC, Parker JED (2009) Geographical parthenogenesis: general purpose genotypes and frozen niche variation. In: *Lost sex* (eds. Isa Schön, Koen Martens, Peter van Dijk), pp. 99-131. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Vrijenhoek RC, Pfeiler E (1997) Differential survival of sexual and asexual *Poeciliopsis* during environmental stress. *Evolution* 51, 1593-1600.
- Waddington CH (1942) Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150, 563-565.
- Waddington CH (1953a) Epigenetics and evolution, 186-199.
- Waddington CH (1953b) Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* 7, 118-126.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* 15, 1419-1439.

- Waterland RA, Jirtle RL (2003) Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and cellular biology* 23, 5293-5300.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, *et al.* (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience* 7, 847-854.
- Weeks SC, Gaggiotti OE, Schenck RA, Spindler KP, Vrijenhoek RC (1992) Feeding behavior in sexual and clonal strains of *Poeciliopsis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 30, 1-6.
- Weir B, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1358-1370.
- Welch DBM, Meselson M (2000) Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288, 1211-1215.
- West-Eberhard MJ (1989) Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20, 249-278.
- West SA, Peters AD (2000) Paying for sex is not easy. *Nature* 407, 962.
- Wetzel RG (2001) *Limnology: lake and river ecosystems*, 3rd edn. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Weyhenmeyer GA, Kortelainen P, Sobek S, Müller R, Rantakari M (2012) Carbon dioxide in boreal surface waters: a comparison of lakes and streams. *Ecosystems* 15, 1295-1307.
- Whiteley AR, Hastings K, Wenburg JK, *et al.* (2010) Genetic variation and effective population size in isolated populations of coastal cutthroat trout. *Conservation Genetics* 11, 1929-1943.
- Whitman D, Agrawal A (2009) What is phenotypic plasticity and why is it important? In: *Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences* (eds. DW Whitman, TN Ananthakrishnan), pp. 1-63. Science Publishers, Enfield, NH.
- Williams GC (1975) *Sex and Evolution* Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Wilson AB, Veraguth IE (2010) The impact of Pleistocene glaciation across the range of a widespread European coastal species. *Molecular ecology* 19, 4535-4553.
- Wilson CC, Bernatchez L (1998) The ghost of hybrids past: fixation of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in an introgressed population of lake trout (*S. namaycush*). *Molecular Ecology* 7, 127-132.
- Wofford JE, Gresswell RE, Banks MA (2005) Influence of barriers to movement on within-watershed genetic variation of coastal cutthroat trout. *Ecological Applications* 15, 628-637.

- Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA (1998) Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in *A^{vy/a}* mice. *The FASEB Journal* 12, 949-957.
- Xiong L, Xu C, Maroof MS, Zhang Q (1999) Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular and General Genetics* 261, 439-446.
- Yakimowski SB, Rieseberg LH (2014) The role of homoploid hybridization in evolution: A century of studies synthesizing genetics and ecology. *American Journal of Botany* 101, 1247-1258.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD (2012) *Geometric morphometrics for biologists: a primer* Elsevier Academic Press, San Diego.
- Zeng L-W (1996) Resurrecting Muller's theory of Haldane's rule. *Genetics* 143, 603-607.